



ÉCOLE
CENTRALE LYON

N° d'ordre NNT : 2016LYSEC27

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de l'Ecole Centrale de Lyon

ÉCOLE DOCTORALE N°162
MÉCANIQUE – ÉNERGETIQUE - GÉNIE CIVIL - ACOUSTIQUE

Spécialité de doctorat : Biomécanique

Soutenue publiquement le 4 octobre 2016 par :

Aurélie LEVILLAIN

Caractérisation multi-échelle des ménisques du genou : effet de
l'arthrose

Devant le jury composé de :

Y. HENROTIN	Professeur	Université de Liège	Rapporteur
S. AVRIL	Professeur	Ecole des Mines de Saint-Etienne	Rapporteur
P. CHABRAND	Professeur	Université d'Aix-Marseille	Président
C. BOULOCHER	Maître de conférences	VetAgro Sup	Examineur
V. VIATEAU	Professeur	Ecole N ^{le} Vétérinaire d'Alfort	Examineur
T. HOC	Professeur	Ecole Centrale Lyon	Directeur de thèse
H. MAGOARIEC	Maître de conférences	Ecole Centrale Lyon	Co-encadrante

Remerciements

Robert Louis Stevenson disait « L'important, ce n'est pas la destination, mais le voyage en lui-même ». Je pourrais dire la même chose à propos de ma thèse : ces 3 ans au laboratoire (et ailleurs) compteront tout autant que mon diplôme de docteur. Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'arriver jusque-là.

Je voudrais d'abord remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir examiné ce travail et pour leurs questions et discussions très enrichissantes. Je remercie Patrick Chabrand de l'Université d'Aix Marseille pour avoir présidé ce jury, Yves Henrotin de l'Université de Liège et Stéphane Avril de l'Ecole des Mines de Saint Etienne pour leurs responsabilités de rapporteur et Véronique Viateau de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort pour avoir été examinateur. Je remercie tout particulièrement Thierry Hoc, Hélène Magoaric et Caroline Boulocher, pour l'encadrement de très grande qualité qu'ils m'ont fourni tout au long de ce travail.

Je souhaiterais remercier Hélène, qui m'a fait confiance dès ma 2A en me proposant un stage et surtout cette thèse. Sa rigueur et ses relectures minutieuses m'ont permis de maîtriser l'usage de la virgule à la perfection (ou presque), et ses questions m'ont sans cesse poussée à la réflexion. Je la remercie tout particulièrement pour sa grande sympathie et pour s'être essayée à ma passion. Je souhaiterais également remercier Thierry, qui m'a encadrée du stage jusqu'à la thèse et avec qui j'ai beaucoup appris. Je le remercie pour son implication, sa disponibilité et ses bons conseils, et pour m'avoir poussée à prendre confiance. Je retiendrai notamment qu'une bonne journée de travail commence à 8h par un café et se termine par une (plusieurs) partie(s) de coinche. Et je souhaiterais remercier Caroline pour toutes les discussions qu'on a eues sur l'arthrose et sur l'anatomie des lapins – en particulier sur les différences entre le genou droit et le genou gauche –, et pour sa très grande réactivité et efficacité pour relire un chapitre ou répondre à une question.

Je souhaiterais ensuite dire un énorme merci à tous mes collègues que j'ai côtoyés au quotidien et qui ont fait de ces journées de travail un véritable plaisir. Merci à Guillaume et Romain qui ont été les premiers à m'accueillir dans leur bureau et qui m'ont accompagnée au multiphoton pendant des heures ou à Amsterdam en roller. Merci à Benoît, qui a largement contribué à la très bonne ambiance dans l'équipe et qui m'a permis de gagner le concours aux règles évolutives qu'on s'était lancé. Merci à Thomas pour son aide et son soutien tout au long de ma thèse, jusque de l'autre côté de l'Atlantique, que ce soit sur la façon d'automatiser le traitement des données ou sur la façon dont je vois mon avenir. Merci à Audrey pour son enthousiasme, sa réactivité et son soutien sans faille dans la dernière ligne droite. Merci à Ophélie (ou Aurélie avec un « f »), pour toutes nos passions et goûts partagés : je parle bien sûr de Matlab et du Nanoindenteur. Merci à Agathe pour sa joie de vivre et son dynamisme à toute épreuve. Merci à Cécile, avec qui j'ai partagé des TD, des BE et de multiples changements d'emploi du temps. Merci à Witold, le spécialiste des fibres de collagène et d'élastine avec qui j'ai pris plaisir à échanger. Merci à Lauriane et Kelig pour les moments

passés au labo et leur soutien et leurs encouragements pour ma soutenance et ma recherche d'emploi. Merci à Sarah, toujours prête à relever des défis. Merci à Noëlie, avec qui j'ai pu discuter soutenance et dossier de qualification. Merci à Emna et Mehdi pour nos discussions en salle calcul ou en salle café, et à tous les membres du H10 qui m'ont tenu compagnie pendant les quelques essais d'indentation... Merci également aux GC, avec qui j'ai pris plaisir à discuter sur des sujets autres que la biomécanique. Et pour finir, merci à Magali et Catherine, avec qui j'ai passé la majeure partie de mon temps. Merci à Magali pour tous ses conseils avisés, aussi bien sur l'élaboration d'un rétroplanning, sur la première répétition de soutenance que sur la façon de descendre une piste bleue-rouge. Merci à Catherine pour son expertise en Matlab, en biostatistique et en histologie (ou presque) et pour toutes les manip qu'on a faites ensemble.

Je voudrais également remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé en dehors du laboratoire : Séma Kaderli pour les premières manip sur les lapins, le personnel de l'école Vetagro sup avec qui j'ai appris l'histologie, et enfin Adeline Decambon, Véronique Viateau et Morad Bensidhoum pour les manip lapin à Maisons-Alfort.

Je voudrais aussi remercier les personnes qui m'ont facilité toutes les démarches administratives au cours de cette thèse. Merci à Isabelle Tixier pour sa sympathie et son efficacité, et pour m'avoir fait l'honneur de venir assister à ma soutenance. Merci à Béatrice Chervet, avec qui j'ai pris plaisir à discuter entre deux BE en salle info, au G8 ou le jour de ma soutenance. Merci également à Helène Schoch, toujours très efficace et disponible.

Enfin, cette thèse ne se serait pas aussi bien déroulée sans le soutien de ma famille et de mes amis, sarthois et lyonnais, qui m'ont toujours encouragée et qui m'ont fait le plaisir de partager ce grand jour avec moi, par leur présence ou par leurs messages. Un merci tout particulier à Fanilo pour son soutien quotidien tout au long de cette thèse, pour son intérêt et pour son aide, et surtout pour sa grande disponibilité et sa patience.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Liste des figures	8
Liste des tableaux	12
INTRODUCTION GENERALE.....	15
CHAPITRE 1 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
Introduction du chapitre.....	19
1. Les ménisques du genou sain	19
1.1 Anatomie, composition et structure des ménisques	19
1.1.1 Anatomie	19
1.1.2 Vascularisation et innervation	22
1.1.3 Matrice extracellulaire.....	22
1.1.3.1 Types de collagène et orientation des fibres.....	23
1.1.3.2 Protéoglycanes et glycosaminoglycanes	24
1.1.4 Cellules.....	25
1.2 Fonctions des ménisques dans l’articulation du genou.....	25
1.2.1 Répartition des efforts	26
1.2.2 Congruence et stabilisation	26
1.2.3 Absorption des chocs	27
1.2.4 Limitation des frottements	28
1.3 Comportement mécanique des ménisques	28
1.3.1 Propriétés mécaniques différentes selon la sollicitation	28
1.3.2 Comportement viscoélastique	29
1.3.3 Comportement mécanique non linéaire.....	30
1.3.4 Comportement mécanique anisotrope.....	31
1.3.5 Propriétés mécaniques hétérogènes.....	31
1.4 Bilan : relations structure – fonction – propriétés mécaniques des ménisques sains..	31
2. Arthrose, gonarthrose et dégradation méniscale.....	33
2.1 Arthrose et gonarthrose : généralités	33
2.1.1 Prévalence et impact socioéconomique de l’arthrose	33

2.1.2 Définition, classification et lésions arthrosiques.....	33
2.1.3 Diagnostic de l'arthrose	35
2.2 Modèles d'arthrose.....	37
2.2.1 Techniques d'induction de l'arthrose	37
2.2.2 Animaux utilisés.....	39
2.2.3. Aspects éthiques	41
2.2.4 Choix du modèle d'arthrose pour l'étude des ménisques : rupture du LCA chez le lapin.....	42
2.3 Effet de l'arthrose sur les ménisques	44
2.3.1 Effets macroscopiques.....	44
2.3.2 Effets sur la matrice extracellulaire.....	46
2.3.2.1 Effets sur la quantité de collagène et l'organisation des fibres	46
2.3.2.2 Effets sur la quantité et la répartition des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes	47
2.3.3 Effets sur les propriétés mécaniques	48
2.3.4 Relations entre les changements microstructuraux et les propriétés mécaniques	50
2.4 Traitements de l'arthrose et des lésions méniscales	51
2.4.1 Réparation ou remplacement du ménisque	51
2.4.2 Traitement contre l'arthrose	52
2.4.3 Viscosupplémentation	54
Conclusion du chapitre	56
CHAPITRE 2 – EFFETS MECANIQUE ET MICROSTRUCTURAL DE L'ARTHROSE : ETUDE PRELIMINAIRE.....	57
Introduction du chapitre.....	57
1. Techniques de caractérisation et traitement statistique des données.....	59
1.1 Caractérisation mécanique : essais d'indentation et détermination du module à la décharge	59
1.2 Caractérisation chimique : microspectroscopie confocale Raman	60
1.3 Caractérisation microstructurale : microscopie confocale multiphoton	60
1.4 Caractérisation histologique.....	61
1.5 Analyse statistique des données	61
2. Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis.....	63
Abstract	64

Introduction.....	65
2.1 Material and method	66
2.1.1 Animal model.....	66
2.1.2 Postoperative care	66
2.1.3 Experimental procedures.....	67
2.1.4 Indentation tests.....	67
2.1.5 Assessment of heterogeneity of the mechanical properties	68
2.1.6 Chemical analyses	69
2.1.7 Microstructural observation	69
2.1.8 Detection of GAGs.....	70
2.1.9 Statistical analysis	70
2.2 Results.....	70
2.2.1 Mechanical properties	70
2.2.2 Effect of OA on the heterogeneity of meniscus mechanical properties	70
2.2.3 Chemical composition.....	71
2.2.4 Collagen microstructure	72
2.2.5 GAG content	73
3. Discussion.....	74
Acknowledgments.....	77
Contributions.....	77
Role of the funding source	77
Competing interests	78
Conclusion du chapitre	79
CHAPITRE 3 : EFFET DE L'ARTHROSE SUR LES PROPRIETES VISCOELASTIQUES DES MENISQUES MEDIAUX: CORRELATION AVEC LA MICROSTRUCTURE.....	81
Introduction du chapitre.....	81
1. Détermination des propriétés viscoélastiques des ménisques	83
1.1 Modèle viscoélastique.....	83
1.2 Essais d'indentation – relaxation	85
1.3 Résolution	86
1.3.1 Choix du coefficient de Poisson.....	86
1.3.2 Effet du module à l'équilibre sur la force normalisée.....	88
1.3.3 Choix du nombre de branches	88

1.4 Validation du modèle avec un calcul éléments finis.....	90
2. Viscoelastic properties of rabbit osteoarthritic menisci: A correlation with matrix alterations.....	91
Abstract.....	92
Introduction.....	92
2.1 Materials and methods.....	93
2.1.1 Animal model.....	93
2.1.2 Experimental procedure.....	94
2.1.3 Mechanical testing.....	95
2.1.4 Viscoelastic model.....	95
2.1.5 Microscopic imaging and grading.....	97
2.1.6 Detection of GAGs.....	98
2.1.7 Statistical analysis.....	98
2.2 Results.....	99
2.2.1 Macroscopic grading.....	99
2.2.2 Modification of the viscoelastic properties.....	100
2.2.3 Modification of the collagen bundle organization.....	102
2.2.4 Tie fibre organization and GAG coverage.....	103
3. Discussion.....	104
Acknowledgement.....	106
3. Caractérisation des ménisques controlatéraux : pertinence en tant que groupe contrôle	107
3.1 Protocole expérimental.....	107
3.2 Propriétés viscoélastiques.....	107
3.3 Organisation des fibres de collagène.....	110
3.4 Conclusion sur la pertinence de la référence controlatérale.....	111
Conclusion du chapitre.....	112
CHAPITRE 4 – EFFET D’UNE THERAPIE DE VISCOSUPPLEMENTATION SUR LES PROPRIETES DES MENISQUES.....	115
Introduction du chapitre.....	115
Effect of a viscosupplementation therapy on rabbit menisci in an anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis.....	118
Abstract.....	118
Introduction.....	119

1. Materials and methods	119
1.1. Animal model	119
1.2. Experimental procedure	121
1.3. Mechanical analyses	121
1.4. Microscopic imaging and grading	122
1.5. Detection of GAGs	122
1.6. Statistical analyses	123
2. Results	123
2.1. Gross morphological assessment	123
2.2. Viscoelastic properties	125
2.3. Collagen fibers organization	127
2.4. GAGs coverage	128
3. Discussion	128
Conclusion du chapitre	131
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	133
Références	136
Résumé	154
Abstract	154

Liste des figures

Figure 0.1 – Représentation schématique d'une vue antérieure d'un genou gauche sain humain (Makris et al., 2011).	16
Figure 1.1 - A) Vue antérieure du genou gauche (Makris et al., 2011) et B) Vue supérieure du plateau tibial du genou droit (Fox et al., 2012).	20
Figure 1.2 – Division schématique du ménisque en A) trois régions (antérieure, centrale, postérieure), B) trois zones (externe, centrale, interne) et C) trois couches (superficielle fémorale, centrale, superficielle tibiale). A) Vue supérieure d'un ménisque médial droit. B) et C) Vues en coupes.	21
Figure 1.3 – Schématisation de la vascularisation et du type de cellules dans le ménisque, selon les zones (Makris et al., 2011).	22
Figure 1.4 – Architecture des fibres de collagène dans le ménisque. 1 : Couche superficielle très fine, 2 : Couche superficielle lamellaire, 3 : Couche centrale (Petersen et Tillmann, 1998). Par la suite, les couches 1 et 2 seront considérées comme une seule couche, appelée couche superficielle (tibiale ou fémorale) du ménisque.	24
Figure 1.5 – Coupes histologiques d'un ménisque de bœuf, montrant l'organisation des fibres liantes (flèches pleines). Les flèches en pointillés montrent les fibres radiales de la couche superficielle se prolongeant dans la couche centrale. Barre d'échelle : 5 mm (Andrews et al., 2014).	24
Figure 1.6 – Conversion de l'effort axial de compression en contraintes circonférentielles de traction au sein du ménisque. F_{fem} : force transmise par le fémur, F_{tib} : force transmise par le tibia, F_{ant} : force transmise par l'attache antérieure, F_{pos} : force transmise par l'attache postérieure, F_{circ} : force dans la direction circonférentielle, F_{rad} : force dans la direction radiale, F_v : force dans la direction verticale, F_h : force dans la direction horizontale (Makris et al., 2011).	26
Figure 1.7 – Rôle du ménisque dans la stabilisation dans le cas A : d'un LCA intact et B : d'une rupture du LCA (Kawamura et al., 2003).	27
Figure 1.8 – Principe de la compression confinée dans le cas du cartilage. L'échantillon est placé dans une chambre dont les parois sont rigides et imperméables. Il est comprimé avec un filtre poreux, sur lequel s'applique une pression P_A (Lu et Mow, 2008).	29
Figure 1.9 – Schématisation des principaux changements structuraux liés à l'arthrose du genou. A gauche : articulation saine. A droite : articulation arthrosique (Hunter et Felson, 2006a).	35
Figure 1.10 – Radiographies du genou en vue antéro – postérieure (en haut) et latérale (en bas) montrant le système de score KL. A) Genou avec un score KL de 1. Présence d'ostéophytes minimes au niveau du condyle fémoral médial (pointe de flèche). B) Genou avec un score KL de 2. Présence d'ostéophytes petits mais nets (flèches), sans pincement de l'interligne articulaire. C) Genou avec un score KL de 3. Pincement de l'interligne articulaire modéré (flèche) et présence d'ostéophytes (pointe de flèche). D) Genou avec un score KL de	

4. Pincement de l'interligne articulaire marqué (flèche), présence d'ostéophytes sévères (pointes de flèche blanches) et sclérose de l'os sous-chondral (pointe de flèche noire) (Link et al., 2003).....	36
Figure 1.11 – Classification des modèles d'arthrose et principaux animaux et techniques utilisés. DMM : déstabilisation du ménisque médial, IATPF : fracture intraarticulaire du plateau tibial, CACTC : compression cyclique du cartilage articulaire tibial.....	37
Figure 1.12 – Modèle d'arthrose non invasif : schéma d'un impact traumatique chez le lapin. Après anesthésie, une masse est lâchée à une certaine hauteur pour frapper l'extrémité distale du fémur. Cet impact engendre une rupture du LCA (Killian et al., 2010b).	38
Figure 1.13 – Ménisques médiaux humains normaux (A,B) et arthrosiques (C,D). Les ménisques normaux ont une surface lisse, blanche et brillante, sans aucun signe de dégénérescence. Les ménisques arthrosiques ont une surface plus jaune et plus rugueuse. Echelle : 1 graduation = 1 mm (Sun et al., 2010).....	44
Figure 1.14 – Types de lésions méniscales fréquents (Greis et al., 2002).	45
Figure 1.15 – Pressions de contact dans le cas de ménisques intacts (à gauche) et après méniscectomie (à droite) (Baratz et al., 1986).	52
Figure 1.16 – Hiérarchie des traitements de l'arthrose en fonction de la sévérité des symptômes. NSAIDs : anti-inflammatoires non stéroïdiens (Hunter et Felson, 2006a).....	53

Figure 2.1 – Etude préliminaire : définition des pattes opérée et controlatérale, des sites et régions d'études, et des directions de sollicitation.	58
Figure 2.2 – Sample preparation procedure: A) optical image of a right lateral meniscus (contralateral) and localization of the two studied regions B) first cutting plane (the radial plane is hatched) and representation of the circumferential direction, C) second cutting plane (the tibial plane is hatched) and representation of the vertical direction.	67
Figure 2.3 – Typical indentation curves of contralateral (black) and operated (grey) menisci. The dotted line represents the tangent (i.e., Slope S) to the curve at the initial point of the unloading part.....	68
Figure 2.4 – Raman spectra of contralateral and operated menisci in medial and lateral sites. Presence of the main collagen bands. Absence of the crystal bands (HA: hydroxyapatite, CPPD: calcium pyrophosphate dihydrate).	72
Figure 2.5 – Circumferential collagen fibers arrangement in A) medial and B) lateral contralateral menisci. The arrow indicates the radial direction, corresponding to the x-axis, and is oriented towards the center of the meniscus. Images' size: 509.12 μm x 509.12 x 200 μm	72
Figure 2.6 – Circumferential collagen fibers arrangement in A) medial and B) lateral operated menisci. The arrow indicates the radial direction, corresponding to the x-axis, and is oriented towards the center of the meniscus. Images' size: 509.12 μm x 509.12 μm x 200 μm	73
Figure 2.7 – Representative images of SOFG staining in A) contralateral (Cont.) and B) operated (Op.) menisci. The sections correspond to the same animal. Boxes indicate the location of the following detail images; C) (C in B) close-up of an intensely stained area.	

Collagen fibers were highly undulated and not well aligned; D) (D in B) close-up of a weakly stained area. Collagen fibers were straighter and less unorganized; E) mean percent area of GAG coverage and SD bars (n=3). * corresponds to $p < 0.05$ 74

Figure 3.1 – Schéma représentant le modèle de Maxwell généralisé (Chen et al., 2012). E et ν sont respectivement le module de Young et le coefficient de Poisson de chaque ressort, η est la viscosité de chaque amortisseur. Une branche est un couple ressort – amortisseur. 83

Figure 3.2 – Représentation schématique du nanoindenteur G200 (notice nanoindenteur, Agilent technologies). 85

Figure 3.3 – a) Schéma représentant l'indentation de cartilage avec une pointe sphérique. R : rayon de l'indenteur. h_{max} : déplacement de la pointe. h_c : profondeur de contact. b) Courbe Force – temps imposée à la pointe de l'indenteur. La force est maintenue entre les temps t_1 et t_2 . c) Courbe Force – déplacement appliquée à l'échantillon de cartilage. P_1 : force à la fin de la phase de charge. h_1 : profondeur à la fin de la phase de charge. P_2 : force à la fin de la phase de maintien. h_2 : profondeur à la fin de la phase de maintien (Ebenstein et al., 2004). 86

Figure 3.4 – Effet du nombre de branches dans le modèle viscoélastique (traits pleins) et comparaison avec la courbe expérimentale (pointillés). 89

Figure 3.5 – Courbe force - temps normalisée, pour le modèle analytique et la simulation éléments finis..... 90

Figure 3.6 – Experimental procedure. A) Optical image of the femoral surface of a healthy medial meniscus (left knee) and localization of the two studied regions (2 slices of 2 mm in width). B) Cutting plane horizontal to the tibial surface and representation of the indentation direction (perpendicular to the cutting plane). C) Representation of the areas imaged by biphotonic microscopy. 95

Figure 3.7 – Curve representing the normalized force vs time curve for the experiment (dotted line) and the viscoelastic model (solid line)..... 97

Figure 3.8 – Instantaneous modulus, equilibrium modulus, and elastic fraction of menisci from the healthy and operated groups in the anterior and posterior regions. * denotes a significant difference. 101

Figure 3.9 – Representative 3D reconstructions of collagen fibres in a healthy medial meniscus in the anterior (on the left side) and posterior (on the right side) regions. 102

Figure 3.10 – Representative 3D reconstructions of collagen fibres in an OA meniscus in the anterior (on the left side) and posterior (on the right side) regions. 102

Figure 3.11 – Tibial superficial surface of healthy (A) and OA (B,C) medial menisci showing tie fibre organization. A) Tie fibres emanate from the superficial layer. B) Tie fibres are not linked to the superficial layer. C) Tie fibres are not visible. 103

Figure 3.12 – Module instantané des ménisques controlatéraux (Cont.) et opérés, dans les régions antérieure (gauche) et postérieure (droite). 108

Figure 3.13 – Module à l'équilibre des ménisques controlatéraux (Cont.) et opérés, dans les régions antérieure (gauche) et postérieure (droite). * indique une p-value inférieure à 0.05. 108

Figure 3.14 – Fraction élastique des ménisques controlatéraux (Cont.) et opérés, dans les régions antérieure (gauche) et postérieure (droite). * indique une p-value inférieure à 0.05.	109
Figure 3. 15 – Surfaces tibiale (gauche) et fémorale (droite) du ménisque controlatéral n°8, dans la région antérieure.	110
Figure 3. 16 – Reconstruction 3D des fibres de collagène dans la partie centrale du ménisque n°8, région antérieure.	111
Figure 4.1 – Représentation schématique de l’injection intra-articulaire dans un genou droit (vue antérieure).	116
Figure 4.2 – Experimental procedure. A) Optical image of the femoral surface of a healthy medial meniscus and localization of the two studied regions (2 slices of 2 mm in width). Graduation: 1 mm. B) Cutting plane horizontal to the tibial surface and representation of the indentation direction (perpendicular to the cutting plane). C) Representation of the areas imaged by biphotonic microscopy (red squares). GAG content was quantified in the hatched area.	121
Figure 4.3 – Optical images of medial menisci from A) healthy, B) and C) operated non treated, and D) operated treated groups. B) Presence of moderate fibrillation (dashed arrow). C) Presence of a bucket handle tear (arrow). Graduation: 1 mm.	124
Figure 4.4 – Instantaneous modulus, equilibrium modulus, and elastic fraction of menisci from the healthy, operated non treated, and operated treated groups, in the anterior and posterior regions. * denotes a significant difference between two groups.....	126
Figure 4.5 – Representative 3D reconstructions of collagen fibers in the anterior (A,B,C) and posterior (D,E,F) regions of healthy (A,B), operated non treated (B,E), and operated treated (C,F) medial menisci.	127
Figure 4.6 – GAG coverage in healthy, operated (Op.) non treated, and operated (Op.) treated medial menisci, in the anterior and posterior regions. * denotes a significant difference between two groups.....	128

Liste des tableaux

Tableau 1.1 – Caractéristiques géométriques et anatomiques des ménisques médial et latéral humains. LCA : Ligament croisé antérieur ; LCP : Ligament croisé postérieur ; ant-pos : antérieur-postérieur.	21
Tableau 1.2 – Principales spécificités des zones interne et externe des ménisques. MEC : matrice extracellulaire, GAGs : glycosaminoglycanes.	32
Tableau 1.3 – Principales spécificités des régions antérieure et postérieure des ménisques. GAGs : glycosaminoglycanes.	32
Tableau 1.4 – Principales spécificités des couches superficielles et centrale des ménisques.	32
Tableau 1.5 – Avantages et inconvénients des modèles induits et non invasifs d'arthrose (Kuyinu et al., 2016).	39
Tableau 1.6 – Avantages et inconvénients des modèles animaux utilisés dans la littérature pour l'étude de l'arthrose. Les techniques d'induction de l'arthrose pour chaque animal sont précisées. DMM : déstabilisation du ménisque médial. LCA : ligament croisé antérieur (Gregory et al., 2012).	41
Tableau 1.7 – Caractéristiques des ménisques humains et des ménisques de lapin, en termes de biomécanique (amplitude du mouvement du genou), d'anatomie, de composition de la matrice extracellulaire et de propriétés mécaniques. Longueur : dimension du ménisque dans l'axe antérieur – postérieur. Largeur : Distance entre les bords du ménisque, dans la zone centrale. Dimensions normalisées : par rapport à la dimension du tibia. H_A : aggregate modulus. Les termes en gras signifient des différences entre l'humain et le lapin. * et # indiquent des différences significatives entre 2 valeurs.	43
Tableau 1.8 – Score permettant d'évaluer les changements méniscaux à l'échelle macroscopique (Laverty et al., 2010).	45
Tableau 1.9 – Etudes effectuées dans la littérature sur l'effet de l'arthrose sur la quantité de collagène des ménisques et l'organisation des fibres. ACLT : rupture du ligament croisé antérieur.	46
Tableau 1.10 – Etudes effectuées dans la littérature sur l'effet de l'arthrose sur la quantité de GAGs des ménisques. ACLT : rupture du ligament croisé antérieur, mACLT : rupture du ligament croisé antérieur et lésion du ménisque médial, DMM : déstabilisation du ménisque médial, Méd : médial, Lat : latéral, ant : région antérieure, cent : région centrale, pos : région postérieure.	48
Tableau 1.11 – Etudes effectuées dans la littérature sur l'effet de l'arthrose sur les propriétés mécaniques des ménisques. ACLT : rupture du ligament croisé antérieur, mACLT : rupture du ligament croisé antérieur et lésion du ménisque médial, Méd : médial, Lat : latéral, ant : région antérieure, cent : région centrale, pos : région postérieure, H_A : aggregate modulus, k : perméabilité, E_{ins} : module instantané, E_{eq} : module à l'équilibre, E_{el} : module élastique, α : paramètre de rigidité, τ : temps de relaxation, f : fraction élastique.	50

Table 2.1 – Rani ratio between the moduli in circumferential and vertical directions (n=3), Rreg ratio between the moduli in posterior and anterior regions (n=3) and Rsite ratio between the moduli in medial and lateral sites (n=3), for contralateral and operated menisci. In each knee, Rani, Rreg and Rsite averaged the 4 dependent ratios, corresponding to the sites/regions, sites/directions and regions/directions, respectively. Results are presented as the mean ± standard deviation. P corresponds to ratio vs 1. 71

Tableau 3.1 – Variabilité dans le choix du coefficient de Poisson du ménisque (les études portent sur des espèces différentes)..... 87

Tableau 3.2 – Durée d'indentification, écart (au sens des moindres carrés) par rapport à la courbe expérimentale et valeurs de Eeq, Eins et f pour chaque modèle. L'écart relatif par rapport au modèle à 4 branches est donné entre parenthèses. 89

Tableau 3.3 – Paramètres matériaux utilisés pour le ménisque dans la simulation éléments finis..... 90

Table 3.4 – Grading system used to quantify the meniscus and articular cartilage degradation as well as osteophyte formation (Lavery et al., 2010). 94

Table 3.5 – Grading score of meniscus and cartilage degradation, as well as osteophyte formation, for the healthy, contralateral and operated groups. * denotes a significant difference from the healthy group. 99

Tableau 3.6 – Microscopic scores for tie fibre organization and values of GAG coverage (%) in each region of medial menisci in healthy and operated knees. Values are given as the means (std). * corresponds to a significant difference between the healthy and operated groups.... 103

Tableau 3.7 – Ratios entre les modules instantanés, modules à l'équilibre et fractions à l'élastiques entre les ménisques opérés et controlatéraux, dans chaque région. * représente un ratio significativement différent de 1 ($p < 0.05$). 109

Tableau 4.1 – Chronologie des interventions effectuées sur chacun des groupes. LCA : ligament croisé antérieur. 117

Table 4.2 – Grading system used to quantify the meniscus and articular cartilage degradation as well as osteophyte formation (Lavery et al., 2010). 120

Table 4.3 – Grading score of meniscus and cartilage degradation, as well as osteophyte formation, in the medial compartment of the healthy, operated non treated and operated treated knees. * denotes a significant difference from the operated treated group. 124

Table 4.4 – Microscopic scores for tie fibers in each region of medial menisci from healthy, operated non treated and operated treated knees. Values are given as the means ± std. * denotes a significant difference from the operated treated group. 128

INTRODUCTION GENERALE

L'arthrose est une maladie dégénérative classée parmi les dix affections les plus invalidantes par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Actuellement, l'arthrose symptomatique touche environ 10% des hommes et 18% des femmes dans le monde après 60 ans, dont 30% au niveau du genou (Fautrel *et al.*, 2005), et sa prévalence augmente chaque année (OMS). Il n'existe toujours pas de traitements permettant de retrouver une articulation saine ; les thérapies actuelles visent à soigner les symptômes et non la pathologie elle-même. L'arthrose est donc un véritable problème de santé publique et son coût en France a été évalué à 1,6 milliards d'euros annuels en 2005, soit 1,7% des dépenses de santé (Le Pen *et al.*, 2005). Les difficultés pour développer des traitements efficaces s'expliquent principalement par la complexité de cette pathologie et la difficulté à la diagnostiquer.

Une première définition de l'arthrose a été proposée en 1994 par l'OMS et l'American Academy of Orthopaedic Surgeons :

« L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, de développements, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuses conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale».

Cette définition met surtout en avant les modifications subies par l'os et le cartilage, qui sont les marqueurs d'arthrose dans la plupart des outils de diagnostic actuels et ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières décennies. Pourtant, ce ne sont pas les seuls tissus de l'articulation du genou touchés par l'arthrose (Hunter et Felson, 2006a ; Kuyinu *et al.*, 2016). En particulier, dans le cas d'arthrose post-traumatique, les ménisques présentent souvent des lésions (Killian *et al.*, 2010b). Jusqu'en 1970, ces lésions méniscales étaient majoritairement traitées par une ménisectomie totale, qui était alors considérée comme bénigne (McDermott et Amis, 2006 ; Papalia *et al.*, 2011 ; Fox *et al.*, 2015). Des études ont ensuite montré que les ménisques étaient essentiels pour le bon fonctionnement du genou et donc que cette intervention chirurgicale contribuait largement au développement de la pathologie (Fukubayashi *et al.*, 1980 ; Ihn *et al.*, 1993 ; Baratz *et al.*, 1986).

Dans une articulation saine, les ménisques du genou assurent plusieurs fonctions. Ces deux fibrocartilages, situés entre le fémur et le tibia (figure 0.1), transmettent et répartissent plus de 50% des efforts, assurent la congruence entre les surfaces articulaires, absorbent les chocs et contribuent à limiter les frottements au sein de l'articulation (Makris *et al.*, 2011).

Pour assurer ces fonctions, ils possèdent un comportement mécanique complexe, très hétérogène et anisotrope, principalement gouverné par leur matrice extracellulaire (Danso *et al.*, 2015; Tissakht and Ahmed, 1995). En cas d'arthrose, les composants de la matrice, en particulier le collagène et les glycosaminoglycanes (GAGs), subissent de fortes modifications au niveau de leur quantité, de leur distribution et de leur organisation (Herwig *et al.*, 1984 ; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a ; Katsuragawa *et al.*, 2010 ; Mine *et al.*, 2013 ; Pauli *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2012). La chronologie de tous ces changements ainsi que leurs conséquences sur les propriétés mécaniques des ménisques n'ont fait l'objet que de très peu d'études et ne sont donc pas encore clairement déterminées. La compréhension de ces mécanismes d'altérations est primordiale pour diagnostiquer l'arthrose et développer des traitements efficaces, et nécessite une analyse des propriétés des ménisques à un stade précoce du développement de l'arthrose, en utilisant des modèles animaux.

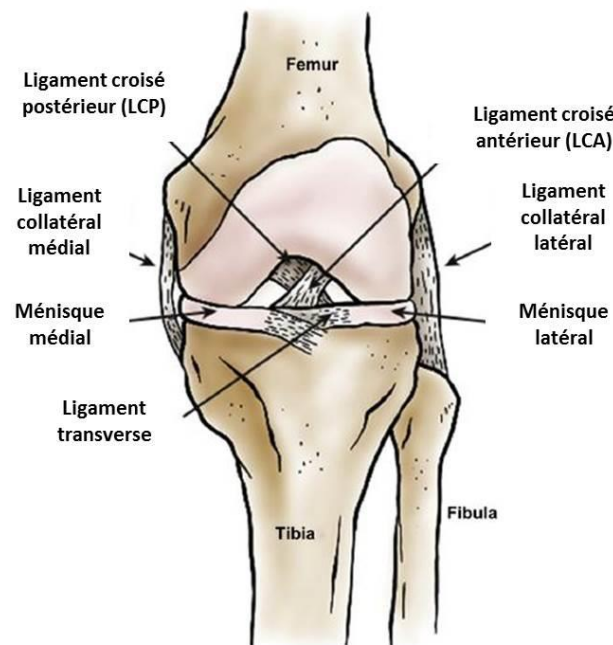


Figure 0.1 – Représentation schématique d'une vue antérieure d'un genou gauche sain humain (Makris *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est de caractériser les propriétés morphologiques, microstructurales et mécaniques de ménisques sains et arthrosiques à un stade précoce de développement de l'arthrose post-traumatique, afin de mieux comprendre les relations existant entre les modifications de toutes ces propriétés. Le modèle animal choisi est la rupture du ligament croisé antérieur (LCA) chez le lapin. Un intérêt particulier sera porté à l'étude de l'hétérogénéité et de l'anisotropie des propriétés mécaniques des ménisques dans le cas sain et arthrosique. De plus, nous nous intéresserons à l'effet d'une thérapie de viscosupplémentation, l'un des traitements couramment utilisés dans le cas d'arthrose symptomatique, sur les propriétés des ménisques.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres. Le chapitre 1 consiste en une étude bibliographique sur les fonctions et les propriétés anatomiques, biochimiques,

microstructurales et mécaniques des ménisques sains, ainsi que sur l'arthrose du genou, ses effets connus sur les ménisques et ses traitements actuels.

Le chapitre 2 présente une étude préliminaire visant à identifier les principaux changements de propriétés des ménisques engendrés par l'arthrose à un stade précoce, dans plusieurs sites anatomiques (médial, latéral), régions (antérieure, postérieure) et directions de sollicitation (circonférentielle, verticale). Dans ce chapitre, les propriétés mécaniques des ménisques seront déterminées par des essais d'indentation, en utilisant un modèle mécanique simplifié. De plus, la structure secondaire du collagène, l'organisation des fibres de collagène dans la couche centrale et la quantité de GAGs seront analysées respectivement par microspectroscopie Raman, par microscopie confocale biphotonique et par histologie. Cette étude permettra de sélectionner les techniques de caractérisation et la direction de sollicitation les plus pertinentes pour une étude plus approfondie et de déterminer le site et la région les plus touchés par l'arthrose.

Le chapitre 3 a pour objectifs d'analyser les modifications des propriétés viscoélastiques des ménisques engendrées par l'arthrose et de les relier aux changements microstructuraux et morphologiques. Dans une première partie, nous présenterons le modèle viscoélastique utilisé. Dans une deuxième partie, nous caractériserons expérimentalement les propriétés viscoélastiques des ménisques sains et arthrosiques, l'organisation des fibres de collagène dans toute l'épaisseur des ménisques et la quantité de GAGs. Enfin, dans une troisième partie, nous discuterons de l'importance d'une référence saine pour cette étude.

Dans le chapitre 4, nous évaluerons l'effet d'une thérapie de viscosupplémentation commerciale sur les propriétés des ménisques, à partir du protocole expérimental décrit dans le chapitre 3. Les propriétés morphologiques, microstructurales et mécaniques des ménisques seront comparées entre les trois groupes de lapins : sains, arthrosiques non traités et arthrosiques traités.

Enfin, nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale sur ce travail de thèse et les perspectives qu'il apporte pour de futures études.

CHAPITRE 1 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction du chapitre

Les ménisques ont un rôle essentiel dans la transmission et la répartition des efforts au sein du genou, dans l'absorption des chocs, dans la stabilisation de l'articulation et dans la limitation des frottements entre les différentes surfaces articulaires (Makris *et al.*, 2011). Pour assurer toutes leurs fonctions, ils possèdent une géométrie, une composition, une microstructure et des propriétés mécaniques complexes et très hétérogènes. L'arthrose altère leurs caractéristiques et ils ne peuvent donc plus assurer leurs fonctions efficacement. Cela a un effet négatif sur les propriétés des tissus environnants (cartilage, os sous-chondral), favorisant la progression de la pathologie.

Dans une première partie, nous présenterons les propriétés anatomiques, biochimiques, microstructurales et mécaniques des ménisques sains, ainsi que leurs fonctions. Dans une deuxième partie, nous nous intéresserons à l'arthrose du genou, et plus particulièrement aux modifications qu'elle implique sur les ménisques, ainsi qu'à ses traitements actuels.

1. Les ménisques du genou sain

1.1 Anatomie, composition et structure des ménisques

1.1.1 Anatomie

Les ménisques du genou sont deux fibrocartilages en forme de croissant, quasiment triangulaires à la coupe, situés entre le tibia et le fémur (figure 1.1) (McDermott *et al.*, 2008). Ils sont blancs, brillants et ont une surface plutôt lisse (Ghadially *et al.*, 1978 ; Makris *et al.*, 2011). On distingue deux sites anatomiques : le ménisque médial se situe à l'intérieur du genou, tandis que le ménisque latéral se situe à l'extérieur du genou (figure 1.1A). Les cornes antérieures des ménisques médial et latéral sont reliées entre elles par le ligament transverse (figure 1.1B) (Goldblatt et Richmond, 2003).

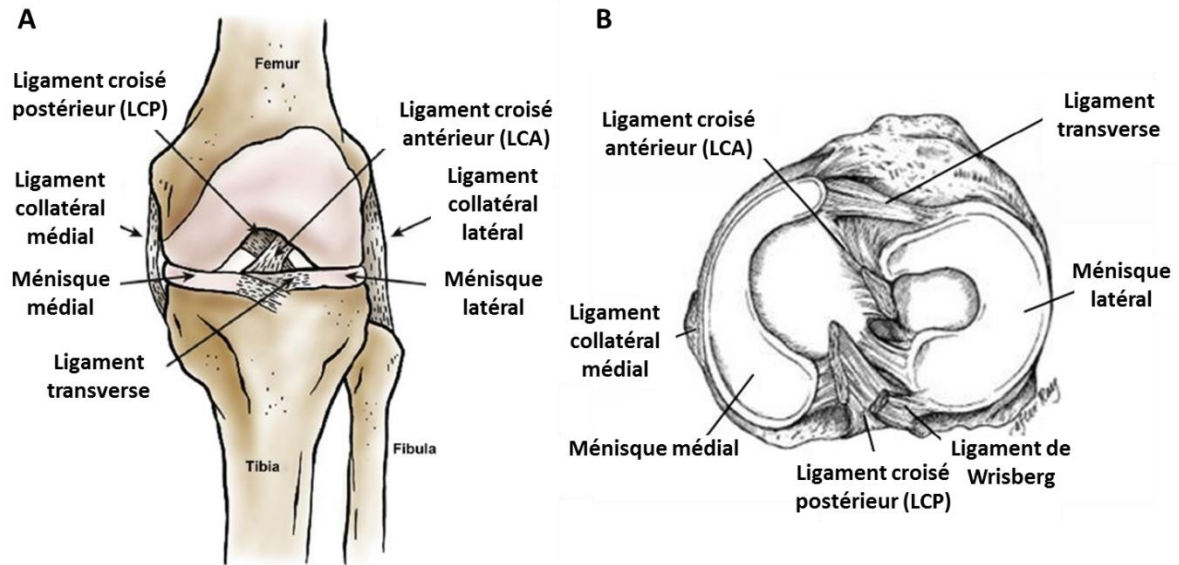


Figure 1.1 - A) Vue antérieure du genou gauche (Makris et al., 2011) et B) Vue supérieure du plateau tibial du genou droit (Fox et al., 2012).

Des différences existent entre les deux sites anatomiques, médial et latéral. En effet, même si les deux ménisques sont similaires d'un point de vue histologique, leur forme, leurs dimensions, leurs attaches et leur mobilité sur le plateau tibial sont différentes (figure 1.1B). Le tableau 1.1 résume les principales caractéristiques de ces ménisques chez l'homme, en termes de forme (Goldblatt et Richmond, 2003), de longueur (McDermott *et al.*, 2004), de largeur (McDermott *et al.*, 2004), d'épaisseur (Bloecker *et al.*, 2012), d'attaches (Goldblatt et Richmond, 2003), de surface de tibia recouverte (Bloecker *et al.*, 2012) et de mobilité sur le plateau tibial (Messner et Gao, 1998).

	Ménisque médial	Ménisque latéral
Forme	Semi - circulaire	Quasi circulaire
Longueur (mm)	45,7 ± 5,0	35,7 ± 3,7
Largeur (mm)	27,4 ± 2,5	29,3 ± 3,0
Epaisseur moyenne (mm)	2,82 ± 0,29	2,67 ± 0,26
Epaisseur corne antérieure (mm)	2,41 ± 0,92	2,42 ± 0,33
Epaisseur corne postérieure (mm)	3,11 ± 0,38	2,88 ± 0,35
Attaches des cornes antérieure et postérieure sur le tibia	De part et d'autre du LCA et du LCP	Proches du LCA
Attache sur le fémur	Pas d'attache	Corne postérieure
Attache sur la capsule articulaire	En périphérie	Pas d'attache
Surface du tibia couverte par le ménisque (%)	49,8 ± 5,5	58,6 ± 6,8
Mobilité : déplacement ant-pos sur le plateau tibial (% par rapport à la longueur du plateau tibial)	Environ 5 mm (10%)	Environ 10 mm (23%)

Tableau 1.1 – Caractéristiques géométriques et anatomiques des ménisques médial et latéral humains. LCA : Ligament croisé antérieur ; LCP : Ligament croisé postérieur ; ant-pos : antérieur-postérieur.

Les ménisques sont des tissus complexes et très hétérogènes, puisque leur composition, leur structure, leur innervation et leur vascularisation, dépendent de la localisation. Ainsi, le ménisque est généralement divisé de cette façon (figure 1.2) :

- **Trois régions** : antérieure, centrale, postérieure ;
- **Trois zones** : externe, centrale, interne ;
- **Trois couches** : superficielle fémorale, centrale, superficielle tibiale.

Leurs caractéristiques ont été étudiées dans le ménisque sain et sont détaillées dans la suite du chapitre.

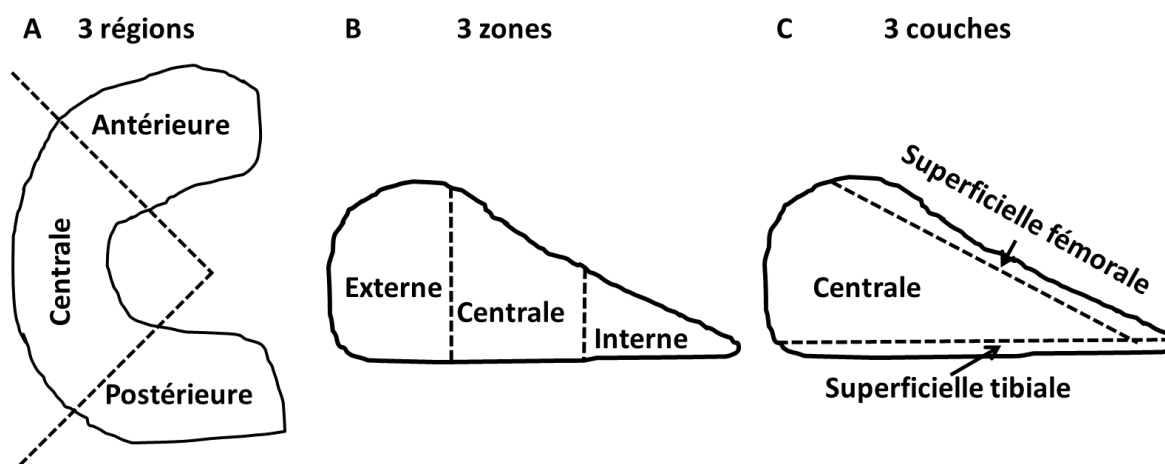


Figure 1.2 – Division schématique du ménisque en A) trois régions (antérieure, centrale, postérieure), B) trois zones (externe, centrale, interne) et C) trois couches (superficielle fémorale, centrale, superficielle tibiale). A) Vue supérieure d'un ménisque médial droit. B) et C) Vues en coupes.

1.1.2 Vascularisation et innervation

Alors qu'à la naissance, les ménisques humains contiennent des vaisseaux sanguins dans toutes les zones, ils deviennent très peu vascularisés et très peu innervés au cours de la croissance (Petersen et Tillmann, 1995). A l'âge adulte, les ménisques médial et latéral contiennent des vaisseaux sanguins et des nerfs principalement dans la zone externe, sur une zone représentant environ 10 à 30% du tissu, appelée la zone rouge-rouge (figure 1.3) (Arnoczky et Warren, 1982 ; Petersen et Tillmann, 1995). La zone interne et une partie de la zone centrale, qui représentent 65 à 75% du tissu, sont regroupées sous l'appellation « zone blanc – blanc ». Elles ne sont pas vascularisées et sont très peu innervées. Une zone intermédiaire, appelée zone blanc – rouge, est située entre la zone rouge – rouge et la zone blanc – blanc. La vascularisation étant indispensable au processus de cicatrisation, la zone interne est donc exposée à des lésions post-traumatiques et dégénératives permanentes (Arnoczky et Warren, 1983).

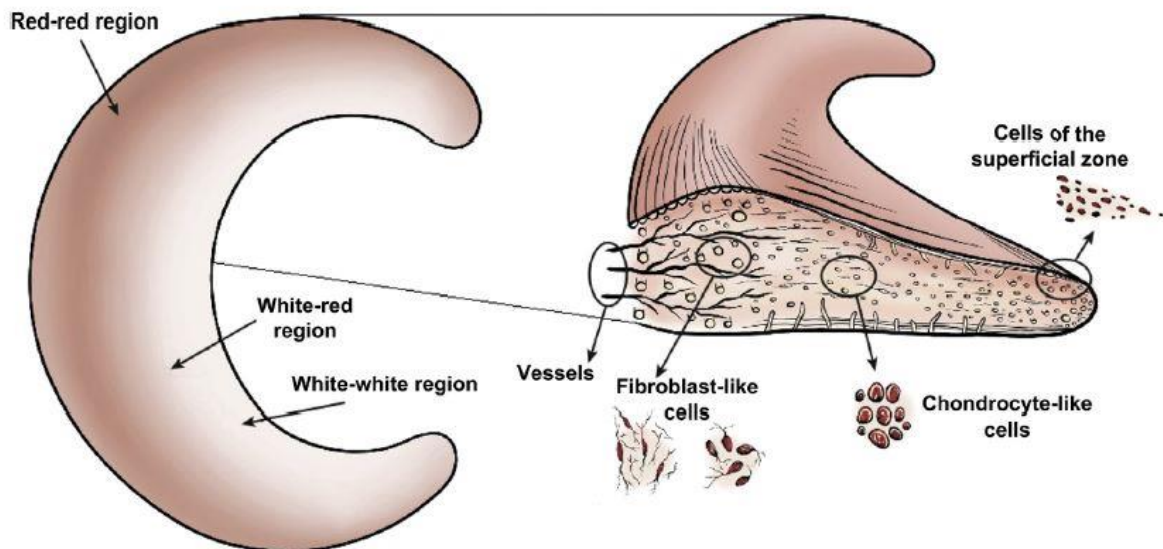


Figure 1.3 – Schématisation de la vascularisation et du type de cellules dans le ménisque, selon les zones (Makris *et al.*, 2011).

1.1.3 Matrice extracellulaire

Le ménisque est un tissu très hydraté, puisque l'eau représente 72% de sa masse totale (Herwig, 1984). Les 28% restants consistent en une matière organique, comprenant des cellules et la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire contient une partie fibrillaire, composée principalement de collagène, et une partie non fibrillaire, composée principalement de protéoglycanes (PGs) (Nakano *et al.*, 1997). Dans la zone interne (figure 1.2), elle est composée d'environ 75% de fibres de collagène et 8% de PGs. Dans la zone externe (figure 1.2), ces proportions sont respectivement de 93% et 2%. Les ménisques contiennent également des glycosaminoglycanes (GAGs) libres, c'est-à-dire non reliés à une protéine, des protéines non collagéniques et des glycoprotéines, en faibles quantités. Ces proportions

peuvent varier en fonction de l'âge, de la localisation dans le tissu et des éventuelles pathologies (Sweigart et Athanasiou, 2001).

1.1.3.1 Types de collagène et orientation des fibres

Le collagène est la protéine la plus abondante du corps humain (Wenger *et al.*, 2007). Plusieurs types de collagènes sont présents dans le ménisque, les types I et II étant prédominants. Le collagène de type I se retrouve également dans l'os, tandis que le type II se retrouve dans le cartilage hyalin. Leurs proportions dépendent de la zone du ménisque, de l'espèce et de l'âge (Melrose *et al.*, 2005 ; Chevrier *et al.*, 2009). Le collagène de type I se trouve dans tout le ménisque (Kambic et McDevitt, 2005 ; Chevrier *et al.*, 2009 ; Killian *et al.*, 2010a ; Vanderploeg *et al.*, 2012), quel que soit l'âge (Melrose *et al.*, 2005). Melrose *et al.* (2005) ont montré sur des brebis que le collagène de type II était d'abord localisé dans les zones interne et centrale du ménisque (zone blanc – blanc), puis s'étendait vers la zone externe au cours de la croissance. Cette prédominance du collagène de type II dans la zone non vascularisée a également été montrée pour les ménisques humains (Chevrier *et al.*, 2009), de lapin (Chevrier *et al.*, 2009), de chien (Kambic et McDevitt, 2005) et de bœuf (Cheung, 1987). En effet, la zone externe des ménisques de bœuf contient du collagène de type I à environ 99%, tandis que les zones internes et centrales contiennent 40% de type I et 60% de type II (Cheung, 1987). Les zones interne et centrale ont donc une structure proche de celle du cartilage hyalin, qui contient principalement du collagène de type II.

Cependant, contrairement au cartilage hyalin, les fibres de collagène du ménisque forment un réseau très organisé (Kambic et McDevitt, 2005). Elles sont orientées différemment sur l'épaisseur du ménisque (Bullough *et al.*, 1970 ; Aspden *et al.*, 1985 ; Chevrier *et al.*, 2009 ; Andrews *et al.*, 2014), avec deux couches superficielles et une couche centrale (Petersen et Tillmann, 1998 ; Vanderploeg *et al.*, 2012) (figure 1.4).

Couches superficielles

Au niveau de la surface, on trouve une première couche très fine (environ 10 µm), composée de fibres orientées aléatoirement. Juste en dessous de cette couche, la couche lamellaire est également constituée de fibres orientées aléatoirement, sauf en périphérie où elles sont dans la direction radiale.

Ces couches superficielles ont une épaisseur globale d'environ 100 – 200 µm chez l'homme (Aspden *et al.*, 1985 ; Petersen et Tillmann, 1998).

Couche centrale

La couche centrale est constituée de fibres circonférentielles, organisées en torons compacts. Ces fibres circonférentielles sont principalement impliquées dans la résistance en traction (Bullough *et al.*, 1970). Elles sont liées entre elles par quelques fibres radiales, émanant des couches superficielles tibiale et fémorale, qui résistent à la séparation des torons (Bullough *et al.*, 1970 ; Petersen et Tillmann, 1998 ; Rattner *et al.*, 2011 ; Andrews *et al.*, 2014) et améliorent la résistance en tension du ménisque (Skaggs *et al.*, 1994). La figure 1.5

montre l'organisation de ces fibres liantes par rapport aux couches superficielles (Andrews *et al.*, 2014).

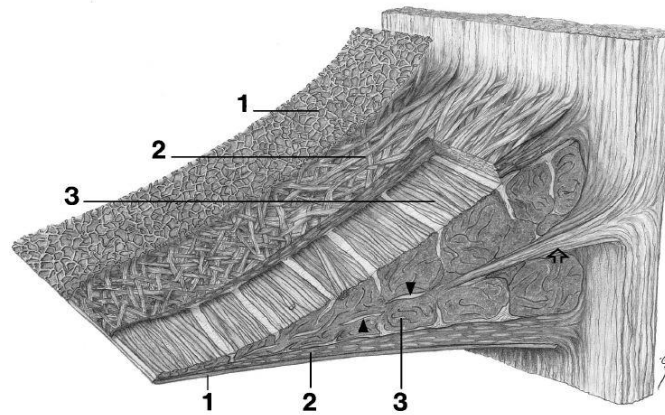


Figure 1.4 – Architecture des fibres de collagène dans le ménisque. 1 : Couche superficielle très fine, 2 : Couche superficielle lamellaire, 3 : Couche centrale (Petersen et Tillmann, 1998). Par la suite, les couches 1 et 2 seront considérées comme une seule couche, appelée couche superficielle (tibiale ou fémorale) du ménisque.

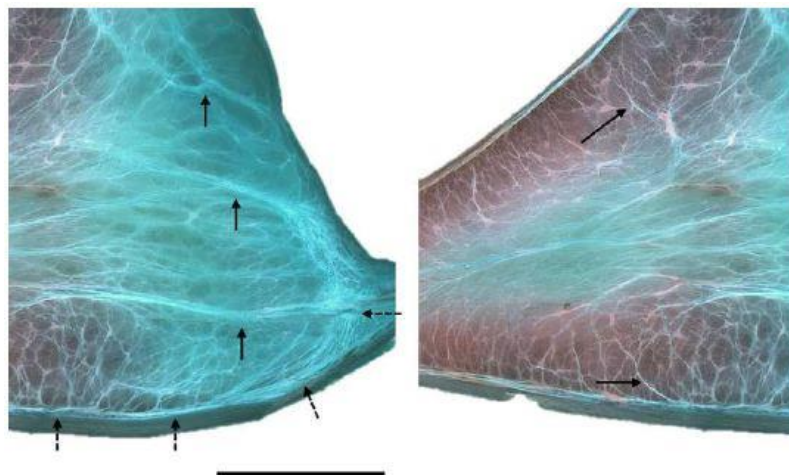


Figure 1.5 – Coupes histologiques d'un ménisque de bœuf, montrant l'organisation des fibres liantes (flèches pleines). Les flèches en pointillés montrent les fibres radiales de la couche superficielle se prolongeant dans la couche centrale. Barre d'échelle : 5 mm (Andrews *et al.*, 2014).

1.1.3.2 Protéoglycanes et glycosaminoglycanes

Les PGs sont la combinaison d'une protéine et d'un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAGs), attachés de façon covalente (Lohmander, 1988). Il existe deux types de PGs : les longs, dont le principal est l'aggrécane, et les petits, dont les principaux sont la biglycane et la décorine (Nakano *et al.*, 1997 ; Scott *et al.*, 1997 ; Kavanagh et Ashhurst, 2001 ; Vanderploeg *et al.*, 2012). Les GAGs sulfatés sont des chaînes de sucres chargées négativement qui adhèrent aux protéines et attirent des molécules d'eau (Killian *et al.*, 2010a). Les principaux GAGs présents dans le ménisque sont les chondroïtin-6-sulfate (60%), dermatane sulfate (20-

30%), chondroïtin-4-sulfate (10-20%) et kératane sulfate (15%) (Adams et Muir, 1981 ; Herwig *et al.*, 1984). Les ménisques contiennent également de l'acide hyaluronique, qui est un GAG non sulfaté et libre (Adams et Muir, 1981 ; Herwig *et al.*, 1984 ; Nakano *et al.*, 1997).

Une grande variabilité dans la concentration de GAGs est observée selon les régions et zones des ménisques. Chez l'homme (Sweigart *et al.*, 2004a) et chez plusieurs espèces animales (Nakano *et al.*, 1997 ; Sweigart *et al.*, 2004a ; Killian *et al.*, 2010a), les ménisques médiaux contiennent plus de GAGs sulfatés dans la zone interne que dans la zone externe. De plus, dans les ménisques de lapin, leur concentration est plus élevée dans la région antérieure du ménisque médial (Killian *et al.*, 2010a).

Les rôles exacts des GAGs et PGs dans le ménisque ne sont pas encore clairement déterminés; ils seraient impliqués dans la résistance en compression, permettraient le glissement et la réorganisation des fibres de collagène, la liaison des facteurs de croissance et les interactions entre les cellules et la matrice (Nakano *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1997 ; Vanderploeg *et al.*, 2012). De plus, Sanchez-Adams *et al.* (2011) ont montré une baisse de la viscosité des ménisques après suppression des GAGs, dans toutes les zones.

1.1.4 Cellules

Les cellules du ménisque peuvent être classées en trois catégories, selon leur forme et l'association ou non avec la matrice extracellulaire (Ghadially *et al.*, 1983). La figure 1.3 représente la répartition des cellules et de la vascularisation selon la zone du ménisque (Makris *et al.*, 2011). Les fibrochondrocytes sont des cellules rondes ou ovales, similaires aux chondrocytes du cartilage, et se situent dans les zones interne et centrale du ménisque, qui sont non vascularisées (Ghadially *et al.*, 1983 ; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001c ; Verdonk *et al.*, 2005). Elles sont associées à la matrice et synthétisent le collagène de type I fibreux en grande quantité, et le collagène de type II ainsi que l'aggrécane en quantités plus faibles (Van der Bracht *et al.*, 2007). La zone externe du ménisque, qui est vascularisée, contient des cellules analogues aux fibroblastes (Ghadially *et al.*, 1983 ; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001c ; Verdonk *et al.*, 2005). Ces cellules sont fusiformes et ne synthétisent pas de matrice extracellulaire. Enfin, les couches superficielles, la zone externe ainsi que la subintima (couche fibreuse de la membrane synoviale, connectée à la zone vascularisée du ménisque), contiennent des cellules CD34+ (Ghadially *et al.*, 1983 ; Verdonk *et al.*, 2005). Ces cellules ont la morphologie des fibroblastes et sont supposées être impliquée dans la régénération du ménisque (Van der Bracht *et al.*, 2007).

1.2 Fonctions des ménisques dans l'articulation du genou

Les ménisques ont plusieurs fonctions au sein de l'articulation : ils sont impliqués dans la répartition des efforts, la stabilisation du genou, l'absorption des chocs et la limitation des frottements. Ces fonctions peuvent être remplies grâce à la forme des ménisques, leurs attaches, leurs constituants et leur comportement mécanique complexe.

1.2.1 Répartition des efforts

Au cours d'une activité normale, les forces transmises au niveau du genou varient entre 2 et 4 fois le poids du corps (Morrison, 1970 ; Mündermann *et al.*, 2008 ; Kutzner *et al.*, 2010 ; D'Lima *et al.*, 2012). L'une des principales fonctions des ménisques est donc de supporter et répartir ces efforts au sein de l'articulation (Seedhom et Hargreaves, 1979 ; Allen *et al.*, 1995 ; Fukuda *et al.*, 2000). Ainsi, en extension, jusqu'à 50% de l'effort axial est transmis par les ménisques (Walker et Erkman, 1975). En flexion, les ménisques médial et latéral transmettent respectivement 50% et 100% de l'effort axial.

Lorsqu'un effort tibiofémoral axial est appliqué au niveau du genou, les ménisques sont comprimés (Sweigart *et al.*, 2001). Leur section triangulaire et leurs attaches antérieure et postérieure permettent de convertir cet effort vertical de compression en contraintes circonférentielles de traction, et ainsi déformer les ménisques dans la direction radiale (figure 1.6) (Allen *et al.*, 1995). La zone interne du ménisque est principalement sollicitée en compression, tandis que la zone externe est principalement sollicitée en traction. Pour résister à ces contraintes de traction, les fibres de collagène s'étirent et glissent les unes par rapport aux autres (Bullough *et al.*, 1970 ; Allen *et al.*, 1995 ; Petersen et Tillmann, 1998 ; Andrews *et al.*, 2013).

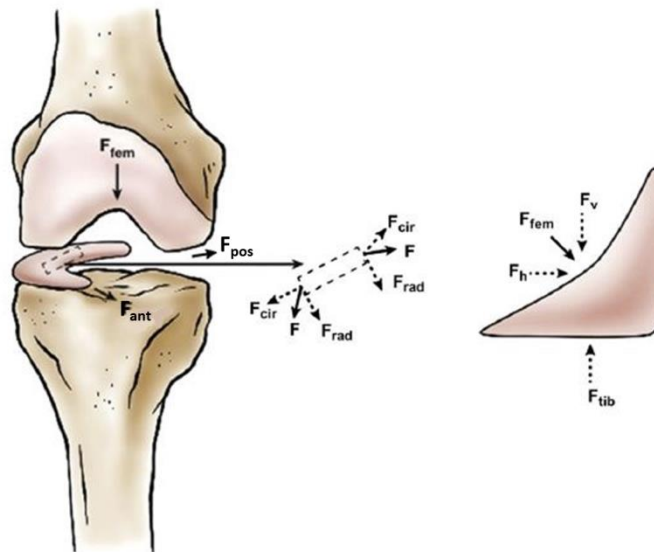


Figure 1.6 – Conversion de l'effort axial de compression en contraintes circonférentielles de traction au sein du ménisque. F_{fem} : force transmise par le fémur, F_{tib} : force transmise par le tibia, F_{ant} : force transmise par l'attache antérieure, F_{pos} : force transmise par l'attache postérieure, F_{circ} : force dans la direction circonférentielle, F_{rad} : force dans la direction radiale, F_v : force dans la direction verticale, F_h : force dans la direction horizontale (Makris *et al.*, 2011).

1.2.2 Congruence et stabilisation

Les surfaces articulaires entre le fémur et le tibia sont incongruentes : les condyles fémoraux sont convexes et s'articulent sur le plateau tibial, relativement plat. La surface

fémorale concave du ménisque s'adapte donc parfaitement à la forme des condyles et améliore la congruence entre les deux surfaces articulaires (Allen *et al.*, 1995).

Le rôle du ménisque dans la stabilisation du genou apparaît notamment lorsque l'un des ligaments est déficient (Goldblatt et Richmond, 2003). En effet, en l'absence du LCA, le ménisque doit s'opposer à la translation antérieure du tibia par rapport au fémur, principalement au niveau de sa région postérieure (figure 1.7) (Kawamura *et al.*, 2003 ; Fox *et al.*, 2012). Le ménisque médial doit alors résister à des efforts tibiaux quasiment 3 fois supérieurs à ceux mesurés dans le cas d'un LCA intact (Allen *et al.*, 1999). Ainsi, une méniscectomie altère cette fonction de stabilisation et a pour effet d'augmenter jusqu'à 58% la translation du tibia vers l'avant lors de la flexion, diminuant considérablement la stabilité du genou (Goldblatt et Richmond, 2003).

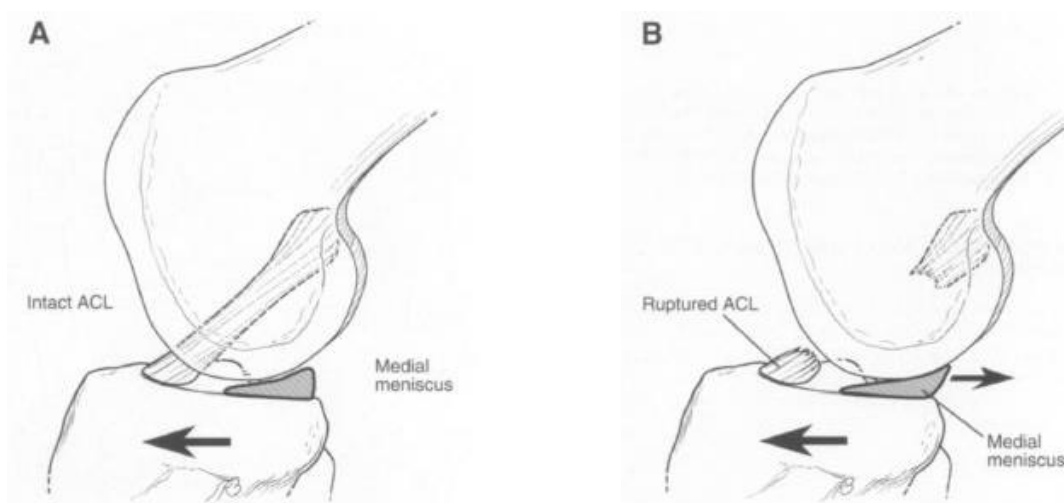


Figure 1.7 – Rôle du ménisque dans la stabilisation dans le cas A : d'un LCA intact et B : d'une rupture du LCA (Kawamura *et al.*, 2003).

1.2.3 Absorption des chocs

Lors de l'impact du talon sur le sol au cours de la marche, l'accélération au niveau du tibia a une amplitude allant jusqu'à 5g (Light *et al.*, 1980). Il est donc nécessaire d'absorber les chocs pour réduire les forces et l'énergie transmises au système osseux, et ainsi avoir un mécanisme de protection de la tête et du système vestibulaire (système sensoriel principal de la perception du mouvement). Le ménisque peut être vu comme un milieu biphasique, avec une phase fluide constituée d'eau et une phase solide constituée de collagène, de GAGs et des protéines de la matrice. Les propriétés viscoélastiques induites par cette structure lui permettent d'absorber les chocs au sein de l'articulation et ainsi de diminuer les vibrations au niveau du fémur et de la tête durant la marche d'environ 20% (Voloshin et Wosk, 1983). Cependant, le rôle du ménisque dans l'absorption des chocs est controversé ; il serait négligeable par rapport au rôle des muscles (Andrews *et al.*, 2011).

1.2.4 Limitation des frottements

Les ménisques contribuent à la limitation des frottements au niveau des différentes surfaces articulaires, notamment par l'écoulement d'eau au cours de la compression (Makris *et al.*, 2011). De plus, les fibrochondrocytes expriment des gènes Protéoglycane 4 (PRG4), codant pour la lubricine, une protéine également présente dans le liquide synovial et le cartilage et ayant des propriétés de lubrification limite (Schumacher *et al.*, 2005). Ce mécanisme de lubrification limite permet de réduire le coefficient de frottement entre deux surfaces lorsque celles-ci entrent en contact au niveau moléculaire. La lubricine se situe au niveau de la surface des ménisques et entre les fibres de collagène, pour faciliter leur glissement. En l'absence de ménisque, le coefficient de frottement augmente d'environ 20% entre les surfaces cartilagineuses du tibia et du fémur (Allen *et al.*, 1995).

1.3 Comportement mécanique des ménisques

Le comportement mécanique des ménisques sains a été caractérisé dans plusieurs études, chez l'homme ou chez l'animal, dans les différents sites anatomiques et régions, zones et couches méniscales, dans différentes directions de sollicitation. Plusieurs études caractérisent et modélisent en première approximation le ménisque par un comportement homogène, isotrope, élastique, linéaire (Pena *et al.*, 2006 ; Kwok *et al.*, 2014), mais ses propriétés et son comportement mécaniques sont beaucoup plus complexes.

1.3.1 Propriétés mécaniques différentes selon la sollicitation

Différents essais ont été effectués dans la littérature pour caractériser les propriétés mécaniques du ménisque. Les principaux sont la traction, la compression non confinée, la compression confinée et l'indentation. Ces tests donnent accès à des paramètres mécaniques différents.

La traction et la compression non confinée permettent de déterminer les propriétés mécaniques globales d'un matériau, respectivement en tension et en compression.

La compression confinée consiste à placer l'échantillon dans une chambre dont les parois sont rigides et imperméables et à le comprimer avec un filtre poreux (figure 1.8) (Lu et Mow, 2008). Ainsi, l'eau s'échappe par les pores au cours du test et les propriétés mécaniques globales en compression de la phase solide du matériau sont déterminées, telles que l'*aggregate modulus*, qui représente la rigidité du matériau lorsque toute l'eau s'est échappée.

Enfin, l'indentation consiste à enfoncer une pointe, de géométrie connue, dans un matériau. Les propriétés mécaniques locales du matériau sont alors déterminées. Cette technique, qui a été utilisée dans ces travaux de thèse, sera détaillée dans les chapitres 2 et 3. Sur le même principe que la compression confinée, les propriétés mécaniques de la phase solide peuvent être déterminées en utilisant un indenteur poreux, mais localement et non globalement. Tous ces tests sont unidirectionnels et permettent d'accéder aux propriétés mécaniques dans la direction de sollicitation.

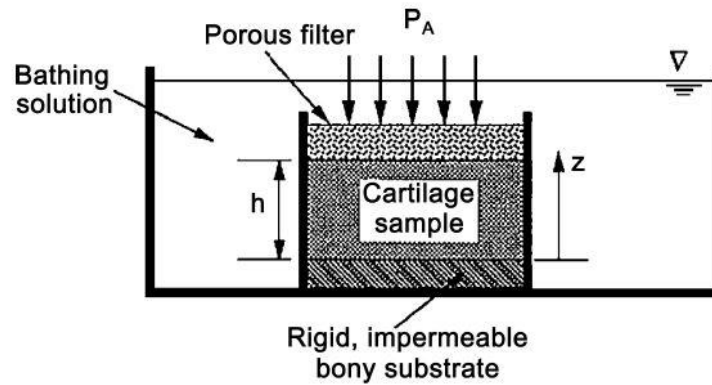


Figure 1.8 – Principe de la compression confinée dans le cas du cartilage. L'échantillon est placé dans une chambre dont les parois sont rigides et imperméables. Il est comprimé avec un filtre poreux, sur lequel s'applique une pression P_A (Lu et Mow, 2008).

Les études effectuées ont montré que les propriétés mécaniques du ménisque étaient différentes en traction et en compression. En effet, dans la région antérieure des ménisques humains, le module de Young radial est de l'ordre de 10 MPa en traction (Tissakht et Ahmed, 1995), alors qu'il est de l'ordre de 0,1 MPa en compression (Chia et Hull, 2008).

1.3.2 Comportement viscoélastique

Plusieurs études ont montré que le ménisque avait un comportement viscoélastique (Sweigart *et al.*, 2004b ; Chia et Hull, 2008 ; Katsuragawa *et al.*, 2010 ; Sanchez-Adams *et al.*, 2011 ; Baro *et al.*, 2012 ; Moyer *et al.*, 2012 et 2013 ; Seitz *et al.*, 2013 ; Pereira *et al.*, 2014 ; Abdelgaied *et al.*, 2015 ; Danso *et al.*, 2015 ; Lakes *et al.*, 2015). En effet, la rigidité du ménisque augmente lorsque la vitesse de déformation augmente (Baro *et al.*, 2012), s'expliquant par une décroissance du module au cours du temps. Ce comportement viscoélastique est causé par l'interaction entre la phase solide et la phase fluide du ménisque, avec à la fois la mise en pression du fluide, l'écoulement du fluide et la déformation de la matrice (Seitz *et al.*, 2013). Cette nature viscoélastique du comportement rend difficile toute comparaison entre les valeurs de modules obtenues à partir de tests effectués à des vitesses différentes.

Le comportement viscoélastique du ménisque a été caractérisé soit en utilisant des modèles phénoménologiques (Sanchez-Adams *et al.*, 2011 ; Moyer *et al.*, 2012 et 2013), soit à partir de la théorie biphasique (LeRoux *et al.*, 2002 ; Sweigart *et al.*, 2004b ; Katsuragawa *et al.*, 2010 ; Seitz *et al.*, 2013 ; Abdelgaied *et al.*, 2015 ; Danso *et al.*, 2015).

Modèles phénoménologiques

Les modèles phénoménologiques consistent à représenter le matériau par un ensemble de ressorts et amortisseurs, qui caractérisent respectivement l'élasticité et la viscosité du tissu (Chen *et al.*, 2012). L'un de ces modèles sera détaillé dans le chapitre 3. Il est ensuite possible de déterminer le module instantané, caractérisant la rigidité du matériau pour des fortes vitesses de déformation, ainsi que le module à l'équilibre, caractérisant la rigidité du matériau

pour des faibles vitesses de déformation (quasistatique) (Chia et Hull, 2008 ; Sanchez-Adams *et al.*, 2011 ; Baro *et al.*, 2012 ; Moyer *et al.*, 2012 et 2013 ; Danso *et al.*, 2015 ; Lakes *et al.*, 2015). Chez l’homme, en compression, le module instantané moyen du ménisque médial est de l’ordre de 1 MPa, alors que le module à l’équilibre moyen est de l’ordre de 0,15 MPa (Chia et Hull, 2008 ; Danso *et al.*, 2015).

Théorie biphasique

La théorie biphasique consiste à modéliser le matériau par une phase solide et une phase fluide non visqueuse intrinsèquement incompressible (Suh et Spilker, 1994). L’effet de la viscosité est incorporé par l’intermédiaire d’une force de diffusion entre les deux phases.

1.3.3 Comportement mécanique non linéaire

Le comportement mécanique du ménisque est non linéaire, puisque son module augmente quand la déformation du matériau augmente (Leslie *et al.*, 2000 ; Chia et Hull, 2008 ; Danso *et al.*, 2014 ; Peloquin *et al.*, 2016). Cela s’explique par un recrutement séquentiel des fibres de collagène, qui s’étirent progressivement au cours de la sollicitation (Danso *et al.*, 2014 et 2015 ; Peloquin *et al.*, 2016). Il est donc difficile de comparer les valeurs de modules obtenues pour des déformations différentes. Par exemple, Chia et Hull ont effectué des essais de compression non confinée sur des ménisques humains et ont obtenu un module à l’équilibre environ 3 fois plus élevé après 12% de déformation qu’après 3% de déformation (Chia et Hull, 2008).

Le comportement non linéaire du ménisque a été modélisé en utilisant le modèle de Fung (Leslie et al, 2000 ; Gabrion et al., 2005) ou en utilisant un modèle de recrutement des fibres (Gu et Li, 2011 ; Kasemi et Li, 2014 ; Danso et al., 2014 ; Freutel et al., 2015 ; Peloquin et al., 2016).

Modèle de Fung

Le modèle de Fung est décrit par les équations (1.1) et (1.2).

$$\sigma = A(e^{B\varepsilon} - 1) \quad (1.1)$$

$$E = \frac{d\sigma}{d\varepsilon} = AB e^{B\varepsilon} \quad (1.2)$$

avec σ la contrainte, ε la déformation, A et B des constantes et E le module de Young.

Modèle de recrutement des fibres

Le modèle de recrutement des fibres consiste à distinguer les parties fibrillaire et non fibrillaire de la matrice (Holzapfel et Ogden, 2010). Le comportement de la matrice est alors décrit par une fonction de densité d’énergie.

1.3.4 Comportement mécanique anisotrope

Le ménisque a un comportement mécanique anisotrope, avec un module de Young en tension environ 10 fois plus élevé dans la direction circonférentielle que dans la direction radiale (Tissakht et Ahmed, 1995 ; LeRoux et Setton, 2002 ; Lakes *et al.*, 2015 ; Peloquin *et al.*, 2016). Cela s'explique par l'organisation des fibres de collagène, alignées dans la direction circonférentielle, qui résistent aux efforts de traction (Bullough *et al.*, 1970). Par contre, il n'a pas été observé de différence significative entre le module de Young radial et axial, ni en tension, (LeRoux et Setton, 2002), ni en compression (Chia et Hull, 2008). Le ménisque est donc souvent modélisé avec un comportement isotrope transverse (Haut-Donahue *et al.*, 2002 et 2003 ; Meakin *et al.*, 2003 ; Hao *et al.*, 2007 ; Guess *et al.*, 2010 ; Haemer *et al.*, 2012).

1.3.5 Propriétés mécaniques hétérogènes

Les propriétés mécaniques du ménisque sont très hétérogènes, puisqu'elles dépendent du site anatomique (Danso *et al.*, 2015), de la région (Sweigart *et al.*, 2004b ; Chia et Hull, 2008 ; Baro *et al.*, 2012 ; Danso *et al.*, 2015), de la zone (Sanchez-Adams *et al.*, 2011 et 2013) et de la couche (Proctor *et al.*, 1989 ; Tissakht et Ahmed, 1995 ; Sweigart *et al.*, 2004b ; Baro *et al.*, 2012). Même si les résultats varient selon les espèces et le protocole de test (vitesse et taux de déformation), la plupart des études ont montré que la région antérieure du ménisque médial était entre 1,5 et 4 fois plus rigide en compression que la région postérieure (Sweigart *et al.*, 2004b ; Chia et Hull, 2008 ; Baro *et al.*, 2012 ; Danso *et al.*, 2015). A l'inverse, le ménisque latéral est plus homogène et a une rigidité similaire à la région postérieure du ménisque médial (Danso *et al.*, 2015). En traction, il n'a pas été trouvé de différences significatives entre les modules de chaque région, ni dans le ménisque médial, ni dans le ménisque latéral (Tissakht *et al.*, 1995 ; Lechner *et al.*, 2000).

L'hétérogénéité des propriétés mécaniques selon la couche et la zone varie selon les espèces et les régions (Sweigart *et al.*, 2004b). Chez l'homme, les essais d'indentation n'ont pas montré de différence significative entre les différentes couches, quelle que soit la région (Sweigart *et al.*, 2004b ; Moyer *et al.*, 2012).

1.4 Bilan : relations structure - fonction - propriétés mécaniques des ménisques sains

Cette première partie permet de souligner l'hétérogénéité du ménisque sain, ainsi que les fortes relations existant entre sa composition, sa structure, ses fonctions et ses propriétés mécaniques. La zone interne, qui est soumise à des efforts de compression, a une structure proche de celle du cartilage hyalin, avec une concentration en GAGs plus élevée que celle de la zone externe, et une plus grande quantité de cartilage de type II (tableau 1.2). De plus, cette zone est non vascularisée. A l'inverse, la zone externe, qui est soumise à des efforts de traction, contient principalement du collagène de type I. Cette zone est vascularisée. Les régions du ménisque se distinguent principalement par leur épaisseur, leur concentration en

GAGs et leurs propriétés mécaniques en compression (tableau 1.3). La région antérieure est la région la plus rigide et celle contenant le plus de GAGs. Elle est également moins épaisse. Les couches du ménisque se différencient par l'orientation des fibres de collagène (tableau 1.4). La couche centrale résiste aux efforts de traction et a donc ses fibres de collagène orientées dans la direction circonférentielle. Les couches superficielles, situées à l'interface entre le ménisque et le cartilage, ont des fibres orientées plus aléatoirement. De plus, pour absorber les chocs transmis par le tibia, les ménisques ont des propriétés viscoélastiques.

	Zone interne	Zone externe
Sollicitation principale	Compression	Traction
Composition MEC	75 % collagène – 8% GAGs	93% collagène – 2% GAGs
Types de collagène	60% type II – 40% type I	99% type I
Types de cellules	Fibrochondrocytes	Fibroblastes
Vascularisation	Non	Oui
Capacité de régénération	Non	Oui

Tableau 1.2 – Principales spécificités des zones interne et externe des ménisques. MEC : matrice extracellulaire, GAGs : glycosaminoglycanes.

	Région antérieure	Région postérieure
Epaisseur	+	-
Concentration en GAGs	+	-
Rigidité	+	-

Tableau 1.3 – Principales spécificités des régions antérieure et postérieure des ménisques. GAGs : glycosaminoglycanes.

	Couches superficielles	Couche centrale
Fonction	Interface ménisque/cartilage	Transmission des efforts de traction
Orientation des fibres de collagène	Aléatoire	Circonférentielle + fibres liantes

Tableau 1. 4 – Principales spécificités des couches superficielles et centrale des ménisques.

Lorsque le genou est arthrosique, la composition biochimique des ménisques, leur microstructure et leurs propriétés mécaniques sont modifiées, altérant ainsi leurs fonctions au sein de l'articulation. Ces modifications font l'objet de la partie suivante.

2. Arthrose, gonarthrose et dégradation méniscale

2.1 Arthrose et gonarthrose : généralités

2.1.1 Prévalence et impact socioéconomique de l'arthrose

L'arthrose est une maladie dégénérative, dont la prévalence augmente au cours des années dû au vieillissement de la population et à l'augmentation de l'obésité (Organisation Mondiale de la Santé, OMS). L'arthrose symptomatique touche actuellement 10% des hommes et 18% des femmes dans le monde après 60 ans, toutes articulations confondues (OMS). Elle est classée parmi les 10 affections les plus invalidantes par l'OMS. Il y a 10 ans, son coût direct en France (consultations, médicaments, hospitalisations) a été évalué à 1,6 milliards d'euros annuels, soit 1,7% des dépenses de santé (Le Pen *et al.*, 2005). De plus, environ 60% des patients arthrosiques subissent un retentissement sur leur vie professionnelle (Fautrel *et al.*, 2005), ce qui a un réel impact sur la productivité (Le Pen *et al.*, 2005). Actuellement, il n'existe pas de traitement pour qu'une articulation redevienne saine. L'arthrose est donc un véritable problème de santé publique et il est nécessaire de comprendre sa pathogénie pour mieux la traiter.

L'arthrose du genou, appelée gonarthrose, représente environ 30% des cas d'arthrose en France (Fautrel *et al.*, 2005). C'est l'articulation la plus touchée après la colonne vertébrale et l'articulation de la main. Parmi les personnes souffrant de gonarthrose, 73% ont des problèmes de mobilité et 65% ont une limitation dans certaines activités de la vie quotidienne (Fautrel *et al.*, 2005).

2.1.2 Définition, classification et lésions arthrosiques

Pendant longtemps, l'arthrose a été vue comme une dégradation du cartilage, causée par l'usure due aux frottements (Kuyinu *et al.*, 2016). En réalité, l'arthrose est un processus pathologique complexe, fait de destruction et de réparation, touchant tous les tissus de l'articulation (Société française de rhumatologie (SFR) ; Kuyinu *et al.*, 2016).

En 1994, une réunion de l'OMS et de l'American Academy of Orthopaedic Surgeons a proposé une définition de l'arthrose, qui englobe les principales facettes de la maladie :

« L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, de développements, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuses conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient

symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale».

Cette définition générale montre la complexité de cette pathologie, à la fois dans sa pathogénie et dans son évolution. Ses causes sont multiples et l'arthrose est classée en deux types : primaire et secondaire (Altman *et al.*, 1986).

Arthrose primaire

L'arthrose primaire est un phénomène survenant naturellement, généralement après 50 ans, dû aux changements dégénératifs dans l'articulation (Kuyinu *et al.*, 2016). Elle peut être localisée ou généralisée. Certains facteurs favorisent son développement, tels que l'âge, l'obésité, les prédispositions génétiques ou une activité physique excessive (OMS, Haq *et al.*, 2003 ; Abramson et Attur, 2009). Sa progression peut prendre plusieurs années (Haq *et al.*, 2003).

Arthrose secondaire

L'arthrose secondaire est associée à des causes ou facteurs de risque, tels qu'un traumatisme (rupture chronique du LCA, ablation du ménisque...), des maladies congénitales ou des troubles du métabolisme osseux, et peut apparaître chez des patients plus jeunes (Kuyinu *et al.*, 2016). Dans le cas d'un traumatisme, qui représente environ 12% des cas d'arthrose (Buckwalter et Felson, 2015), on parlera d'arthrose post-traumatique.

La gonarthrose implique le cartilage, l'os sous-chondral, les ménisques et la membrane synoviale (figure 1.9) (Hunter et Felson, 2006a ; Kuyinu *et al.*, 2016). A l'échelle microscopique, l'arthrose résulte en une fibrillation du cartilage, accompagnée d'une destruction de sa microarchitecture avec la formation de zones d'érosion (Haq *et al.*, 2003). Des fragments de cartilage s'échappent dans la cavité articulaire. La membrane synoviale réagit à cette dégradation par une inflammation et un gonflement de la capsule articulaire, et par une augmentation de sa production de liquide synovial (SFR). De plus, la perte de cartilage entraîne un pincement de l'interligne articulaire, c'est-à-dire une diminution de l'espace entre le tibia et le fémur (Haq *et al.*, 2003). Au niveau de l'os sous-chondral, on observe une prolifération d'os en périphérie de l'articulation, appelée ostéophyte, et, dans des cas avancés, une densification, appelée sclérose à la radiographie. Le ménisque est également affecté ; les changements, qui ont été peu étudiés et font l'objet de cette thèse, seront détaillés dans la section 2.3 (chapitre 1).

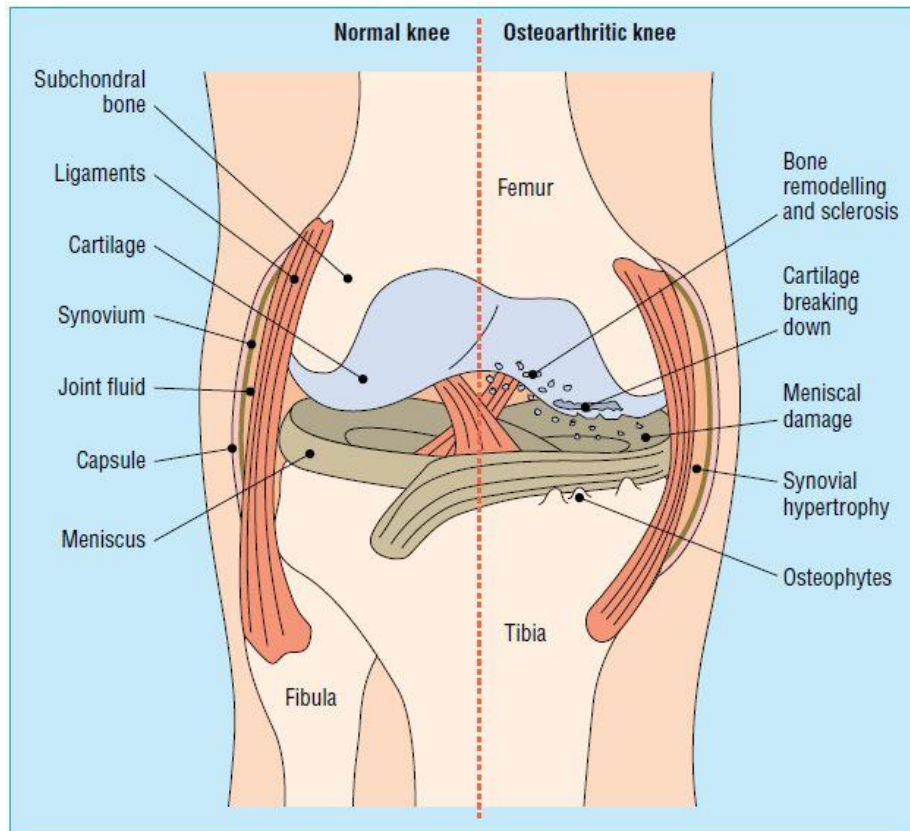


Figure 1.9 – Schématisation des principaux changements structuraux liés à l'arthrose du genou. A gauche : articulation saine. A droite : articulation arthrosique (Hunter et Felson, 2006a).

2.1.3 Diagnostic de l'arthrose

L'apparition d'arthrose est difficile à détecter chez l'homme, puisque la douleur, qui est le symptôme le plus visible pour le patient, ne survient qu'à partir d'un certain stade de développement de la pathologie (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014 ; Kuyinu *et al.*, 2016). Actuellement, le diagnostic de l'arthrose est effectué d'abord cliniquement, puis à partir de radiographies (Hunter et Felson, 2006a).

Evaluation clinique

L'évaluation clinique la plus répandue est le score WOMAC (Western Ontario and McMaster Osteoarthritis index) (Bellamy, 2005). Cette évaluation a été développée par Bellamy en 1981 et se présente sous la forme d'un questionnaire divisé en 3 dimensions : la douleur, la raideur articulaire et la fonction physique.

Evaluation radiographique

L'évaluation radiographique la plus répandue est le score de Kellgren et Lawrence (KL) (1957). Les caractéristiques considérées comme des signes d'arthrose sont la formation d'ostéophytes, le pincement articulaire, la sclérose de l'os sous-chondral et la déformation osseuse au niveau des extrémités. Le système de score est le suivant : 0 : radiographie normale, 1 : ostéophyte de signification douteuse, 2 : ostéophyte net sans pincement de

l'interligne articulaire, 3 : ostéophytes multiples et pincement de l'interligne articulaire, 4 : ostéophytes larges, pincement de l'interligne articulaire marqué, sclérose sévère et déformation osseuse. La figure 1.10 illustre les scores de 1 à 4 (Link *et al.*, 2003).



Figure 1.10 – Radiographies du genou en vue antéro – postérieure (en haut) et latérale (en bas) montrant le système de score KL. A) Genou avec un score KL de 1. Présence d'ostéophytes minimes au niveau du condyle fémoral médial (pointe de flèche). B) Genou avec un score KL de 2. Présence d'ostéophytes petits mais nets (flèches), sans pincement de l'interligne articulaire. C) Genou avec un score KL de 3. Pincement de l'interligne articulaire modéré (flèche) et présence d'ostéophytes (pointe de flèche). D) Genou avec un score KL de 4. Pincement de l'interligne articulaire marqué (flèche), présence d'ostéophytes sévères (pointes de flèche blanches) et sclérose de l'os sous-chondral (pointe de flèche noire) (Link *et al.*, 2003).

Bien que cette classification radiographique ait un intérêt dans les études cliniques pour homogénéiser la sélection des patients, elle présente certaines limites (SFR). Elle se base sur des signes radiographiques et ne permet donc pas de détecter l'apparition d'arthrose si l'os ou l'interligne articulaire ne sont pas encore affectés (Link *et al.*, 2003). De plus, elle est peu sensible au changement et ne permet donc pas de suivre la progression de la pathologie. Enfin, elle ne prend pas en compte la douleur du patient, qui a été montrée comme étant décorrélée du grade radiographique (Ciccitini *et al.*, 1996 ; Link *et al.*, 2003).

Dû à cette difficulté de diagnostiquer l'arthrose et de suivre son évolution, les mécanismes d'apparition et de progression de l'arthrose ne sont pas encore totalement connus. Ainsi, à l'heure actuelle, la plupart des traitements visent à traiter la douleur, le handicap fonctionnel lié à la réduction de la mobilité, et non la pathologie elle-même (Breville *et al.*, 2015 ; Kuyinu *et al.*, 2016). Pour trouver des marqueurs diagnostic et des cibles thérapeutiques, de nombreuses études sont donc effectuées sur les tissus de l'articulation, à différents stades. Ces études ont généralement recours à des modèles d'arthrose animaux, qui revêtent un intérêt particulier pour étudier à la fois la pathogénie de la maladie et l'efficacité de traitements (Kuyinu *et al.*, 2016).

2.2 Modèles d'arthrose

Il n'existe pas de modèle d'arthrose animal idéal, c'est-à-dire (1) ayant une articulation semblable à celle de l'homme en termes de taille, structure, génération et progression des lésions cartilagineuses, (2) développant des lésions arthrosiques reproductibles pour une même procédure d'induction et mimant les lésions observées chez les patients humains et (3) permettant d'étudier la douleur en fonction du stade d'arthrose (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014). De plus, selon le type d'arthrose étudié (primaire ou secondaire), la technique d'induction sera différente. Le choix du modèle résulte d'un compromis et dépend de la problématique soulevée. Plusieurs études ont donc comparé les différents modèles d'arthrose, concernant à la fois la technique d'induction et l'animal utilisé.

2.2.1 Techniques d'induction de l'arthrose

La figure 1.11 recense les modèles couramment utilisés dans la littérature, classés selon le type d'arthrose (Kuyinu *et al.*, 2016).

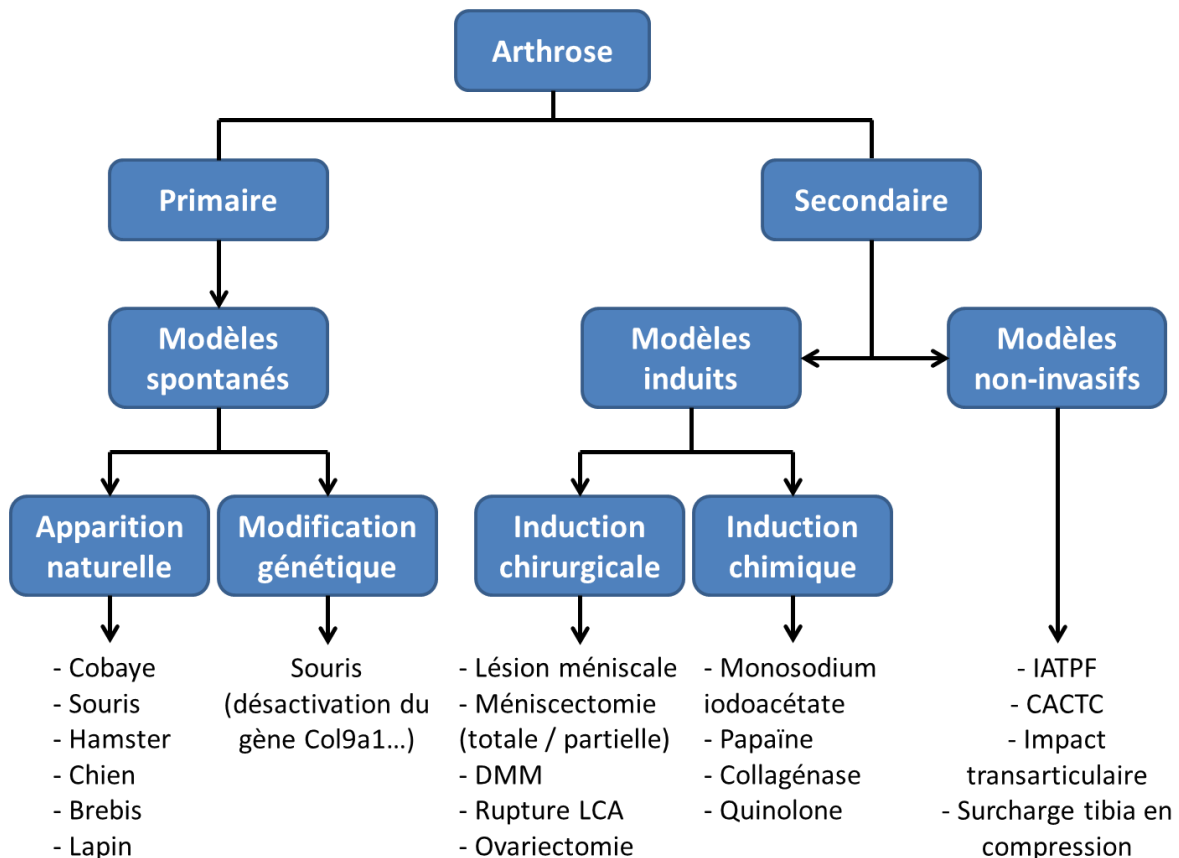


Figure 1.11 – Classification des modèles d'arthrose et principaux animaux et techniques utilisés. DMM : déstabilisation du ménisque médial, IATPF : fracture intraarticulaire du plateau tibial, CACTC : compression cyclique du cartilage articulaire tibial.

L'arthrose primaire peut être étudiée en utilisant des modèles spontanés. Le modèle naturel ne requiert aucune intervention et permet d'étudier la pathogénie de l'arthrose

dégénérative. Les principaux animaux utilisés sont le cobaye albinos, le hamster syrien et certaines lignées de souris (Bendele, 2011). Le modèle génétique requiert une intervention génomique et permet d'étudier la fonction d'un gène spécifique et son interaction avec les constituants d'un tissu (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014). Il est principalement utilisé sur la souris. Les principaux inconvénients de ces modèles spontanés sont leur coût et, selon l'animal utilisé, le temps nécessaire pour permettre le développement de la pathologie.

L'arthrose secondaire peut être étudiée en utilisant des modèles induits (invasifs) ou non-invasifs (Kuyinu *et al.*, 2016). Concernant les modèles invasifs, l'arthrose est induite soit de façon chirurgicale, c'est-à-dire en créant une instabilité dans le genou, modifiant ainsi la répartition des efforts, soit de façon chimique, modifiant ainsi l'environnement métabolique (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014). Les modèles non invasifs consistent à créer des lésions dans l'articulation de façon indirecte, par l'intermédiaire d'impacts mécaniques (figure 1.12), et ne requièrent donc pas d'intervention chirurgicale ou chimique (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014 ; Kuyinu *et al.*, 2016). Le tableau 1.5 résume les avantages et inconvénients des modèles invasifs et non invasifs. Tous ces modèles d'arthrose secondaire permettent d'étudier les lésions des tissus articulaires à différents stades et d'évaluer l'efficacité de traitements (Kuyinu *et al.*, 2016). Par rapport aux modèles spontanés, ils ont l'avantage d'être reproductibles et de permettre un développement rapide de la pathologie. Par contre, ils sont inappropriés pour étudier la pathogénie de l'arthrose dégénérative.

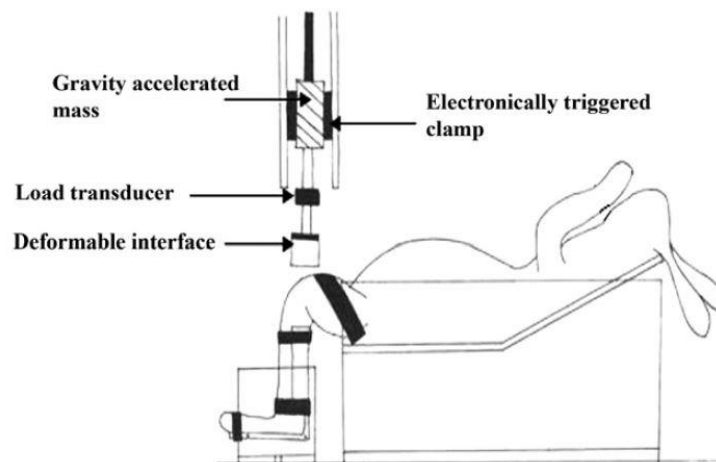


Figure 1.12 – Modèle d'arthrose non invasif : schéma d'un impact traumatique chez le lapin. Après anesthésie, une masse est lâchée à une certaine hauteur pour frapper l'extrémité distale du fémur. Cet impact engendre une rupture du LCA (Killian *et al.*, 2010b).

	Avantages	Inconvénients
Modèles induits	<ul style="list-style-type: none"> - Equipement facilement accessible - Très utilisés dans la littérature 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque d'infection - Reposent sur l'expertise d'un chirurgien - Induction trop rapide pour étudier les premiers stades ou l'efficacité immédiate d'un traitement
Modèles non invasifs	<ul style="list-style-type: none"> - Faible risque d'infection - Peuvent être utilisés pour étudier les premiers stades ou l'efficacité immédiate d'un traitement 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipement moins accessible - Reposent sur les compétences d'un technicien - Peu d'études dans la littérature

Tableau 1.5 – Avantages et inconvénients des modèles induits et non invasifs d'arthrose (Kuyinu *et al.*, 2016).

2.2.2 Animaux utilisés

De nombreux animaux peuvent être utilisés dans les modèles d'arthrose. Gregory *et al.* (2012) ont répertorié les avantages et inconvénients de chaque animal, ainsi que les techniques d'induction d'arthrose utilisées dans la littérature (tableau 1.6). Les petits animaux, tels que la souris, le rat ou le lapin, sont peu coûteux, simples à manipuler et à héberger. Par contre, leur faible taille rend les analyses sur les tissus difficiles et l'IRM ne peut être effectuée qu'avec des antennes dédiées. Concernant les ménisques, un inconvénient majeur de la souris, du rat et du cobaye est que leurs ménisques sont minéralisés, contrairement aux ménisques humains sains (Messner *et al.*, 1998 ; Kapadia *et al.*, 2000). Les grands animaux, tels que le chien, la brebis ou le cheval, ont une taille permettant l'arthroscopie et l'IRM (Gregory *et al.*, 2012) et facilitant les analyses sur les tissus. Par contre, ils sont plus coûteux (Gregory *et al.*, 2012), plus difficiles à manipuler et la progression de l'arthrose est plus lente (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014).

	Avantages	Inconvénients	Techniques utilisées
Souris	Peu coûteux Facilité d'hébergement et de manipulation Génome séquencé L'articulation entière peut être vue sur une lame histologique	Cartilage fin Prise en charge postopératoire difficile Ménisque minéralisé	Génétique DMM Chimique
Rat	Peu coûteux Facilité d'hébergement et de manipulation Cartilage plus épais que la souris L'articulation entière peut être vue sur une lame histologique	Dimensions de l'articulation Prise en charge postopératoire difficile Ménisque minéralisé	Lésion méniscale Méniscectomie partielle Rupture du LCA Rupture du LCA + méniscectomie partielle Chimique
Lapin	Facilité d'hébergement et de manipulation	Biomécanique du genou Régénération possible du cartilage Différences histologie Prise en charge postopératoire difficile	Rupture du LCA Méniscectomie Chimique
Cobaye	Histopathologie similaire à l'homme Enclin à de l'arthrose spontanée	Vie sédentaire Arthroscopie impossible Ménisque minéralisé	Spontanée Méniscectomie Chimique
Chien	Enclin à de l'arthrose spontanée Arthroscopie et IRM praticables Physiologie de l'appareil digestif Génome séquencé Mesure des résultats validée	Coût Perception	Spontanée Rupture du LCA Relâchement méniscal Défaut local du cartilage
Brebis	Dimensions de l'articulation Facile à utiliser Arthroscopie et IRM praticables	Coût Physiologie de l'appareil digestif	Méniscectomie totale ou partielle

	Avantages	Inconvénients	Techniques utilisées
Cheval	Arthrose spontanée Possibilité d'induire l'arthrose sans instabilité Arthroscopie et IRM praticables	Coût Anatomie	Spontanée

Tableau 1.6 – Avantages et inconvénients des modèles animaux utilisés dans la littérature pour l'étude de l'arthrose. Les techniques d'induction de l'arthrose pour chaque animal sont précisées. DMM : déstabilisation du ménisque médial. LCA : ligament croisé antérieur (Gregory *et al.*, 2012).

2.2.3. Aspects éthiques

La règle des 3R, élaborée en 1959 par Russell et Burch, définit la démarche éthique à respecter en expérimentation animale (National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research, NC3R). Elle comprend le remplacement des modèles animaux, le raffinement de la méthodologie utilisée et la réduction du nombre d'animaux en expérimentation.

Remplacement

Le remplacement consiste à éviter ou remplacer l'usage des animaux définis comme « protégés », c'est-à-dire toutes les espèces vivantes vertébrées, à l'exception de l'homme. Les méthodes de remplacement incluent le recours à des volontaires humains, à des tissus ou à des cellules humains, l'utilisation de modèles numériques ou mathématiques, ou encore l'expérimentation sur des cellules et tissus provenant d'animaux n'ayant pas subi de traitement particulier.

Réduction

La réduction consiste à minimiser le nombre d'animaux nécessaires à une étude, soit en obtenant une quantité comparable d'informations avec un plus faible nombre d'animaux, soit en obtenant une plus grande quantité d'informations avec le même nombre d'animaux. Les méthodes de réduction incluent l'optimisation du protocole expérimental, le recours aux outils statistiques, le partage de données et de ressources, ou encore l'utilisation de techniques telles que l'imagerie, pour permettre des études longitudinales sur le même animal.

Raffinement

Le raffinement consiste à minimiser la douleur, l'inconfort, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Les méthodes de raffinement incluent l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques appropriés, l'entraînement des animaux à coopérer pour certaines procédures (par exemple les prises de sang) pour diminuer le stress ou encore à fournir aux animaux des conditions d'hébergement adaptées.

Ainsi, pour des raisons éthiques et de coût, l'arthrose est généralement induite dans le genou d'une seule des deux pattes. La patte non induite, appelée patte controlatérale, est utilisée comme contrôle. Cependant, plusieurs études ont observé des changements sur la patte controlatérale, au niveau du cartilage et de l'os sous-chondral, s'expliquant par un transfert de poids dû à la douleur ressentie dans la patte opérée (Han *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2015). Il faut avoir conscience de ce biais dans l'analyse des résultats. La section 3.3 (chapitre 1) mènera une analyse en ce sens.

2.2.4 Choix du modèle d'arthrose pour l'étude des ménisques : rupture du LCA chez le lapin

Le modèle le plus couramment utilisé pour étudier l'effet de l'arthrose sur les ménisques est la rupture du LCA chez le lapin (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a et 2001b ; Takahashi *et al.*, 2001 ; Pennock *et al.*, 2007 ; Boulocher *et al.*, 2008 ; Killian *et al.*, 2010b ; Lopez-Franco *et al.*, 2011 ; Fischenich *et al.*, 2014 et 2015a ; Coatney *et al.*, 2015 ; Wheatley *et al.*, 2015). En effet, cette technique d'induction crée une forte déstabilisation de l'articulation, menant à une arthrose post-traumatique qui reproduit la pathologie se produisant naturellement après une lésion du LCA (Bendele, 2001). Par contre, les symptômes tels que la boiterie sont plus sévères, s'expliquant par une forte instabilité du genou opéré (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont comparé les ménisques de lapins et les ménisques humains, en termes de biomécanique (Proffen *et al.*, 2012), d'anatomie (Proffen *et al.*, 2012), de composition de la matrice extracellulaire (Chevrier *et al.*, 2009) et de propriétés mécaniques (Sweigart *et al.*, 2004b). Le tableau 1.7 répertorie les principales caractéristiques pour chaque ménisque. Il existe de nombreuses similitudes entre les ménisques de lapin et les ménisques humains. En effet, même si les ménisques de lapins sont entre 3 et 4 fois plus petits que les ménisques humains, leurs proportions par rapport au tibia sont les mêmes, sauf pour la largeur du ménisque latéral qui est plus élevée chez le lapin (Proffen *et al.*, 2012). De plus, les différences de composition de la matrice extracellulaire entre les zones interne et externe sont similaires entre le lapin et l'humain. La différence majeure réside dans la variation de la quantité de GAGs et des propriétés mécaniques selon la région (Sweigart *et al.*, 2004b). Ces différences sont plus marquées chez le lapin, avec notamment la région antérieure du ménisque médial qui est 4 fois plus rigide que la région postérieure.

Caractéristique		Humain	Lapin
Biomécanique (Proffen, 2012)	Angle extension (°)	2,5 ± 2,9	22 ± 2,7
	Angle flexion (°)	137,5 ± 9,6	161 ± 2,2
Anatomie ménisque médial (Proffen, 2012)	Longueur (cm)	39,8 ± 3,71	9,2 ± 0,4
	Longueur normalisée	0,57 ± 0,04	0,52 ± 0,06
	Largeur normalisée	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Anatomie ménisque latéral (Proffen, 2012)	Longueur (cm)	33,3 ± 3,53	10,0 ± 1,17
	Longueur normalisée	0,48 ± 0,03	0,57 ± 0,07
	Largeur normalisée	0,14 ± 0,02	0,23 ± 0,05
Matrice extracellulaire (Chevrier, 2009)	Localisation GAGs	Zones interne et centrale	Zones interne et centrale
	Quantité de GAGs (µg/mg) (Sweigart, 2004a)	Ant : 22,0 ± 10,1 Pos : 19,4 ± 8,3	Ant : 31,4 ± 5,1 Pos : 17,8 ± 4,1
	Localisation Collagène II	Zones interne et centrale	Zones interne et centrale
	Organisation fibres de collagène	Circonférentielles + couche lamellaire	Circonférentielles
Propriétés mécaniques médial (Sweigart, 2004b)	H _A (MPa)	Ant : 0,15 ± 0,03* Pos : 0,11 ± 0,02*	Ant : 0,50 ± 0,11[#] Pos : 0,12 ± 0,03 [#]

Tableau 1.7 – Caractéristiques des ménisques humains et des ménisques de lapin, en termes de biomécanique (amplitude du mouvement du genou), d’anatomie, de composition de la matrice extracellulaire et de propriétés mécaniques. Longueur : dimension du ménisque dans l’axe antérieur – postérieur. Largeur : Distance entre les bords du ménisque, dans la zone centrale. Dimensions normalisées : par rapport à la dimension du tibia. H_A : aggregate modulus. Les termes en gras signifient des différences entre l’humain et le lapin. * et [#] indiquent des différences significatives entre 2 valeurs.

Les ruptures du LCA sont souvent associées à des dégradations méniscales ; Fischnich *et al.* (2014) proposent donc un modèle combinant rupture du LCA et lésion des ménisques. Cependant, dans le cadre de ces travaux de thèse, l’objectif est d’étudier l’effet de l’arthrose sur les ménisques dès les premiers stades de développement de la pathologie. On choisit donc un modèle où le ménisque est laissé intact, afin de comprendre les mécanismes d’altération. La rupture du LCA peut être effectuée de façon chirurgicale (modèle d’induction chirurgicale), ou engendrée par un impact traumatique (modèle non invasif). Le premier modèle est plus accessible et plus couramment utilisé dans la littérature ; il est donc choisi ici.

Des études ont été effectuées sur le cartilage et l’os sous-chondral des genoux de lapin 4 et 8 semaines après la rupture du LCA, pour évaluer la progression de l’arthrose avec ce modèle. Une fibrillation du cartilage est observée 4 semaines après l’opération (Yoshioka *et al.*, 1996 ; Baptiste *et al.*, 2004), tandis que la formation d’ostéophytes n’est observée qu’à partir de 8 semaines (Baptiste *et al.*, 2004).

2.3 Effet de l'arthrose sur les ménisques

Les études sur l'arthrose se sont longtemps focalisées sur les modifications affectant l'os ou le cartilage. Ces quinze dernières années, plusieurs études ont également caractérisé les changements méniscaux dus à l'arthrose, à différentes échelles.

2.3.1 Effets macroscopiques

Au cours du développement de l'arthrose, les ménisques subissent de nombreuses modifications à l'échelle macroscopique, allant jusqu'à la formation de lésions.

Par rapport aux ménisques sains, les ménisques arthrosiques ont une apparence plus opaque, leur couleur est plus jaunâtre et leur surface est moins lisse, dû soit à de la fibrillation (effilochement au niveau de la surface), soit à des ondulations (figure 1.13) (Katsuragawa *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2010 ; Pauli *et al.*, 2011 ; Kwok *et al.*, 2016).

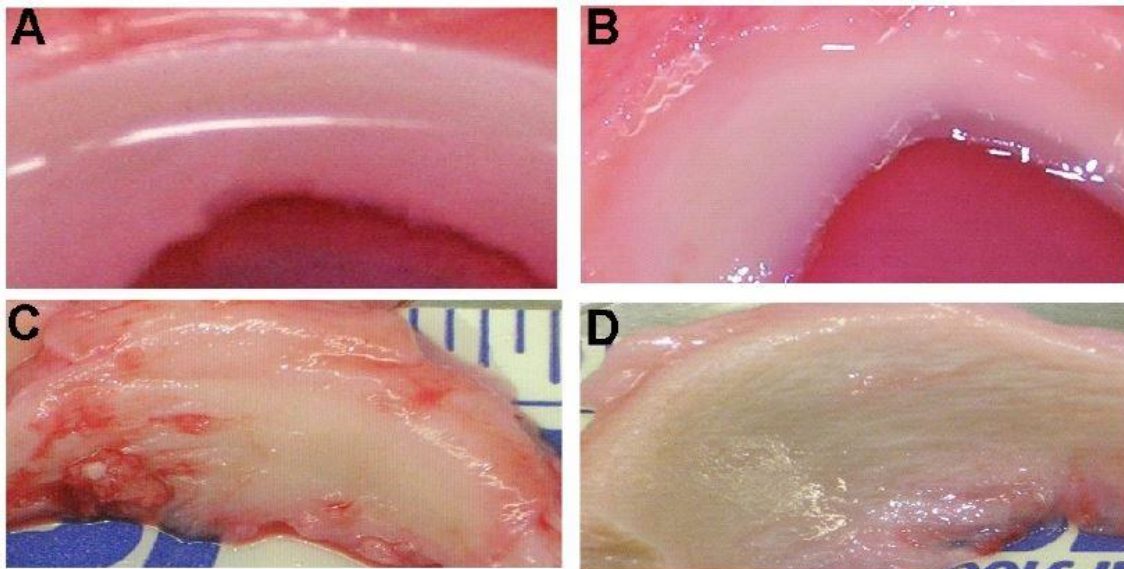


Figure 1.13 – Ménisques médiaux humains normaux (A,B) et arthrosiques (C,D). Les ménisques normaux ont une surface lisse, blanche et brillante, sans aucun signe de dégénérescence. Les ménisques arthrosiques ont une surface plus jaune et plus rugueuse. Echelle : 1 graduation = 1 mm (Sun *et al.*, 2010).

Avec la progression de la pathologie, de nombreuses études ont rapporté la présence de lésions méniscales, aussi bien dans le cas d'arthrose primaire (Berthiaume *et al.*, 2005 ; Lange *et al.*, 2007 ; Zarins *et al.*, 2010 ; Pauli *et al.*, 2011) que dans le cas d'arthrose secondaire, suite à une rupture du LCA (Adams *et al.*, 1983 ; Smith *et al.*, 2002 ; Boulocher *et al.*, 2008 ; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a ; Fischenich *et al.*, 2015a). Elles peuvent être de différents types ; les plus fréquentes sont les lésions obliques et verticales (figure 1.14) (Greis *et al.*, 2002 ; Fischenich *et al.*, 2015a). Lorsque les lésions verticales sont complètes, c'est-à-dire qu'elles traversent toute l'épaisseur du ménisque et que le fragment interne peut migrer vers l'intérieur de l'articulation, on parle d'anse de seau. Ces lésions peuvent causer des déficiences physiques graves (Greis *et al.*, 2002).

L'occurrence des lésions est plus élevée dans la région postérieure du ménisque médial (Adams *et al.*, 1983 ; Smith *et al.*, 2002 ; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a ; Lange *et al.*, 2007 ; Zarins *et al.*, 2010 ; Pauli *et al.*, 2011), et elle augmente avec la sévérité de l'arthrose (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a ; Smith *et al.*, 2002 ; Zarins *et al.*, 2010).

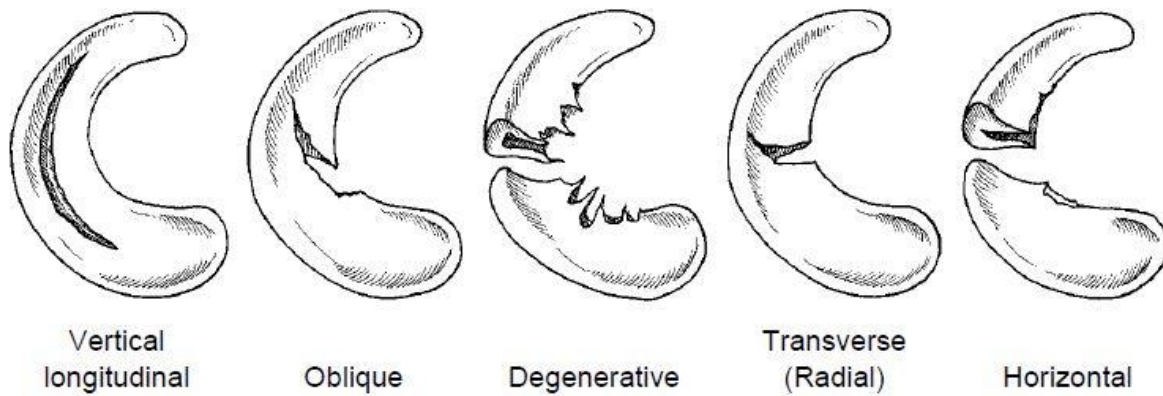


Figure 1.14 – Types de lésions méniscales fréquentes (Greis *et al.*, 2002).

Laverty *et al.* (2010) ont proposé un système de scores standardisé, allant de 1 à 5, pour évaluer la sévérité des lésions méniscales dans les modèles d'arthrose chez le lapin (tableau 1.8). Hellio Le Graverand *et al.* (2001a) ont montré que 100% des ménisques médiaux de lapin avaient un score maximal 8 semaines après la rupture du LCA.

Score	Signification
1	Normal
2	Fibrillation minime
3	Fibrillation modérée, pas de lésions
4	Fibrillation sévère, lésions incomplètes
5	Lésions complètes, anses de seau, ou lésions incomplètes multiples

Tableau 1.8 – Score permettant d'évaluer les changements méniscaux à l'échelle macroscopique (Laverty *et al.*, 2010).

De plus, la formation de calcification a été observée à la surface des ménisques humains, à un stade avancé d'arthrose (Sun *et al.*, 2010 ; Pauli *et al.* 2011 ; Katsamenis *et al.*, 2012). Dans les ménisques de souris (Kwok *et al.*, 2016) et dans les ménisques de cobaye (Kapadia *et al.*, 2000), la minéralisation augmente avec l'arthrose. Aucune étude n'a observé de calcification dans les ménisques de lapin.

2.3.2 Effets sur la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire des ménisques subit de fortes modifications au cours du développement de l'arthrose, tant au niveau de la quantité de collagène et de GAGs qu'au niveau de la répartition des GAGs et de l'organisation des fibres de collagène.

2.3.2.1 Effets sur la quantité de collagène et l'organisation des fibres

Bien que les fibres de collagène aient un rôle primordial dans la transmission des efforts (section 1.2.1, chapitre 1), peu d'études ont comparé la quantité de collagène dans les ménisques arthrosiques et non arthrosiques, ainsi que l'organisation des fibres (tableau 1.9). De plus, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant la quantité de collagène. Sun *et al.* (2012) et Mine *et al.* (2013) ont montré une diminution de la quantité de collagène I et II dans les ménisques humains arthrosiques à un stade avancé, principalement dans la couche centrale (Sun *et al.*, 2012). Herwig *et al.* (1984) n'ont pas observé de différence significative dans la quantité de collagène des ménisques humains en fonction du stade de dégénération. Hellio Le Graverand *et al.* (2001a) ont observé une augmentation de la quantité de collagène de type I et II dans les ménisques médial et latéral de lapin 3 et 8 semaines après rupture du LCA, principalement dans les zones contenant des fissures. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la quantité de collagène est une réaction post – traumatique, étant donné que les autres études concernent des cas d'arthrose primaire. L'organisation des fibres de collagène a été comparée entre les ménisques humains sains et arthrosiques au niveau de la couche centrale, dans les régions centrale (Sun *et al.*, 2012) et antérieure (Katsuragawa *et al.*, 2010). Dans ces deux régions, les fibres de collagène des ménisques médiaux arthrosiques sont moins organisées et moins compactes que dans les ménisques sains. Par contre, il n'a pas été observé de différence significative entre les ménisques latéraux sains et arthrosiques (Katsuragawa *et al.*, 2010).

Etude	Ménisque	Stade arthrose	Quantité de collagène	Organisation des fibres de collagène
Herwig <i>et al.</i> (1984)	Humain	Plusieurs stades	=	
Hellio Le Graverand <i>et al.</i> (2001a)	Lapin ACLT	3 et 8 semaines	↗	
Katsuragawa <i>et al.</i> (2010)	Humain	Avancé		Médial ↘ Latéral =
Sun <i>et al.</i> (2012)	Humain - médial	Avancé	↘	↘
Mine <i>et al.</i> (2013)	Humain	Avancé	↘	

Tableau 1.9 – Etudes effectuées dans la littérature sur l'effet de l'arthrose sur la quantité de collagène des ménisques et l'organisation des fibres. ACLT : rupture du ligament croisé antérieur.

2.3.2.2 Effets sur la quantité et la répartition des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes

La quantité de PGs et de GAGs des ménisques arthrosiques a fait l'objet d'un plus grand nombre d'études, à la fois dans le cas d'arthrose primaire chez l'homme et dans le cas d'arthrose secondaire chez l'animal (tableau 1.10). Dans les ménisques humains, la quantité de GAGs et de PGs augmente avec l'arthrose (Herwig *et al.*, 1984 ; Pauli *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2012 ; Kwok *et al.*, 2014), principalement dans la couche centrale (Pauli *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2012), suggérant que la dégénérescence des ménisques commence en profondeur et non en surface. Cette augmentation de la quantité de GAGs s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'eau (Herwig *et al.*, 1984). Des résultats différents ont été obtenus concernant l'arthrose secondaire, à un stade plus précoce. En effet, Adams *et al.* (1983) ont montré sur des ménisques de chien ayant subi une rupture du LCA que les changements biochimiques se déroulaient en deux phases. Pendant la première phase, la quantité de GAGs diminue, puis elle augmente dans la deuxième phase. Des facteurs tels que l'inflammation peuvent favoriser la diminution. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Hellio Le Graverand *et al.* (2001a), qui ont observé une grande disparité dans la concentration en GAGs des ménisques de lapin, 3 et 8 semaines après la rupture du LCA, avec des zones très concentrées et des zones caractérisées par une absence de GAGs. Les GAGs sont principalement concentrés dans les zones contenant des lésions. Ainsi, les études effectuées à un stade précoce d'arthrose post – traumatique ont observé une diminution de la quantité de GAGs des ménisques (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a ; Fischenich *et al.*, 2014 et 2015a ; Kwok *et al.*, 2016).

Cependant, des résultats différents ont été obtenus entre les études concernant la variation de cette quantité de GAGs selon les régions et les sites. Hellio Le Graverand *et al.* (2001a) ont observé une diminution de la quantité de GAGs dans le ménisque médial de lapin 3 et 8 semaines après rupture du LCA, mais peu de changements dans le ménisque latéral. Coatney *et al.* (2015) ont observé une diminution dans les régions antérieure et postérieure des ménisques médial et latéral 6 semaines après l'induction d'arthrose par impact traumatique. En utilisant le même modèle, Fischenich *et al.* (2014 et 2015a) ont montré que 12 semaines après la rupture du LCA, la quantité de GAGs diminuait dans les trois régions du ménisque latéral, mais uniquement dans la région antérieure du ménisque médial. Ces différences peuvent s'expliquer par un stade de progression différent entre les études.

Etude	Ménisque	Stade arthrose	Quantité de GAGs
Adams <i>et al.</i> (1983)	Chien ACLT	1 semaine à 18 mois	↘ puis ↗
Herwig <i>et al.</i> (1984)	Humain	Plusieurs stades	↗
Le Graverand <i>et al.</i> (2011a)	Lapin ACLT	3 et 8 semaines	Méd ↘ Lat =
Pauli <i>et al.</i> (2011)	Humain	Avancé	↗
Sun <i>et al.</i> (2012)	Humain	Avancé	↗
Fischenich <i>et al.</i> (2014)	Lapin mACLT	12 semaines	Méd ant & Lat ↘ Méd cent & pos =
Kwok <i>et al.</i> (2014)	Humain	Avancé	↗
Fischenich <i>et al.</i> (2015)	Lapin impact traumatique	12 semaines	Méd ant & Lat ↘ Méd cent & pos =
Coatney <i>et al.</i> (2015)	Lapin impact traumatique	6 semaines	Méd ant & pos ↘ Lat ant & pos ↘
Kwok <i>et al.</i> (2016)	Souris DMM	2 à 12 semaines	↘

Tableau 1.10 – Etudes effectuées dans la littérature sur l'effet de l'arthrose sur la quantité de GAGs des ménisques.

ACLT : rupture du ligament croisé antérieur, mACLT : rupture du ligament croisé antérieur et lésion du ménisque médial, DMM : déstabilisation du ménisque médial, Méd : médial, Lat : latéral, ant : région antérieure, cent : région centrale, pos : région postérieure.

2.3.3 Effets sur les propriétés mécaniques

L'effet de l'arthrose sur les propriétés mécaniques des ménisques a été étudié chez l'homme (Katsuragawa *et al.*, 2010 ; Kwok *et al.*, 2014 ; Fischenich *et al.*, 2015b), le lapin (Fischenich *et al.*, 2014 et 2015a ; Weatley *et al.*, 2015 ; Coatney *et al.*, 2015) et le bœuf (Baro *et al.*, 2012), essentiellement par des techniques de compression confinée et d'indentation (tableau 1.11).

Fischenich *et al.* (2015b) ont observé une diminution du module à l'équilibre et du module instantané des ménisques humains à un stade d'arthrose avancé, en particulier dans la région antérieure du ménisque médial, où ils diminuent respectivement de 73% et 56%. Il n'a pas été observé de changements dans la région postérieure du ménisque médial. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Katsuragawa *et al.* (2010), qui ont trouvé une diminution de l'*aggregate modulus* de 40% dans la région antérieure du ménisque médial, qui était le site le plus affecté macroscopiquement. De plus, la perméabilité, qui mesure l'écoulement du fluide à travers le tissu, augmente d'un facteur 4 dans le ménisque médial antérieur. Par contre, il n'a pas été observé de différence significative dans la région antérieure du ménisque latéral. La région postérieure n'a pas été caractérisée dans leur étude, dû à la sévérité des lésions. Kwok *et al.* (2014) ont obtenu des résultats différents, puisqu'ils ont montré une augmentation du module élastique dans la région centrale du ménisque médial à un stade avancé, dans toutes les zones. Cela peut s'expliquer par une échelle différente, étant donné que leurs essais ont été effectués par microscope à force atomique.

Les études sur des modèles animaux ont été effectuées à des stades plus précoces d'arthrose. Six semaines après induction d'arthrose par impact traumatique chez le lapin, Coatney *et al.* (2015) n'ont observé aucune différence significative entre les modules instantanés et à l'équilibre des ménisques impactés et non impactés, dans aucune région et dans aucun site. En utilisant le même modèle, Fischenich *et al.* (2015a) ont montré une différence significative sur les deux modules douze semaines après induction d'arthrose, dans les ménisques médial et latéral. De plus, le temps de relaxation moyen, c'est-à-dire la durée pour atteindre l'équilibre, augmente avec l'arthrose (Weatley *et al.*, 2015). Par contre la fraction élastique moyenne n'est pas modifiée. Dans leurs études, la région postérieure n'a pas pu être caractérisée que pour un ménisque médial, dû à la sévérité des lésions. Les différences selon les régions n'ont donc pas pu être étudiées. Les mêmes résultats sur le module instantané et le module à l'équilibre ont été obtenus avec un modèle d'arthrose combinant rupture du LCA et lésion méniscale chez le lapin, à douze semaines (Fischenich *et al.*, 2014). De même, Baro *et al.* (2012) ont montré une diminution du module à l'équilibre et du module instantané dans la région centrale des ménisques médiaux bovins après induction d'arthrose par papaine, une enzyme capable de dégrader le collagène et relâcher des GAGs.

Etude	Ménisques	Stade arthrose	Propriétés mécaniques
Katsuragawa et al. (2010)	Humain	Avancé	H_A : Méd \searrow Lat = k : Méd \searrow Lat =
Baro et al. (2012)	Bœuf papaïne	30 min	Méd cent \searrow
Fischenich et al. (2014)	Lapin mACLT	12 semaines	E_{ins} : Méd \searrow Lat \searrow E_{eq} : Méd \searrow Lat \searrow
Kwok et al. (2014)	Humain	Avancé	E_{el} : Med cent \nearrow
Coatney et al. (2015)	Lapin impact traumatique	6 semaines	E_{ins} : = E_{eq} : =
Fischenich et al. (2015a)	Lapin impact traumatique	12 semaines	E_{ins} : Méd \searrow Lat \searrow E_{eq} : Méd \searrow Lat \searrow
Fischenich et al. (2015b)	Humain	Avancé	E_{ins} : Méd ant & cent \searrow Méd pos = Lat \searrow E_{eq} : Méd ant & cent \searrow Méd pos = Lat \searrow
Weatley et al. (2015)	Lapin impact traumatique	12 semaines	α : \searrow τ : \nearrow f : =

Tableau 1.11 – Etudes effectuées dans la littérature sur l'effet de l'arthrose sur les propriétés mécaniques des ménisques.
 ACLT : rupture du ligament croisé antérieur, mACLT : rupture du ligament croisé antérieur et lésion du ménisque médial,
 Méd : médial, Lat : latéral, ant : région antérieure, cent : région centrale, pos : région postérieure, H_A : aggregate modulus, k : perméabilité, E_{ins} : module instantané, E_{eq} : module à l'équilibre, E_{el} : module élastique, α : paramètre de rigidité, τ : temps de relaxation, f : fraction élastique.

2.3.4 Relations entre les changements microstructuraux et les propriétés mécaniques

Baro *et al.* (2012) ont montré qu'une modification de la matrice extracellulaire avait un effet sur les propriétés mécaniques des ménisques. Cependant, les causes exactes de ces changements de propriétés mécaniques ne sont pas clairement identifiées, car aucune étude n'a caractérisé simultanément l'effet de l'arthrose sur la quantité de collagène, l'organisation des fibres, la quantité de GAGs et les propriétés mécaniques. De plus, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant les corrélations entre ces modifications. Plusieurs études suggèrent que la diminution (respectivement l'augmentation) de la quantité de GAGs

est responsable de la diminution (respectivement l'augmentation) de la rigidité des ménisques en compression (Fischenich *et al.*, 2014 et 2015a ; Kwok *et al.*, 2014). Cependant, à un stade précoce d'arthrose, les propriétés mécaniques des ménisques arthrosiques de lapin ne sont pas modifiées, alors que la quantité de GAGs augmente (Coatney *et al.*, 2015). De plus, dans les ménisques humains, la quantité de GAGs augmente avec l'arthrose (Herwig *et al.*, 1984 ; Pauli *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2012), alors que leur rigidité diminue (Katsuragawa *et al.*, 2010 ; Fischenich *et al.*, 2015b). Sur des ménisques de patients arthrosiques, Son *et al.* (2013) n'ont trouvé aucune corrélation entre la quantité de GAGs et le module à l'équilibre. Ils n'ont pas non plus trouvé de corrélation entre la quantité de collagène et le module à l'équilibre. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Fischenich *et al.* (2015b), qui n'ont pas observé de différence significative sur les propriétés en tension des ménisques avec l'arthrose, suggérant que les fibres de collagène ne sont pas altérées. Cependant, Katsuragawa *et al.* (2010) ont montré une désorganisation des fibres de collagène dans les ménisques arthrosiques médiaux, avec des fibres moins compactes et de diamètre plus faible, associée avec une diminution de l'*aggregate modulus*. Les modifications de propriétés mécaniques des ménisques semblent donc être dues à des processus complexes, impliquant à la fois les fibres de collagène et les GAGs, et dont la chronologie n'est pas encore connue.

2.4 Traitements de l'arthrose et des lésions méniscales

Plusieurs traitements existent pour réparer ou remplacer le ménisque lésé, ou pour soigner les symptômes liés à l'arthrose en général.

2.4.1 Réparation ou remplacement du ménisque

Jusqu'en 1970, la procédure la plus répandue pour traiter les lésions méniscales était la méniscectomie, qui était considérée comme bénigne (McDermott *et al.*, 2006 ; Papalia *et al.*, 2011 ; Fox *et al.*, 2015). Pourtant, en 1948, Fairbank a montré qu'une méniscectomie résultait en une détérioration du cartilage et en un développement progressif de l'arthrose. En effet, après une méniscectomie, l'aire de contact entre le fémur et tibia diminue d'environ 50% (Fukubayashi *et al.*, 1980 ; Ihn *et al.*, 1993) à 75% (Baratz *et al.*, 1986). Cela a pour effet d'augmenter le pic de pression de contact d'environ 235% (figure 1.15) (Baratz *et al.*, 1986) et d'augmenter les contraintes en compression au niveau de l'os sous-chondral, principalement dans le compartiment médial (Fukuda *et al.*, 2000).

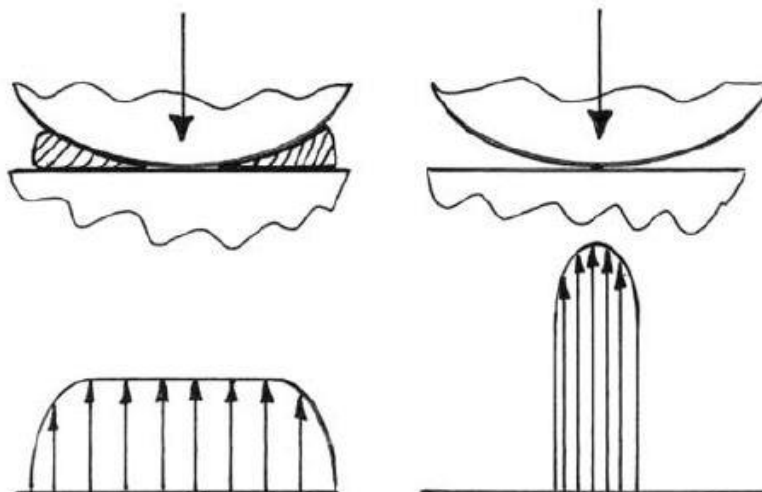


Figure 1.15 – Pressions de contact dans le cas de ménisques intacts (à gauche) et après méniscectomie (à droite) (Baratz *et al.*, 1986).

Dans les années 1980, plusieurs études ont montré qu'une méniscectomie partielle réduisait l'incidence d'arthrose par rapport à une méniscectomie totale (Papalia *et al.*, 2011). Elle est actuellement le gold standard pour traiter les lésions méniscales. Cependant, la quantité de ménisque enlevé est fortement associée avec le développement d'arthrose post-opératoire (Andersson-Molina *et al.*, 2002 ; Papalia *et al.*, 2011). Ainsi, lorsque les lésions sont très répandues dans le ménisque, il faut avoir recours à d'autres solutions. La transplantation méniscale allogénique, qui consiste à insérer un ménisque de cadavre pour remplacer un ménisque enlevé au cours d'une méniscectomie totale, est une opération courante (Tucker *et al.*, 2012). Cependant, cette technique a plusieurs inconvénients, notamment le risque de transmission de maladies infectieuses, le problème de disponibilité d'un greffon, la durée de remodelage, ou la taille nécessaire pour incorporer le greffon. La décellularisation du ménisque est une alternative prometteuse à la transplantation. Elle a pour objectif de réduire le pouvoir antigénique du ménisque, tout en préservant sa matrice extracellulaire et sa résistance mécanique initiale. Des cellules autologues peuvent ensuite être ensemencées sur sa surface. D'autres solutions incluent l'implant méniscal en collagène ou l'ingénierie tissulaire, mais nécessitent encore du développement.

2.4.2 Traitement contre l'arthrose

Les traitements contre l'arthrose ont pour objectifs de contrôler la douleur, d'améliorer la fonctionnalité du genou et de ralentir la progression de la maladie (American college of rheumatology, 2000 ; Haq *et al.*, 2003 ; Hunter et Felson, 2006a ; Zhang *et al.*, 2007). Ils incluent les thérapies non médicamenteuses, médicamenteuses et la chirurgie. La figure 1.16 montre la hiérarchie des traitements recommandée en fonction de la sévérité des symptômes (Hunter et Felson, 2006a). De nombreuses études cliniques ont été effectuées pour déterminer l'efficacité de chaque traitement sur les symptômes de l'arthrose et évaluer leurs effets secondaires (Walker-Bone *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2007).

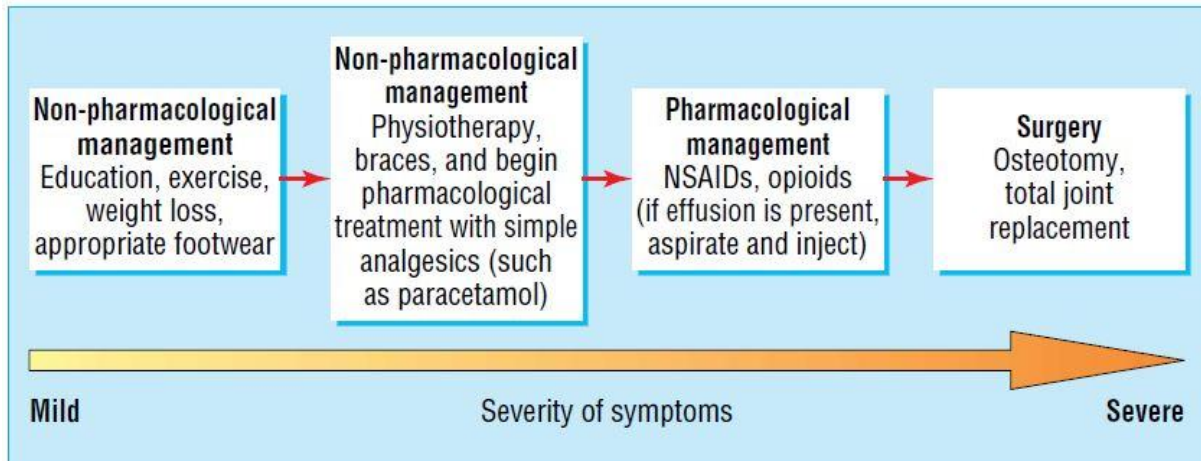


Figure 1.16 – Hiérarchie des traitements de l'arthrose en fonction de la sévérité des symptômes. NSAIDs : anti-inflammatoires non stéroïdiens (Hunter et Felson, 2006a).

Les thérapies non médicamenteuses, en particulier l'exercice et la perte de poids, ont pour effets de limiter la perte de masse musculaire due à l'inactivité, de renforcer les muscles, d'améliorer la flexibilité et le mouvement du genou, et de réduire l'invalidité et la douleur (Thomas *et al.*, 2002 ; Haq *et al.*, 2003 ; Messier *et al.*, 2004 ; Hunter et Felson, 2006a).

Lorsque la douleur persiste, elles sont complétées par des thérapies médicamenteuses, qui peuvent être orales (analgésiques, anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)...) ou intra articulaires. Parmi les thérapies orales, Altman (1999) a observé une meilleure efficacité des AINS pour diminuer la douleur, principalement lorsqu'elle est sévère. Ils permettent également d'améliorer la fonctionnalité du genou d'environ 15% (ACR, 2000). Cependant, ils peuvent avoir des effets secondaires rénaux et gastro-intestinaux, notamment chez les patients âgés (ACR, 2000 ; Haq *et al.* 2003). Une approche alternative à ces thérapies orales pour réduire la douleur et limiter les effets secondaires est la thérapie intra articulaire. Les principales injections possibles sont l'injection de glucocorticoïdes et l'injection d'acide hyaluronique (ACR, 2000, Uthman *et al.*, 2003).

Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont de puissants agents anti-inflammatoires (Uthman *et al.*, 2003), permettant de réduire la formation d'ostéophytes et de lésions cartilagineuses, et de limiter les modifications histologiques.

Acide hyaluronique

L'injection d'acide hyaluronique, appelée viscosupplémentation, consiste à remplacer l'acide hyaluronique dans l'articulation arthrosique, pour retrouver l'élasticité et la viscosité du liquide synovial sain. Cette thérapie, dont l'efficacité sur les ménisques a été évaluée dans cette thèse, est détaillée dans la section 2.4.3 (chapitre 1).

A court terme, l'acide hyaluronique et les glucocorticoïdes ont une efficacité similaire pour soulager la douleur, mais l'acide hyaluronique montre des avantages durables après 60 jours (Uthman *et al.*, 2003).

Les patients souffrant d'arthrose symptomatique sévère, dont la douleur n'a pas pu être réduite par les thérapies médicales et qui ont des limitations majeures dans les fonctions comme la marche ou les activités de la vie quotidienne, ont recours à la chirurgie (ACR, 2000 ; Hunter et Felson, 2006a). Plusieurs types d'interventions peuvent être effectués.

Arthroscopie

L'arthroscopie consiste à réaliser de très courtes incisions dans le genou afin d'insérer une fibre optique rigide reliée à une caméra, appelée arthroscope, et des instruments miniaturisés. Il est possible d'effectuer un lavage, c'est-à-dire l'élimination de l'excès de fluide et des débris (cartilagineux ou méniscaux) et l'introduction de saline, ou un débridement, qui consiste en plus à lisser la surface osseuse ou à réaliser des interventions plus invasives telles que la méniscectomie (Medical Advisory Secretariat, 2005). L'arthroscopie est efficace pour diminuer les symptômes dans le cas de lésions méniscales, mais ne permet pas de ralentir la progression de l'arthrose (ACR, 2000 ; Haq *et al.*, 2003).

Transplantation de cartilage autologue

La transplantation de cartilage autologue, qui consiste à prélever des greffons de cartilage normal aux bords de l'articulation, à les cultiver *in vitro* et à les réimplanter dans les zones dépourvues de cartilage, est une technique prometteuse mais trop coûteuse et non recommandée comme premier traitement (Haq *et al.*, 2003).

Ostéotomie

L'ostéotomie est une opération chirurgicale consistant à couper le tibia pour réaligner les os (Brouwer *et al.*, 2014). Elle permet d'améliorer la fonctionnalité du genou, de réduire la douleur et retarde la nécessité de poser une prothèse d'environ 5 à 10 ans (Hunter et Felson, 2006a).

Pose d'une prothèse

La pose d'une prothèse est une intervention irréversible, utilisée lorsque les autres traitements ont échoué (Hunter et Felson, 2006a). Elle assure un soulagement de la douleur et une amélioration nette de la fonctionnalité du genou pour la plupart des patients arthrosiques (ACR, 2000). Elle a un taux de réussite de 95% après 15 ans (Hunter et Felson, 2006a). Environ 38000 prothèses de genou sont posées chaque année en France en première intention (Le Pen *et al.*, 2005).

2.4.3 Viscosupplémentation

L'acide hyaluronique est un polysaccharide (β -D-glucuronyl- β -DN-acetylglucosamine) à haut poids moléculaire (Haq *et al.*, 2003 ; Watterson et Esdaile, 2000 ; Uthman *et al.*, 2003). C'est un composant majeur du liquide synovial et du cartilage, qui permet de faciliter l'absorption des chocs et la lubrification (Walker-Bone *et al.*, 2000 ; Uthman *et al.*, 2003). Un genou adulte sain contient environ 2 mL de liquide synovial (Strauss *et al.* 2009), avec de l'acide hyaluronique de concentration 2.5 à 4 mg/mL et de poids moléculaire 5000 à 7000 kDa (Watterson et Esdaile., 2000). Avec l'arthrose, la concentration

et le poids moléculaire de l'acide hyaluronique diminuent de 33% à 50%, réduisant sa viscosité dynamique et ses propriétés élastiques. L'objectif de la viscosupplémentation est de suppléer la diminution d'acide hyaluronique naturel pour améliorer la viscosité du liquide synovial (Strauss *et al.*, 2009). Ses mécanismes d'action ne sont pas encore clairement déterminés ; il est supposé être anti-inflammatoire, analgésique et avoir un effet chondroprotecteur sur le cartilage articulaire et le liquide synovial (Watterson et Esdaile, 2000). Il existe plusieurs formulations injectables d'acide hyaluronique, qui diffèrent notamment par leur plan de traitement (entre 3 et 5 injections par semaine), leur poids moléculaire (entre 500 et 6000 kDa) et leurs propriétés rhéologiques (Strauss *et al.*, 2009). L'acide hyaluronique peut être associé à d'autres substances, telles que le chitosan, qui est un produit d'avenir (Oprenyeszk *et al.*, 2015).

L'efficacité clinique de l'acide hyaluronique est assez controversée dans la littérature, avec des études montrant une diminution de la douleur et une amélioration de la fonctionnalité du genou suite à l'injection, alors que d'autres ne trouvent pas de différence par rapport à un traitement placebo (Ayhan *et al.*, 2014). Strauss *et al.* (2009) ont montré que pour être efficace, l'injection intra-articulaire devait être effectuée le plus tôt possible dans le traitement de la pathologie. Plusieurs études ont été réalisées sur des modèles d'arthrose animaux pour évaluer l'efficacité du traitement sur les propriétés des tissus articulaires (Edouard *et al.*, 2013). Au niveau du ménisque, il n'a pas été observé d'effet du traitement sur l'occurrence de lésions (Sonoda *et al.*, 2000) ni sur la quantité de collagène (Hope *et al.*, 1993), mais il a été montré une préservation de la quantité de GAGs et de PGs (Hope *et al.*, 1993 ; Sonoda *et al.*, 2000). Aucune étude ne s'est intéressée à l'effet de ce traitement sur les propriétés mécaniques des ménisques.

Conclusion du chapitre

Ce premier chapitre permet de souligner le rôle essentiel du ménisque dans l'articulation et les fortes relations existant entre sa composition biochimique, sa microstructure et ses propriétés mécaniques. Une modification structurale et chimique de sa matrice extracellulaire a des répercussions importantes sur son comportement mécanique. Ce chapitre met également en évidence la difficulté de diagnostiquer précocement et de traiter l'arthrose. Les traitements actuels consistent principalement à soigner les symptômes ; leurs effets à l'échelle du tissu ont été peu étudiés. Pour développer un traitement efficace, il est nécessaire de comprendre les mécanismes de dégradation des tissus articulaires, dès les premiers stades de développement de la pathologie. L'effet de l'arthrose sur la microstructure et les propriétés mécaniques des ménisques a fait l'objet de peu d'études ; les causes et mécanismes d'altération ne sont donc pas encore clairement déterminés. Ces questions font l'objet de ce travail de thèse.

CHAPITRE 2 – EFFETS MECANIQUE ET MICROSTRUCTURAL DE L'ARTHROSE : ETUDE PRELIMINAIRE

Introduction du chapitre

L'étude bibliographique (chapitre 1) a montré que le comportement mécanique du ménisque sain était anisotrope et que ses propriétés étaient hétérogènes, dépendaient du site anatomique et qu'elles étaient principalement gouvernées par l'organisation et l'architecture de ses constituants. Les propriétés mécaniques du ménisque arthrosique et leur variabilité sont quant à elles moins connues. De plus, elles n'ont jamais été corrélées avec l'intégrité de sa matrice extracellulaire, en termes à la fois d'organisation du collagène et de quantité de GAGs. Dans ce cadre, ce chapitre présente une étude préliminaire couplant essais mécaniques et caractérisation microstructurale, effectuée sur trois individus. Elle a pour objectifs (1) d'identifier les sites anatomiques (médial, latéral), régions (antérieure, postérieure) et directions de sollicitation (verticale, circonférentielle) du ménisque (figure 1.2) les plus affectés par l'arthrose et (2) de corrélérer les modifications mécaniques et microstructurales par différentes techniques expérimentales, afin de ne conserver que les localisations, directions de sollicitation et techniques de caractérisation les plus pertinentes pour les études ultérieures.

Cette étude préliminaire a été réalisée sur trois lapins ayant subi une rupture du ligament croisé antérieur (ACLT) de la patte gauche. Elle fait partie d'une étude plus globale extérieure à ce travail de thèse, visant à évaluer l'efficacité de plusieurs traitements. Ainsi, les lapins non traités, utilisés ici, ont subi une injection de solution saline dans la patte opérée toutes les semaines. Pour limiter le nombre d'individus dans cette étude et pour des raisons éthiques, la patte droite, qui n'a pas été opérée, a été choisie comme contrôle et sera dénommée par la suite « patte controlatérale ».

Plusieurs localisations et directions ont été caractérisées dans cette étude préliminaire ; elles sont définies par le schéma récapitulatif de la figure 2.1. En effet, afin de déterminer si le ménisque médial postérieur, qui est généralement le plus lésé, est également le plus affecté mécaniquement, les ménisques médial et latéral ont été testés et la région postérieure a été comparée à la région antérieure. Comme la transmission des efforts au sein de l'articulation est principalement assurée par les fibres de collagène circonférentielles, les essais mécaniques ont été effectués dans la couche centrale des ménisques. De plus, étant donné l'orientation préférentielle des fibres, les propriétés mécaniques sont différentes entre la direction circonférentielle, qui est parallèle aux fibres, et la direction verticale, qui est normale aux fibres. Ces deux directions de sollicitation ont donc été étudiées pour déterminer si elles étaient affectées de la même façon par l'arthrose. En première approche, la rigidité locale des

ménisques opérés et non opérés, dans les régions antérieure et postérieure, a été estimée en calculant le module à la décharge à partir d'essais d'indentation effectués dans les deux directions. En effet, ce test mécanique a comme principaux avantages d'être rapide, non destructif et de permettre un calcul direct du module à partir de la courbe Force – Déplacement.

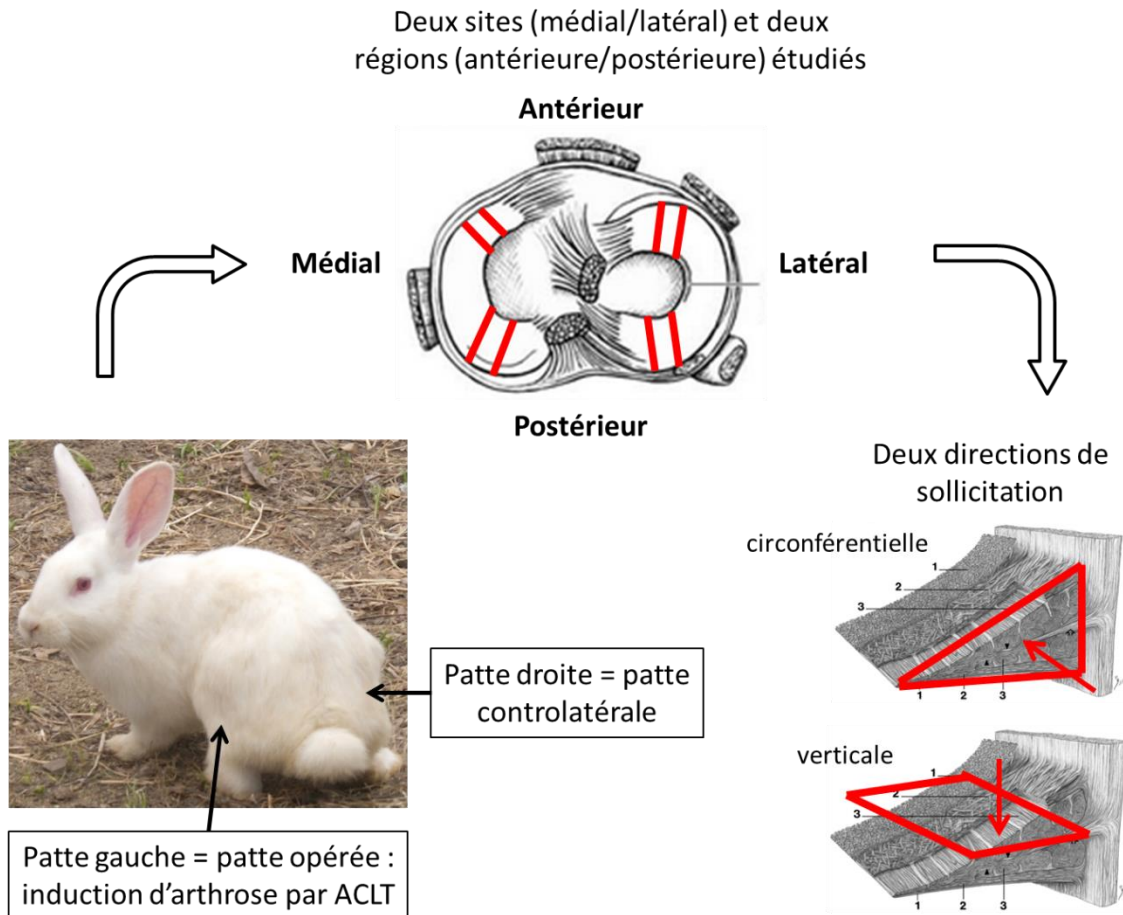


Figure 2.1 – Etude préliminaire : définition des pattes opérée et controlatérale, des sites et régions d'études, et des directions de sollicitation.

Pour expliquer les changements de propriétés mécaniques entre les ménisques controlatéraux et opérés, les modifications microstructurales de ces ménisques ont ensuite été examinées dans les deux régions, à travers plusieurs techniques de caractérisation : microspectroscopie confocale Raman pour analyser la composition chimique des échantillons, microscopie confocale biphotonique pour accéder à l'organisation des fibres de collagène et histologie pour déterminer la quantité de GAGs.

Après une présentation des différentes techniques de caractérisation utilisées et du traitement statistique des données, les résultats de cette étude, qui ont fait l'objet d'une publication, seront exposés.

1. Techniques de caractérisation et traitement statistique des données

1.1 Caractérisation mécanique : essais d'indentation et détermination du module à la décharge

L'indentation est une technique très utilisée pour obtenir les propriétés mécaniques locales d'un matériau. Elle consiste à faire pénétrer une pointe, de géométrie connue, dans un matériau et à enregistrer le signal force – déplacement. Le dispositif d'indentation utilisé ici a été développé spécifiquement pour caractériser les tissus mous, tels que la peau (Pailler-Mattei *et al.*, 2014). Ce dispositif est composé de plusieurs éléments, pour assurer le déplacement de l'indenteur pendant la phase de positionnement vis-à-vis de l'échantillon, puis pendant la phase de test. Un système de manivelle et vis sans fin permet d'effectuer une approche manuelle de l'indenteur vers l'échantillon. Une table micro-métrique, avec une course de 5 mm et une résolution de 0,05 μm , est utilisée pour la phase de détection du contact. Enfin, le déplacement de l'indenteur au cours du test s'effectue par l'intermédiaire d'une platine piezo-électrique, dont la course est de 1500 μm et la résolution est de 3 nm. La force est mesurée par un capteur d'effort en S, dont la plage de mesure est de 100 mN avec un bruit de mesure de 0,01 mN. Pour éviter les phénomènes d'adhésion entre la pointe et l'échantillon, et pour assurer l'hydratation des ménisques, les essais se font en milieu liquide, avec une pointe sphérique de rayon 0,5 mm.

Le module est déterminé avec la méthode développée par Oliver et Pharr (1992), qui permet de calculer le module élastique d'un matériau homogène et isotrope, sur un cycle de charge – décharge. Même si le ménisque ne rentre pas dans le cadre de ces hypothèses, cette méthode permet de comparer les propriétés mécaniques dans les différentes localisations et directions. Le module réduit, E_R , est calculé à partir de la pente à la décharge, S , défini par la relation (2.1) :

$$S = \frac{dP}{dh} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} E_R \sqrt{A} \quad (2.1)$$

où P est la force, h est la pénétration et A est l'aire de contact. Pour une pointe sphérique de rayon R , cette aire de contact est $A = \pi h R$. Le module réduit est ensuite relié au module du matériau selon la relation 2.2.

$$\frac{1}{E_R} = \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \quad (2.2)$$

où E_1 et E_2 sont respectivement les modules élastiques du matériau et de l'indenteur, et ν_1 et ν_2 sont respectivement les coefficients de Poisson du matériau et de l'indenteur. Ici, l'indenteur est très rigide par rapport au ménisque, on peut donc négliger son module élastique dans le calcul de E_R , ce qui donne

$$E_R = \frac{E}{1 - \nu^2} \quad (2.3)$$

avec E et ν respectivement le module et le coefficient de Poisson du matériau.

1.2 Caractérisation chimique : microspectroscopie confocale Raman

La spectroscopie Raman est une technique de spectroscopie vibrationnelle, permettant d'étudier la composition moléculaire d'un matériau (Movasaghi *et al.*, 2007). Elle a l'avantage d'être non invasive et non destructive. Elle consiste à exciter les molécules d'un matériau avec un laser monochromatique, ce qui va induire de la diffusion Raman. Lorsque l'énergie du photon incident n'est pas altérée par la collision avec la molécule, le photon diffusé possède la même longueur d'onde que le photon incident. C'est ce qu'on appelle la diffusion élastique ou diffusion de Rayleigh. Quand l'énergie du photon est transférée à la molécule, ou inversement, le photon diffusé n'a pas la même énergie que le photon incident. C'est la diffusion inélastique ou diffusion Raman. Un spectre Raman consiste à représenter l'énergie diffusée par les photons en fonction de la différence de fréquence entre le photon incident et le photon diffusé. La fréquence correspond à l'inverse de la longueur d'onde et cette différence de fréquence est appelée shift Raman. Les fréquences des pics du spectre Raman peuvent dans la plupart des cas être associées à la vibration de liaisons chimiques particulières dans une molécule, et permettent de déterminer la composition moléculaire du matériau.

Les spectres ont été obtenus au microscope confocal Raman LabRAM HR 800 (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France), avec un objectif 40X à immersion pour assurer l'hydratation des échantillons. Le Raman dispose de 3 lasers, à 532 nm, 633 nm et 785 nm. Le laser à 532 nm a été utilisé, car il génère moins d'autofluorescence que le laser à 633 nm et permet une acquisition plus rapide que le laser à 785 nm. Les pics caractéristiques du collagène (Takahashi *et al.*, 2014 ; Esmonde-White *et al.*, 2009) et de la minéralisation (Katsamenis *et al.*, 2012) ont été étudiés.

1.3 Caractérisation microstructurale : microscopie confocale multiphoton

La microscopie multiphoton est une technique d'imagerie non invasive permettant d'observer des tissus en profondeur, avec une résolution de l'ordre du μm (Nikon). Elle est particulièrement adaptée pour l'imagerie des tissus du vivant. Cette technique repose sur un principe physique démontré par Maria Goppert – Mayer en 1931, selon lequel un atome excité par deux photons de même longueur d'onde λ , a une excitation effective équivalente à l'absorption d'un photon de longueur d'onde $\lambda/2$ (Göppert-Mayer, 1931). Ainsi, un fluorophore qui absorbe normalement la lumière dans les ultraviolets (environ 350 nm), pourra être excité avec un laser infrarouge à 700 nm. Ce phénomène suppose que les deux photons arrivent au même point dans un laps de temps très court, de l'ordre de la dizaine de femtosecondes. On utilise pour cela des lasers infrarouges pulsés très puissants. La rencontre des deux photons se produit uniquement au plan focal de l'objectif. Ainsi, la lumière

d'excitation n'est pas atténuée par l'absorption des fluorophores, puisque les plans de part et d'autre du plan focal recevront uniquement de la lumière infrarouge. On récupère ensuite les signaux émis par les fluorophores grâce à des filtres ayant une certaine plage de longueurs d'ondes. Il est ainsi possible d'exciter plusieurs fluorophores simultanément et de distinguer leurs signaux en utilisant des filtres spécifiques, à condition que leurs spectres d'émission soient relativement disjoints. Par ailleurs, certaines molécules, telles que le collagène, génèrent de la seconde harmonique (SHG). Lorsqu'elles sont excitées à une longueur d'onde λ , elles émettent des photons à $\lambda/2$. En utilisant un laser accordable, il est possible de choisir la longueur d'onde de façon à distinguer les signaux provenant de la SHG ou de l'autofluorescence.

Avec cette technique de microscopie, le tissu peut être imagé en profondeur en déplaçant le point focal. La concaténation des images de chaque plan constitue un stack. La microscopie multiphoton permet d'atteindre des profondeurs plus élevées que la microscopie confocale classique, puisque les photons infrarouges sont plus pénétrants que les photons dans la lumière du visible. De plus, le rapport signal/bruit est augmenté.

Les stacks d'images ont été réalisés au microscope confocal multiphoton A1R MP PLUS® (Nikon), avec une longueur d'onde de 850 nm. Les fibres de collagène ont été observées par SHG et les fibres d'élastine par autofluorescence. L'organisation de ces fibres a été caractérisée qualitativement à partir de reconstructions en 3 dimensions (NIS element viewers) et de projections des stacks selon l'axe Z pour former une image en 2 dimensions dont chaque pixel correspond au maximum d'intensité de l'ensemble des images (ImageJ).

1.4 Caractérisation histologique

L'histologie est une technique permettant d'étudier la structure et la composition de tissus biologiques. Elle se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'échantillon à étudier est fixé dans le formol, afin de le conserver proche de son état *in vivo*. Il est ensuite inclus en paraffine, puis découpé sur une épaisseur de l'ordre de 5 μm . Plusieurs coupes peuvent être effectuées sur le même échantillon. Ces coupes sont posées sur des lames, que l'on colore en fonction des constituants à observer. Pour étudier la quantité de GAGs, les lames sont colorées à la Safranin – fast green (Killian *et al.*, 2000a). Les GAGs apparaissent en rouge tandis que le reste du tissu est bleu. Les coupes sont ensuite observées au microscope optique, puis la proportion de GAGs est déterminée en calculant le ratio de la surface rouge par rapport à la surface totale (ImageJ).

1.5 Analyse statistique des données

L'étude a été effectuée sur un faible nombre d'individus indépendants ($n=3$), on utilise donc un test d'hypothèse non paramétrique, qui n'impose pas de connaître la loi de distribution des données (Grosjean et Dommergues, 2011). Pour tenir compte de la dépendance entre les deux pattes pour chaque lapin, on travaille sur les ratios entre les valeurs de la patte gauche et de la patte droite. On compare les 3 ratios avec une population composée

de 1, qui représenteraient des individus sans modification des propriétés. Le test approprié pour cette étude est le test de Mann-Whitney, avec un seuil de significativité de 0,05.

2. Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis¹

Levillain A.^a, Boulocher C.^b, Kaderli S.^c, Viguier E.^b, Hannouche D.^d, Hoc T.^a, Magoaric H.^a

^aLTDS, UMR CNRS 5513, Université de Lyon, Ecole centrale de Lyon, 36 av Guy de Collongue, 69134 Ecully Cedex, France.

^bResearch unit ICE, UPSP 2011.03.101, Université de Lyon, veterinary campus of VetAgro Sup, 69 280 Marcy l'Etoile France.

^cSchool of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva and Lausanne, Quai Ernest-Ansermet 30, 1211 Geneva, Switzerland

^dB2OA, UMR CNRS 7052 CHU Lariboisière Saint Louis, 10 av de Verdun, 75020 Paris France.

Corresponding author: thierry.hoc@ec-lyon.fr

¹Article publié dans Osteoarthritis and Cartilage, volume 23, pages 1186-1193, 2015.

Abstract

Objective: The purpose of this study was to analyze the early biomechanical alterations of menisci during the early stage of OA development and to correlate them with the chemical composition and matrix alteration. A particular focus was paid to pathological changes in glycosaminoglycan (GAG) content and collagen fiber architecture.

Design: Menisci (n=24) were removed from rabbits' knee joints six weeks following surgical anterior cruciate ligament transection (ACLT). Both the anterior and posterior regions of medial and lateral menisci were characterized using indentation tests, Raman microspectroscopy, biphotonic confocal microscopy and histology.

Results: Mechanical and matrix alterations occurred in both regions of medial and lateral menisci. A significant decrease in the mechanical properties was observed in OA menisci, with a mean reduced modulus from 2.3 to 1.1 MPa. Microstructural observations revealed less organized and less compact collagen bundles in operated menisci than in contralateral menisci, as well as a loss of fiber tension. GAG content was increased in OA menisci, especially in the damaged areas. Neither changes in the secondary structure of collagen nor mineralization were detected through Raman microspectroscopy at this stage of OA.

Conclusion: ACLT led to a disorganization of the collagen framework at the early stage of OA development, which decreases the mechanical resistance of the menisci. GAG content increases in response to this degradation. All of these results demonstrate the strong correlation between matrix and mechanical alterations.

Keywords: Meniscus; Osteoarthritis; Indentation; Collagen; Glycosaminoglycan

Introduction

Menisci play a fundamental role in the load distribution within the knee. They transmit more than 50% of the total load applied in the human joint and ensure its congruence (Makris *et al.* 2011). When these functions are not fulfilled efficiently, particularly due to meniscus degradation, the contact stresses in the meniscal compartments increase (Hunter *et al.*, 2006b), leading to cartilage loss and subchondral bone defects (Hunter *et al.*, 2006b; Iijima *et al.*, 2014). These alterations contribute to the progression of osteoarthritis (OA). To prevent this occurrence, knowledge of how menisci are damaged is necessary.

Meniscal lesions are very common in human knees in advanced-stage OA. Their pattern and regional variation have been extensively studied macroscopically or through magnetic resonance imaging (Berthiaume *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2007; Zarins *et al.*, 2010). Over the past decade, further investigations have been conducted into the chemical, microstructural and mechanical alterations of human menisci. They revealed alteration of the mechanical properties (Katsuragawa *et al.*, 2010; Kwok *et al.*, 2014), disorganization of the collagen network (Katsuragawa *et al.*, 2010; Pauli *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012), formation of calcifications (Pauli *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2010) and controversial changes in glycosaminoglycan (GAG) and collagen contents (Kwok *et al.*, 2014; Pauli *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). However, in these studies, the severity of OA damage makes it difficult to determine the chronology of the different components' degradation and their relation to the mechanical impairment. It is thus necessary to analyze the tissue at an early stage of OA, using animal models.

Anterior, i.e., cranial, cruciate ligament transection (ACLT) in rabbits is among the most suitable models of early OA in humans (Madry *et al.*, 2012). It has been widely used to evaluate early structural changes in cartilage (Mäkelä *et al.*, 2014; Turunen *et al.*, 2013), but to date, only a few studies have focused on the meniscus (Sonoda *et al.*, 2000; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a). Recently, one study focused on the mechanical properties and GAG content of rabbit menisci in a mixed model, using both ACL and menisci transections (Fischenich *et al.*, 2014). A decrease in the compressive moduli and GAG content were found after 12 weeks. However, Hellio Le Graverand *et al.* (2001a) found inconsistent results when the menisci were left intact during the ACLT procedure. GAG content increased during the early stage following ACLT, at three and eight weeks. A loss of orientation of the collagen fibers, which are also involved in the mechanical resistance of the menisci (Vanderploeg *et al.*, 2012), occurred as well. The role of GAGs and collagen fibers in the compression properties of the menisci is extremely controversial in the literature (Fischenich *et al.*, 2014; Kwok *et al.*, 2014; Sanchez-Adams *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2013). Hence, the effect of these complex alterations on the mechanical properties of the menisci is still unknown.

The aim of this study was to analyze the early changes in the mechanical properties of OA rabbit menisci following ACLT and to correlate them with matrix alterations. Attention was paid to variations between the frequently affected posterior region (Pauli *et al.*, 2011) and

the anterior region. The mechanical properties, chemical composition, collagen fiber organization and GAG content were assessed through microindentation, Raman microspectroscopy (RM), biphotonic confocal microscopy (BCM) and histology, respectively.

2.1 Material and method

2.1.1 Animal model

The experimental work on animals was performed in the experimental medicine and surgery center of the Claude Bourgelat Institute, under the authorization of the ethical committee of VetAgro Sup (Lyon, authorization number 1373) and in full accordance with European legislation. Six healthy adult (five months of age, 3.7 kg on average) male New Zealand white rabbits provided by Centre Lago (Vonnas, France) were used. After two weeks in acclimation and quarantine, experimental OA was surgically induced in the left knee by ACLT, by a trained veterinary surgeon.

Before surgery, the animals received subcutaneous injections of Borgal® (sulfadoxine and trimethoprim) 30 mg/kg twice, morphine 0.1 mg/kg, and Meloxidyl® (meloxicam) 0.4 mg/kg. Deep anesthesia was induced by intra-muscular (IM) injection of Ketamine 1000® 40 mg/kg and Domitor® (medetomidine) 80 µl/kg IM and then maintained by isoflurane 1-3.5% administered via endotracheal intubation. After careful shaving and disinfection (Vetedine® solution and soap), ACLT was performed on the left leg with a lateral approach (Vignon *et al.*, 1987), and the right knee was left intact. The complete rupture of the anterior cruciate ligament was assessed with the anterior drawer sign (manual horizontal dislocation) before the closure of the articular capsule. The operated leg was not immobilized, and rabbits were allowed to move freely in their individual cages after the surgery. For the purposes of this paper, the term “operated” will be used for the left ACLT knee and the term “contralateral” for the right non-operated knee. “Contralateral” term was preferred to “healthy” term as menisci can be affected due to possible weight transfer.

2.1.2 Postoperative care

The rabbits received buprenorphine 0.01 mg/kg SC for four days, Emeprid® (metoclopramide) 0.5 mg/kg SC for three days, Borgal® 15 mg/kg SC bid for nine days and Feligastryl® 1cp/day for three days. Cothivet® spray was applied to the wound for six days after surgery. Veterinarians closely monitored recovery, and a careful clinical follow-up was performed every other day. These postoperative cares reduced pain and prevented the lameness. All rabbits fully recovered from the surgery. After a six-week observation period (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a; Nisbet *et al.*, 2010; Yoshioka *et al.*, 1996), the rabbits were sacrificed by Dolethal® (pentobarbital) 1 ml/kg intra-vascular after being chemically restrained by IM injection of Ketamine 1000® 40 mg/kg and Domitor® 80 µg/kg. After a careful dissection of both knees, the menisci were detached from their attachments.

2.1.3 Experimental procedures

Immediately after removal, the menisci from three of the six rabbits were rinsed in Phosphate Buffered Solution (PBS) without calcium and magnesium and then fixed in 10% formalin for GAG quantification. Menisci were then embedded in paraffin and 4 μm -thick sections parallel to the tibial surface were sliced using a Microm HM 340 E microtome. In each sample, two representative slices (100 μm apart) were stained with Safranin O-fast green (SOFG), which turns GAG red, and hematoxylin/eosin (HE), which turns nuclei black and cytoplasm blue/green.

The menisci (n=12) from the remaining three rabbits were stored at -20°C into wet compresses soaked into 10X PBS until they were utilized for subsequent biomechanical and micro-architectural analyzes. After thawing the menisci for one day in a refrigerator at 4°C , two slices measuring 2 mm wide were cut with a scalpel in anterior and posterior regions (Figure 2.2A). First, indentation tests in the circumferential direction, BCM, and RM were performed on the (x,z) plane, denoted radial plane (Figure 2.2B). Second, each sample was cut parallel to the tibial meniscal surface, approximately 1 mm from this surface. Indentation tests in the vertical direction and BCM were performed on the (x,y) plane, denoted tibial plane (Figure 2.2C).

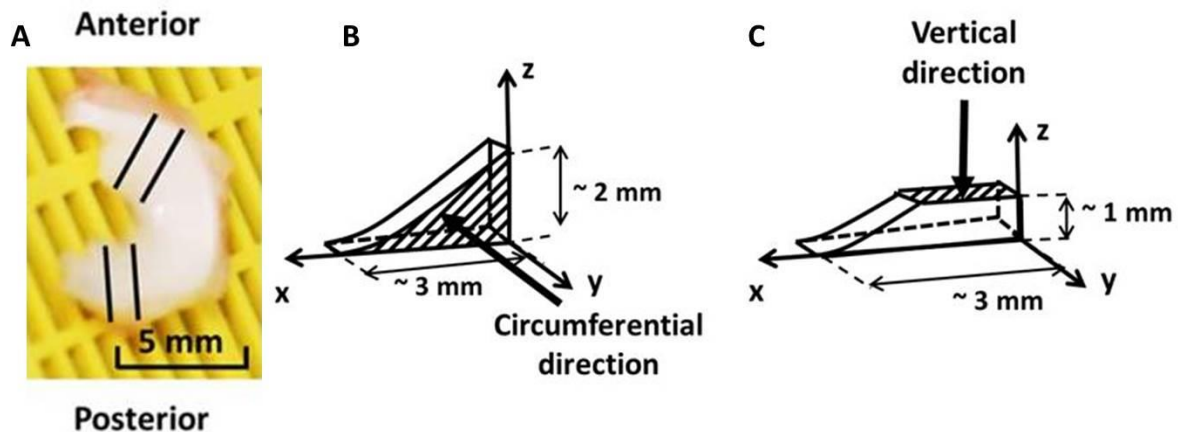


Figure 2.2 – Sample preparation procedure: A) optical image of a right lateral meniscus (contralateral) and localization of the two studied regions B) first cutting plane (the radial plane is hatched) and representation of the circumferential direction, C) second cutting plane (the tibial plane is hatched) and representation of the vertical direction.

2.1.4 Indentation tests

Indentation tests were performed on meniscus samples immersed in 10X PBS, at ambient temperature, using a homemade device developed by Mattei *et al.* (2014). The indenter was a spherical polytetrafluoroethylene tip, with a radius of curvature, R , of 0.485 mm. The opposite face of indentation was glued onto a petri dish (glue 3, Loctite®). Along each direction, indentation tests were conducted on three locations in the center of the sample, composed of circumferential fibers (Petersen and Tillmann, 1998), with a minimum spacing

of 200 μm between two locations. Each test was repeated three times successively for each point and difference between reduced moduli was always less than 5%. To ensure reliability of the measurement, a reference material in Polymethyl methacrylate was indented before each series of tests on a given meniscus sample. For the loading path, a constant displacement rate of 2 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ and a maximum force of 1 mN were imposed to avoid surface and fibers disruption effects. The unloading path was carried out at the same displacement rate. For all indentation curves, the slope S at the initial point of the unloading part was determined and the reduced modulus, E_R , was calculated using Hertz theory (Oliver and Pharr, 1992) (Figure 2.3, eq. 2.4)

$$E_R = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{A}} = \frac{S}{2\sqrt{\delta R}} \quad (2.4)$$

where A is the Hertz contact area and δ is the maximal penetration. We assumed that the beginning of penetration corresponded to a displacement at 0.05 mN force.

In the present study, for each meniscus sample, only one value corresponding to the average of the 9 moduli (3 points with 3 measurements each) was considered.

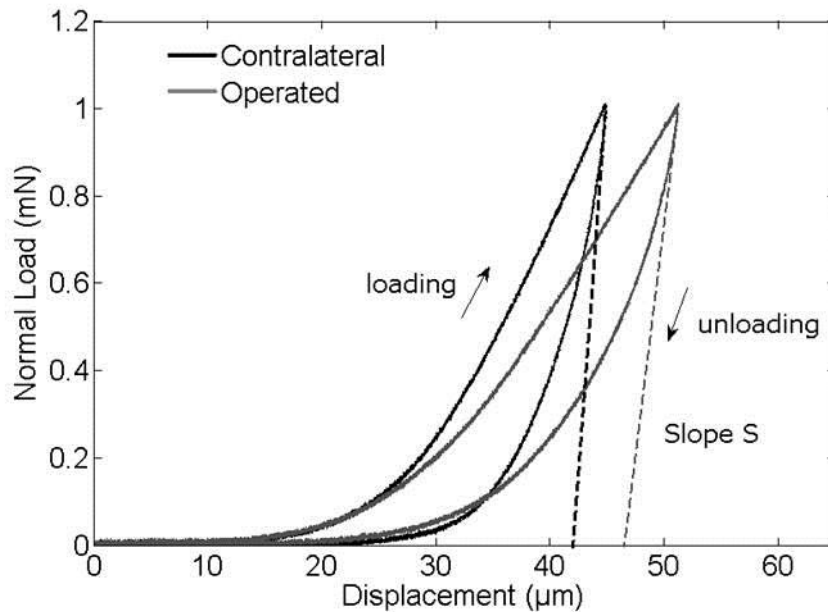


Figure 2.3 – Typical indentation curves of contralateral (black) and operated (grey) menisci. The dotted line represents the tangent (i.e., Slope S) to the curve at the initial point of the unloading part.

2.1.5 Assessment of heterogeneity of the mechanical properties

The heterogeneity of the mechanical properties was assessed using three ratios.

The effect of meniscus microstructure, which predominantly consists of circumferential fibers, was assessed using the ratio between circumferential and vertical moduli E_r , denoted R_{ani} (ratio of anisotropy). For each knee, R_{ani} value averaged four ratios

from measurements performed in Medial-Posterior, Medial-Anterior, Lateral-Posterior and Lateral-Anterior locations. According to this definition, $R_{ani} = 1$ would correspond to an isotropic behavior.

The effect of regional location was assessed using the ratio between posterior and anterior moduli E_r , denoted R_{reg} . For each knee, R_{reg} value averaged four ratios from measurements performed in Medial-Vertical, Medial-Circumferential, Lateral-Vertical and Lateral-Circumferential directions. According to this definition, $R_{reg} = 1$ would correspond to a homogeneous meniscus.

Finally, the effect of anatomical site was assessed using the ratio between lateral and medial moduli E_r , denoted R_{site} . For each knee, R_{site} value averaged four ratios from measurements performed in Posterior-Vertical, Posterior-Circumferential, Anterior-Vertical and Anterior-Circumferential directions. According to this definition, $R_{site} = 1$ would correspond to the same behavior for medial and lateral menisci.

2.1.6 Chemical analyses

RM (LabRAM HR 800, Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) was used in wet conditions on the radial plane. This technique uses Raman inelastic scattering to obtain information on the chemical composition of the material (Morris and Mandair, 2011). A 532-nm laser was used to excite the electrons within the material. The 40X immersion objective (LUMPLFLN 40XW, Olympus) and numerical aperture (NA) of 0.8 produced a laser spot approximately 0.8 μm in diameter. The acquisitions were made on the spectral range of 350 cm^{-1} - 1750 cm^{-1} , with an integration time of 30 s and one accumulation. Three spectra were acquired for each point, and six points were analyzed in all samples. The spectra were de-spiked, and the background was subtracted using a user-defined baseline correction routine in Matlab (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA). Next, three spectra per point were averaged, and the resulting spectrum was smoothed using a sliding average over seven points algorithm in a Matlab routine. Finally, spectra were normalized to the phenylalanine ring breathing band intensity at 1004 cm^{-1} , which is distinct and constant between samples (Kuzuhara, 2006).

2.1.7 Microstructural observation

The collagen microstructure was observed through BCM (A1R MP PLUS®, Nikon), using an excitation wavelength of 850 nm. Second harmonic generated light from collagen and autofluorescent light from elastin were collected on two channels with specific band-pass filters of 400–490 and 500–550 nm, respectively. A 25X, 1.1 NA water immersion objective (CFI Apo LWD 25XW, Nikon) was used. The image field of view was $512 \times 512 \mu\text{m}^2$ with a resolution of 0.5 μm . For the radial plane, a mosaic image was built along z-axis in the sample center. For the tibial plane, three and two consecutive areas along the x-direction and y-direction, respectively, were imaged in the center of the sample. To scan the thickness of the meniscus, stacks of 2D images were recorded in each area, with a time scan of 2 s and an

average of two scans per image, every 2 μm from 0 to 200 μm in depth. Finally, the whole stack of 2D images was projected using ImageJ 1.47v (NIH, Bethesda, Maryland, USA) on a single slice (Rasband, 2014). Each pixel of the output image contained the maximum value over all images in the stack at the particular pixel location. 3D reconstructions of image stacks of tibial plane acquisitions were performed using NIS-element Viewer (Nikon Instruments Europe B.V, France).

2.1.8 Detection of GAGs

Histological sections were imaged using an Eclipse TS100 microscope and a DS-FI2 color camera (Nikon instruments). The successive images were assembled using MosaicJ-ImageJ. Red coverage of SOFG staining was semi-quantitatively analyzed using ImageJ (Killian *et al.*, 2000a). Color images were first converted to Red-Green-Blue stacks and viewed as gray-scale images under green stack. Tissue appeared light and SOFG-positive stained regions appeared dark. Images were analyzed using the threshold function with a black to red ratio of 1:3. The percentage of GAG coverage was then measured for each section.

2.1.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A Wilcoxon rank sum test was used for all analyses (level of significance $\alpha=0.05$). Three rabbits contributed to both contralateral and operated groups. To assess mechanical heterogeneity, the analysis unit was a knee and 3 independent observations were considered. Thus, within each group, ratios of anisotropy (n=3), regional (n=3) and site variations (n=3) were each compared to 1. To assess the effect of OA on the global reduced modulus, the analysis unit was an animal and 3 independent observations were considered. Ratios between operated and contralateral mean reduced moduli of each animal (n=3) were each compared to 1.

2.2 Results

2.2.1 Mechanical properties

For both groups, mean reduced moduli were obtained by averaging the 8 local moduli per knee, corresponding to each site, region and direction. The average reduced modulus of operated menisci (1.1 ± 0.2 MPa) significantly decreased with OA ($p=0.03$). It was about two times lower than in contralateral menisci (2.3 ± 0.69 MPa).

2.2.2 Effect of OA on the heterogeneity of meniscus mechanical properties

R_{ani} , R_{reg} and R_{site} , are presented in Table 2.1, for both groups.

R_{ani} values were significantly ($p=0.03$) higher than 1 in contralateral and operated menisci. Surprisingly, the ratios of the contralateral and operated menisci had closed mean

values of 1.93 and 2.23, respectively. For both groups, the menisci were significantly more resistant in circumferential direction.

R_{reg} values were significantly lower than 1 ($p=0.03$) in contralateral and operated menisci. The ratios were similar between contralateral and operated menisci, with mean values of 0.42 and 0.39, respectively. This result means that contralateral and operated menisci were significantly less resistant in the posterior region.

R_{site} was not significantly different ($p=0.3$) from 1 in contralateral or operated menisci, with mean values of 1.21 and 1.07, respectively.

Mean ratio	R_{ani}	R_{reg}	R_{site}
Contralateral	1.93 ± 0.64 ($p = 0.03$)	0.42 ± 0.23 ($p = 0.03$)	1.21 ± 0.51 ($p = 0.3$)
Operated	2.23 ± 0.16 ($p = 0.03$)	0.39 ± 0.13 ($p = 0.03$)	1.07 ± 0.77 ($p = 0.3$)

Table 2.1 – Rani ratio between the moduli in circumferential and vertical directions (n=3), Rreg ratio between the moduli in posterior and anterior regions (n=3) and Rsite ratio between the moduli in medial and lateral sites (n=3), for contralateral and operated menisci. In each knee, Rani, Rreg and Rsite averaged the 4 dependent ratios, corresponding to the sites/regions, sites/directions and regions/directions, respectively. Results are presented as the mean \pm standard deviation. P corresponds to ratio vs 1.

2.2.3 Chemical composition

Typical Raman spectra of contralateral and operated menisci are given in Figure 2.4. The main collagen bands were proline ring (857 cm^{-1}), hydroxyproline ring (877 cm^{-1}), the vibrational modes of amide III structures ($1220\text{-}1280 \text{ cm}^{-1}$), C-H bond bending mode ($1447\text{-}1452 \text{ cm}^{-1}$) and vibrational modes of amide I structures ($1600\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$). Raman spectral signature was not significantly modified at this stage of OA. Peaks assigned to hydroxyapatite (HA) (960 cm^{-1}) and calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) (1049 cm^{-1}) crystals were not identified in either contralateral or operated spectra, indicating the absence of mineralization (Katsamenis *et al.*, 2012).

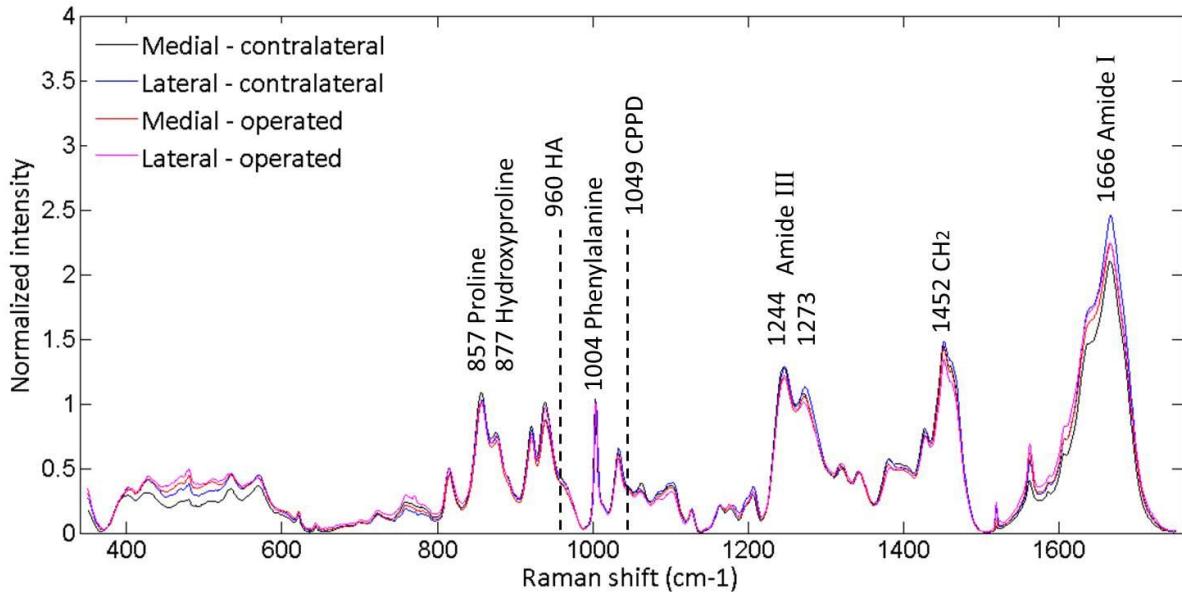


Figure 2.4 – Raman spectra of contralateral and operated menisci in medial and lateral sites. Presence of the main collagen bands. Absence of the crystal bands (HA: hydroxyapatite, CPPD: calcium pyrophosphate dihydrate).

2.2.4 Collagen microstructure

3D reconstructions of typical image stacks of tibial plane acquisitions are shown for contralateral (Figure 2.5) and operated (Figure 2.6) menisci. Contralateral menisci displayed well-organized, straight and compact collagen bundles along circumferential direction. This organization did not depend on the site (Figure 2.5) or the region (data not shown). In contrast, operated menisci displayed less organized and less compact bundles where collagen was rather organized in wavy isolated fibers. These changes were observed in medial and lateral menisci (Figure 2.6), in both regions (data not shown). Elastin fibers were not detected in any samples, as revealed by the absence of signal in its channel.

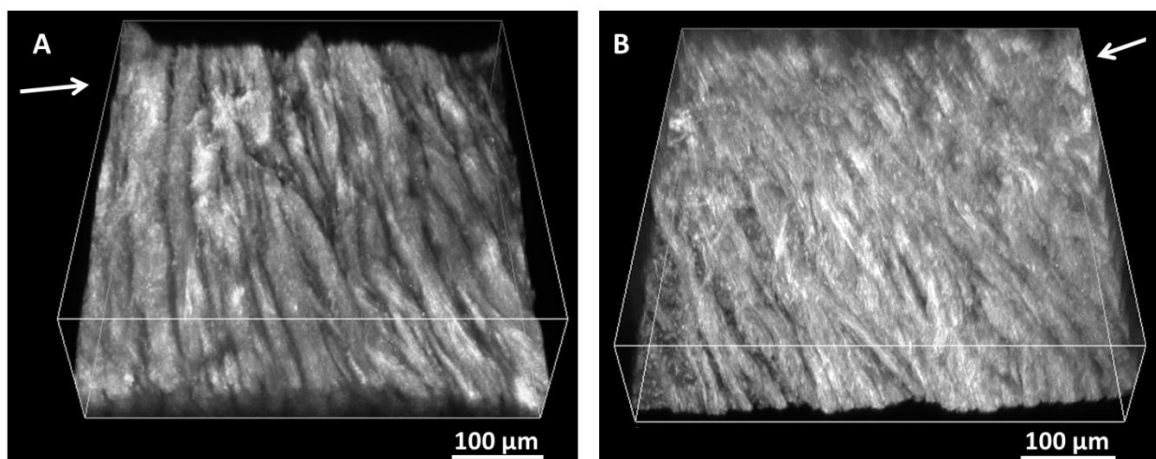


Figure 2.5 – Circumferential collagen fibers arrangement in A) medial and B) lateral contralateral menisci. The arrow indicates the radial direction, corresponding to the x-axis, and is oriented towards the center of the meniscus. Images' size: 509.12 µm x 509.12 x 200 µm.

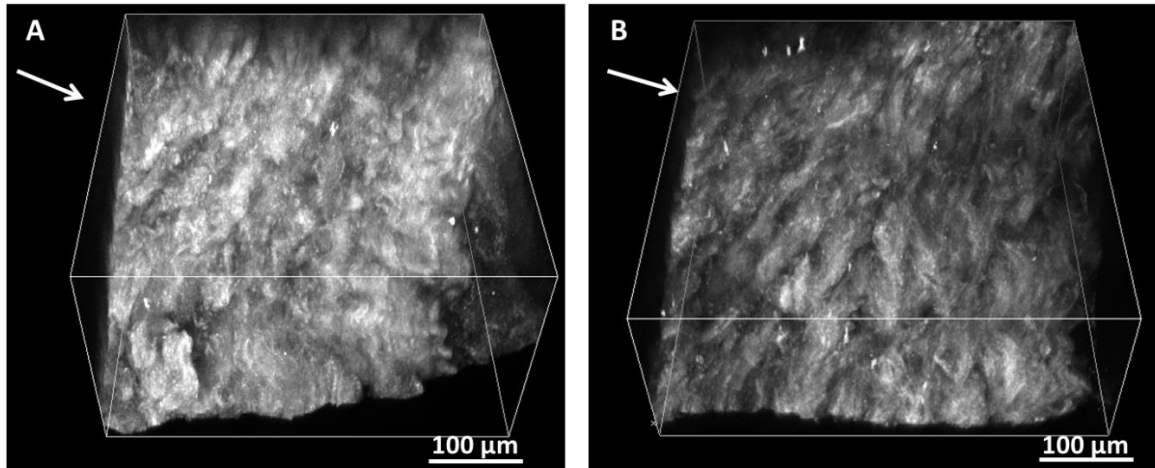


Figure 2.6 – Circumferential collagen fibers arrangement in A) medial and B) lateral operated menisci. The arrow indicates the radial direction, corresponding to the x-axis, and is oriented towards the center of the meniscus. Images' size: 509.12 µm x 509.12 µm x 200 µm.

2.2.5 GAG content

Representative histological sections of contralateral and operated menisci are shown in Figure 6. Contralateral menisci displayed weak red staining (Figure 2.7A). GAGs were mainly concentrated in the inner region. In operated menisci, the red-stained area expanded radially outwards (Figure 2.7B). GAG staining was especially more evident in the areas where the collagen fibers were not well aligned and displayed strong undulations (Figure 2.7C-D). Measurements of red coverage revealed that GAG content significantly increased with OA ($p=0.03$), increasing from $11 \pm 4.5 \%$ in the contralateral group to $19.4 \pm 7.6 \%$ in the operated group (Figure 2.7E).

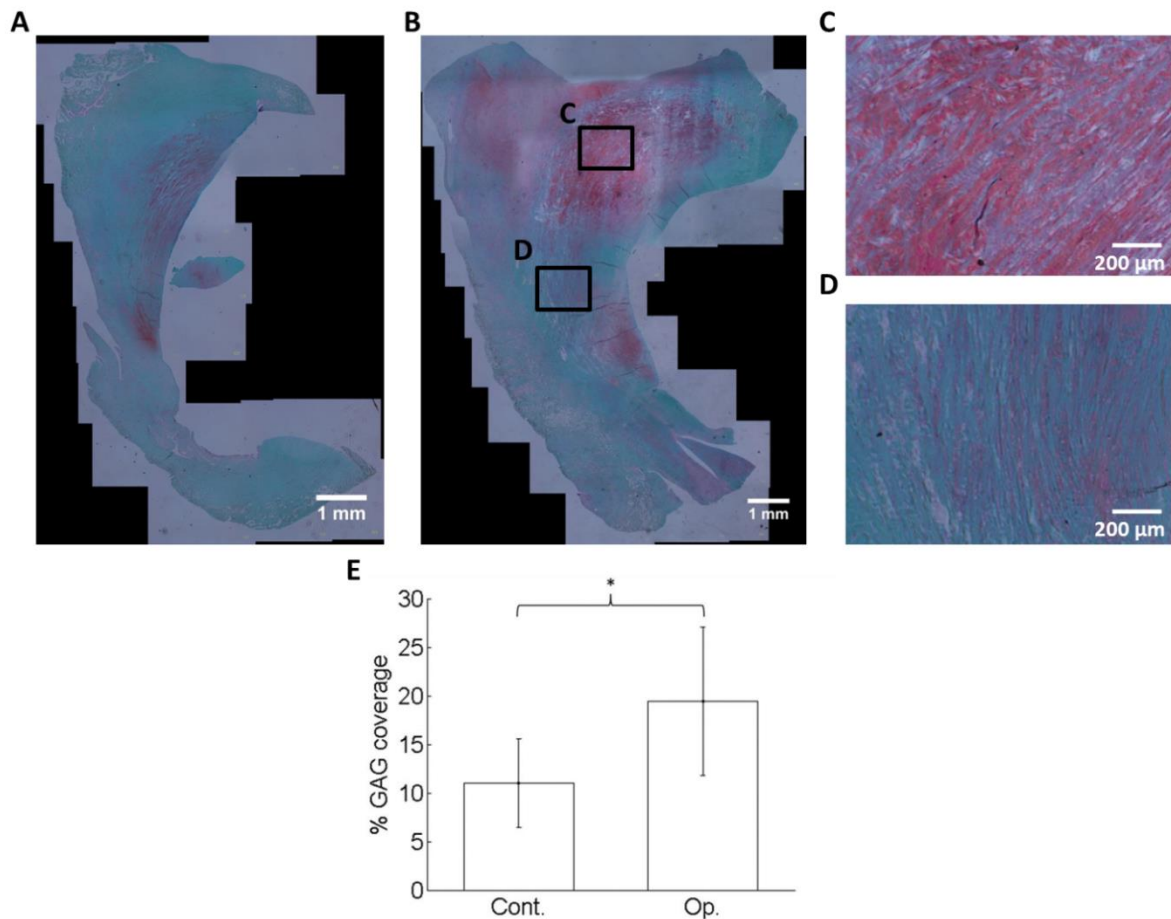


Figure 2.7 – Representative images of SOFG staining in A) contralateral (Cont.) and B) operated (Op.) menisci. The sections correspond to the same animal. Boxes indicate the location of the following detail images; C) (C in B) close-up of an intensely stained area. Collagen fibers were highly undulated and not well aligned; D) (D in B) close-up of a weakly stained area. Collagen fibers were straighter and less unorganized; E) mean percent area of GAG coverage and SD bars (n=3). * corresponds to $p < 0.05$.

3. Discussion

In the present study, the mechanical, chemical and microstructural properties of the menisci were compared in operated (ACLT) and contralateral rabbit knees through microindentation, RM and BCM. These non-destructive techniques were used on the same samples to provide complementary data of the tissue properties. The ACLT rabbit model of OA has been used previously to determine the morphological, histological and chemical changes in menisci (Hellio Le graverand et al., 2001a and 2001b). However, to date, no study has correlated these changes with mechanical alterations. This study demonstrates that this model of OA strongly affects the mechanical properties of the meniscus, which can be explained by microstructural modifications.

This study revealed an alteration of the mechanical properties of the menisci due to experimental OA. The reduced modulus was two times lower for operated menisci (1.1 ± 0.20 MPa) than contralateral (2.3 ± 0.69 MPa) menisci. Interestingly, the mean reduced modulus of

contralateral menisci is of the same order of magnitude as those found for healthy menisci of bovine (1.2 MPa) (Baro *et al.*, 2012), rabbit (1 MPa) (Fischenich *et al.*, 2014), minipig (1.9 MPa) (Li *et al.*, 2007) and human (3.6-4 MPa) (Moyer *et al.*, 2012 and 2013), using similar indentation tests. To our knowledge, it is the first time that mechanical properties of menisci are compared between operated and contralateral rabbit knees, using an ACLT model. The results obtained for the operated menisci are consistent with those obtained by Baro *et al.* (2012) using a chemically induced model of OA on bovine menisci at an early stage, and those obtained by Fischenich *et al.* (2014) using a mechanically induced model of OA in rabbits, where the ACL and both menisci were transected at a more advanced stage. They reported a decrease in Hertz moduli by 50% and 70%, respectively. On human menisci at end-stage OA, Katsuragawa *et al.* (2010) observed the same trend on the aggregate modulus, which represents the stiffness of the tissue at equilibrium when all fluid flow has ceased. However, the results obtained for human tissues are controversial, as Kwok *et al.* (2014) showed that Hertz modulus was two times higher at advanced stage OA compared to healthy menisci.

RM analyses revealed a conservation of the collagen secondary structure at this early stage of OA. This technique has already been used to characterize the structural alterations of collagen in OA cartilage (Takahashi *et al.*, 2014) and synovial fluid (Esmonde-White *et al.*, 2009), but questions remained regarding the menisci. As expected, the different peaks assigned to collagen were present in contralateral and operated menisci. No difference in their intensity was found between the two groups, whereas an increase in the amide I ratio (Esmonde-White *et al.*, 2009) and the amide III ratio (Takahashi *et al.*, 2014) were observed at the first stage of OA in synovial fluid and cartilage, respectively. These higher ratios correspond to the higher content of disordered collagen, which is an indicator of defective collagen (Takahashi *et al.*, 2014).

RM also revealed an absence of mineralization in the meniscus at this stage of OA, even though calcification is common in the menisci of end-stage OA in human patients (Pauli *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2010), and biomechanical properties are altered (Sun *et al.*, 2010). Indeed, Katsamenis *et al.* (2012) found that CPPD crystallinities develop within the meniscal extracellular matrix and completely disrupt the collagen fibers, hindering the cohesion of the tissue. At this stage of OA in rabbits, the decrease in the mechanical properties of the menisci is not due to the formation of calcification.

BCM revealed an alteration of the collagen fiber architecture with OA. In contralateral menisci, the circumferential collagen fibers were straight, aligned and organized in compact bundles, providing the menisci with high mechanical strength (Rattner *et al.*, 2011). It is consistent with previous studies on healthy menisci from human (Chevrier *et al.*, 2009; Katsuragawa *et al.*, 2010; Pauli *et al.*, 2011; Pertersen and Tillmann, 1998; Rattner *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2010) and rabbit samples (Chevrier *et al.*, 2009; Ghadially *et al.*, 1978). In operated menisci, these bundles were less compact, which was also observed in histological studies on human OA menisci (Katsuragawa *et al.*, 2010; Pauli *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012).

Moreover, undulation of the collagen fibers indicated that they were not under tension anymore. These changes resulted in a loss of mechanical resistance of the fibers, which explains the decrease in the reduced modulus of the menisci. However, the fibers in operated menisci were still aligned and oriented in the circumferential direction. Consequently, the anisotropic behavior observed in contralateral menisci, which has been highlighted previously using tensile tests (Bullough *et al.*, 1970; Goertzen *et al.*, 1997; Tissakht and Ahmed, 1995), was also observed in operated menisci. In both groups, the reduced modulus was two times higher in the circumferential direction than in the vertical direction. This observation suggests that the disorganized fibers continue to resist hoop stresses.

Histological analyses revealed an increase in GAG content after induction of OA. This is in agreement with previous studies on human OA menisci (Herwig *et al.*, 45; Kwok *et al.*, 2014; Pauli *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012) and rabbit using an ACLT model (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a). Although GAGs are highly responsible for the mechanical resistance of cartilage in compression (Mansour *et al.*, 2003), their role in the mechanical resistance of the meniscus is not fully understood. Recently, Fischenich *et al.* (2014) and Kwok *et al.* (2014) found a positive correlation between GAG content and instantaneous modulus in rabbit and human OA menisci, respectively. However, Sanchez-Adams *et al.* (2011) showed that GAG depletion in the outer region of bovine menisci did not change the instantaneous modulus. Similarly, Son *et al.* (2013) did not find any significant correlation between GAG content and equilibrium compressive modulus in human OA menisci. Our results support these two later studies because the reduced modulus decreased while GAG content increased.

This finding, together with the disorganization of the collagen framework, is consistent with the structure-function relationships of the meniscus proposed by Vanderploeg *et al.* (2012). They suggest that compressive forces that develop in the inner zones are resisted by GAGs, while circumferential tensile forces in the outer zones are resisted by collagen fibers. The increase in GAG content can then be seen as a response to the collagen degradation and an attempt to compensate for the loss of mechanical resistance (Pauli *et al.*, 2011). Indeed, GAGs were concentrated in the areas where collagen fibers were undulated and less organized, corresponding to areas of low tensile properties. This is consistent with the study by Herwig *et al.* (1984), which reported that in human patients with meniscal lesions, GAG content increased with the severity of meniscal degradation.

In this study, the two analyzed regions of medial and lateral menisci were mechanically impacted by OA. Indeed, we showed that OA drastically decreased the mean reduced modulus of the menisci. In addition, the ratio between anterior and posterior reduced moduli (R_{reg}) was similar between contralateral and operated groups, as well as with the ratio between medial and lateral reduced moduli (R_{site}). This result clearly shows that OA induced by ACLT has a global effect over the menisci. Interestingly, the anterior region was about three times stiffer than the posterior region. This heterogeneity is consistent with other studies on human (Baro *et al.*, 2012; Chia and Hull, 2008) and rabbit (Sweigart *et al.*, 2004) healthy menisci.

These results on the mechanical properties are not surprising since the collagen framework was disorganized in both regions of medial and lateral menisci. However, in the literature, the medial meniscus was generally the most affected macroscopically following an ACLT, especially in the posterior region (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001). Nevertheless, more rabbits would be necessary to find out if mechanical alterations are significantly more severe in the posterior medial meniscus.

In conclusion, this study demonstrates that a degradation of the collagen framework occurs in the whole menisci following ACLT in this rabbit model. This damage leads to a loss of mechanical resistance of the menisci. The significant increase in GAG content within the damaged areas was attributed to an attempt to compensate for the loss of mechanical resistance. Altogether, these results provide a better understanding of the disease process affecting the meniscus. An important consideration of this study is the stage of OA. All of the mechanical and matrix alterations occur during the early phases of OA development following ACLT. This puts forward the necessity for early diagnosis and treatment to prevent, or at least slow down, its progression. Future studies will aim to evaluate the efficacy on the meniscus of intra-articular viscosupplementation therapy formulation.

Acknowledgments

The authors wish to thank biovivo from the Claude Bourgelat Institute (ICIB), Lyon, France, for the animal care and logistical support; Dorothée Virieux-WatreLOT, Guillaume Fargier and Catherine Bosser for their technical support. We would also like to thank the IVTV ANR-10-EQPX-06-01 for their financial support.

Contributions

All authors have made substantial contributions to this study.

Aurélien Levillain contributed to study design, data collection, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript and final approval of the article.

Caroline Boulocher contributed to study design, interpretation of the data, drafting and critical revision of the article for important intellectual content and final approval of the article.

Sema Kaderli provided the study materials, contributed to critical revision of the article for important intellectual content and final approval of the article.

Didier Hannouche, Eric Viguier, Thierry Hoc and Hélène Magoaric contributed to study design, critical revision of the article for important intellectual content and final approval of the article.

Role of the funding source

None

Competing interests

None

Conclusion du chapitre

Cette étude a montré une baisse globale de la rigidité locale des ménisques avec l'arthrose, et une conservation de leur anisotropie. Elle n'a pas révélé de différences significatives entre les ménisques médial et latéral, ni sur la patte controlatérale, ni sur la patte opérée. Dans la suite, nous nous sommes focalisé sur un seul des deux sites anatomiques : le ménisque médial, qui présente le plus de lésions. A l'inverse, une forte hétérogénéité des propriétés mécaniques entre les régions antérieure et postérieure a été observée sur les deux pattes. Aucune région n'est apparue plus touchée par l'arthrose que l'autre, mais peu d'individus ont été utilisés ici pour observer des différences significatives. Par la suite, cette variabilité sera étudiée sur un plus grand nombre d'échantillons.

Cette baisse de rigidité a été accompagnée de modifications microarchitecturales, en particulier au niveau de l'organisation des fibres de collagène. En effet, les ménisques opérés présentent des fibres plus ondulées et moins compactes. Cette dégradation a entraîné une augmentation de la quantité de GAGs. Aucune différence entre les ménisques controlatéraux et opérés n'a été détecté au Raman à ce stade d'arthrose précoce, ni au niveau de la structure du collagène, ni au niveau de la minéralisation. L'organisation des fibres de collagène et la quantité de GAGs semblent donc être particulièrement affectées par l'arthrose.

Ainsi, cette étude préliminaire a permis de déterminer l'effet de l'arthrose sur les propriétés locales des ménisques et de les corrélérer avec les changements microstructuraux. En première approche, le comportement mécanique a ici été caractérisé à partir du module à la décharge, représentant la rigidité du matériau. Or, l'étude bibliographique (chapitre 1) a montré que le ménisque avait un comportement viscoélastique. On peut donc maintenant s'interroger sur l'effet de l'arthrose et de la perte d'organisation des fibres de collagène sur la viscosité du tissu, en utilisant un modèle viscoélastique, plus réaliste.

CHAPITRE 3 : EFFET DE L'ARTHROSE SUR LES PROPRIETES VISCOELASTIQUES DES MENISQUES MEDIAUX: CORRELATION AVEC LA MICROSTRUCTURE

Introduction du chapitre

L'étude préliminaire (chapitre 2) a montré une baisse globale de la rigidité, calculée à partir du module à la décharge, des ménisques médial et latéral après induction d'arthrose, dans les régions antérieure et postérieure. Cependant, dans cette étude préliminaire, la viscosité du tissu n'a pas été prise en compte. Afin de proposer une caractérisation plus proche du comportement mécanique réel du tissu, ce chapitre propose de déterminer les propriétés viscoélastiques de ménisques médiaux, dans les régions antérieure et postérieure, et d'évaluer l'effet de l'arthrose sur ces propriétés.

La diminution de la rigidité des ménisques liée à l'arthrose a été accompagnée d'une modification de l'organisation des fibres de collagène dans la couche centrale des ménisques, et d'une augmentation de la quantité de GAGs. Ces fibres de collagène sont responsables de la résistance en tension et ont donc un rôle primordial dans la transmission des efforts au sein de l'articulation (Makris *et al.*, 2011). Cependant, le ménisque a une microstructure complexe, qui fait rarement l'objet d'une caractérisation complète. Pourtant, des études portant sur des ménisques sains ont montré l'influence des fibres liantes sur la rigidité (Skaggs *et al.*, 1994). Ces fibres émanent des couches superficielles tibiale et fémorale et sont donc assujetties à des frottements avec les surfaces cartilagineuses (Rattner *et al.*, 2011; Andrews *et al.*, 2014). L'étude présentée dans ce chapitre s'intéresse donc également aux modifications que subissent ces couches superficielles et à l'effet sur les fibres liantes, afin de mieux comprendre les mécanismes d'usure.

Cette étude a été réalisée sur 6 lapins, afin d'étudier statistiquement l'effet de l'arthrose sur l'hétérogénéité du tissu. Ces lapins ont subi une rupture du LCA sur la patte droite. Contrairement à l'étude précédente (chapitre 2), ces lapins n'ont pas eu d'injection de solution saline à la suite de l'opération. De plus, 6 lapins sains, de poids et d'âges identiques, ont été utilisés comme référence. En effet, bien que la patte controlatérale soit souvent utilisée comme contrôle, plusieurs études ont rapporté un report de poids sur cette patte dû à la douleur ressentie dans la patte opérée, ce qui modifie les propriétés des tissus (Han *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2015). Des essais d'indentation – relaxation ont été effectués sur les régions antérieure et postérieure des ménisques médiaux (sains, controlatéraux et opérés), dans la direction verticale. Cette direction a été choisie plutôt que la direction circonférentielle, car

elle plus proche de la direction de sollicitation physiologique. Les propriétés viscoélastiques ont été déterminées à partir de ces tests. Ensuite, les ménisques ont été observés au microscope confocal biphoton, afin de caractériser l'organisation des fibres de collagène, au niveau des couches superficielles tibiale et fémorale et de la couche centrale. Enfin, la quantité de GAGs au niveau de la surface indentée des ménisques sains et opérés a été évaluée par histologie.

Dans une première partie, le modèle viscoélastique utilisé ainsi que la méthode de résolution seront présentés. Dans une deuxième partie, l'étude portant sur l'effet de l'arthrose sur les propriétés viscoélastiques des ménisques et sur la relation avec les modifications de microstructure sera détaillée. Dans cette étude, la référence considérée est la patte saine. Enfin, dans une dernière partie, une discussion portera sur la pertinence d'utiliser la patte controlatérale comme contrôle.

1. Détermination des propriétés viscoélastiques des ménisques

Plusieurs modèles existent pour caractériser un matériau viscoélastique. La plupart de ces modèles consiste à représenter le matériau par un ensemble de ressorts et d’amortisseurs en série ou en parallèle (Chen *et al.*, 2012). En fonction du modèle choisi, la définition du module viscoélastique est différente. Dans cette étude, le modèle de Maxwell généralisé a été choisi, qui est également utilisé dans le logiciel éléments finis à disposition (Abaqus). Ainsi, le module viscoélastique identifié pourra être utilisé directement pour des calculs éléments finis.

1.1 Modèle viscoélastique

Un matériau viscoélastique est un matériau dont le comportement mécanique dépend du temps. Lorsque l’on déforme le matériau et que cette déformation est maintenue, on observe une diminution de la contrainte au cours du temps : c’est la relaxation. De même, lorsque l’on maintient la contrainte appliquée sur le matériau, on observe une augmentation de la déformation au cours du temps : c’est le fluage. Un matériau viscoélastique peut être représenté par plusieurs couples de ressorts et d’amortisseurs en séries, mis en parallèle, caractérisant respectivement son élasticité et sa viscosité (figure 3.1) : c’est le modèle de Maxwell généralisé à n branches.

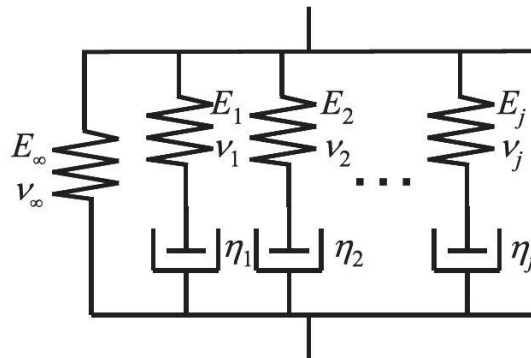


Figure 3.1 – Schéma représentant le modèle de Maxwell généralisé (Chen *et al.*, 2012). E et ν sont respectivement le module de Young et le coefficient de Poisson de chaque ressort, η est la viscosité de chaque amortisseur. Une branche est un couple ressort – amortisseur.

Le module viscoélastique est alors décrit avec une somme d’exponentielles, appelée séries de Prony (équation 3.1) :

$$G(t) = G_0 + \sum_{i=1}^n G_i \exp(-t/\tau_i), \quad (3.1)$$

avec G_0 le module de cisaillement à l’équilibre, G_i les paramètres de relaxation, τ_i les constantes de temps ($\tau_i = \eta_i/E_i$) et n le nombre de branches du modèle, appelées également éléments de Maxwell.

Pour un matériau élastique linéaire, le module de cisaillement peut être déterminé directement à partir de la force et du déplacement. En effet, la théorie de Hertz définit l’aire

de contact entre un indenteur sphérique et le matériau (Johnson, 1985). La force, F , est alors reliée au déplacement, h (équation 3.2) :

$$F(t) = \frac{8\sqrt{R}}{3(1-\nu)} Gh(t)^{3/2}, \quad (3.2)$$

avec G le module de cisaillement du matériau, R le rayon de l'indenteur et ν le coefficient de Poisson du matériau.

Cette théorie de Hertz ne peut plus être appliquée dans le cas d'un matériau viscoélastique, étant donné que l'aire de contact entre l'indenteur et le matériau peut varier au cours du temps. Pour résoudre ce problème de variation des conditions limites, Lee et Radok (1960) utilisent un opérateur intégrale, qui prend en compte le comportement dépendant du temps du matériau. Dans le cas où le coefficient de Poisson de chaque branche est identique, la relation entre la force, F , et le déplacement, h , est donnée par l'équation 3.3 :

$$F(t) = \frac{8\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \int_0^t G(t-s) \frac{dh(s)^{3/2}}{ds} ds. \quad (3.3)$$

Les paramètres viscoélastiques ne peuvent pas être identifiés à partir d'un essai d'indentation charge – décharge, puisqu'il ne permet pas d'observer l'évolution du module jusqu'à l'équilibre. Les paramètres viscoélastiques sont généralement identifiés à partir d'un essai d'indentation – relaxation, qui consiste à enfoncer l'indenteur dans le matériau, puis à maintenir sa pénétration. Sur cette phase de maintien, on observe une décroissance de la force au cours du temps, qui est reliée à la décroissance du module. Le module viscoélastique est identifié sur cette partie de la courbe, à partir de la relation (3.4) :

$$F(t) = \frac{8\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \int_0^{t_c} G(t-s) \frac{dh(s)^{3/2}}{ds} ds, \quad (3.4)$$

où t_c est le temps de charge.

A partir du module viscoélastique, les modules instantanés et à l'équilibre peuvent être calculés selon les relations (3.5) et (3.6) (Oyen, 2013) :

$$G_{ins} = G_0 + \sum_{i=1}^n G_i, \quad (3.5)$$

$$G_{eq} = G_0. \quad (3.6)$$

La fraction élastique, f , est ensuite définie comme le rapport entre le module à l'équilibre et le module instantané. Plus f tend vers 0, plus le matériau est visqueux. A l'inverse, plus f tend vers 1, plus le matériau est élastique.

Dans certaines études, les modules instantané et à l'équilibre sont calculés directement à partir de l'équation 3.2, en utilisant respectivement la force à la fin de la phase de charge et la force à la fin de la relaxation (Baro *et al.*, 2012 ; Fischenich *et al.*, 2014 et 2015 ; Danso *et al.*, 2015, Coatney *et al.*, 2015). Cependant, outre le problème de variation de l'aire de

contact, ce calcul ne prend pas en compte la relaxation du matériau pendant la phase de charge. Selon le temps de charge et les constantes de temps du matériau, les erreurs peuvent être importantes, notamment sur le module instantané. En effet, pour un essai d'indentation – relaxation, dont le protocole est défini dans la section 1.2. (chapitre 3), les modules instantanés et à l'équilibre ont été déterminés à partir de l'équation (3.2), puis à partir de l'équation (3.4) (la résolution de l'équation (3.4) est présentée dans la section 1.3, chapitre 3). Le module instantané, G_{ins} , identifié à partir de l'équation (3.4) vaut 0,31 MPa, alors que le module instantané calculé à partir de l'équation (3.2), en considérant la force et le déplacement à la fin de la charge, vaut 0,17 MPa. Cela représente une erreur de 45%, qui s'explique par la relaxation du matériau pendant la phase de charge, qui n'est pas prise en compte. Les modules à l'équilibre sont identiques avec les deux méthodes.

1.2 Essais d'indentation – relaxation

Les essais d'indentation – relaxation ont été effectués avec un nanoindenteur commercial (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France) disposant d'une pointe sphérique de rayon $R = 0,479$ mm. L'indenteur est monté sur deux lames ressorts, qui se déforment au cours de la pénétration (figure 3.2). Le déplacement de l'indenteur est engendré par un système bobine – aimant et est mesuré avec une jauge capacitive. La force appliquée sur l'échantillon est calculée en soustrayant la force nécessaire pour déformer les lames, à la force appliquée sur l'indenteur.

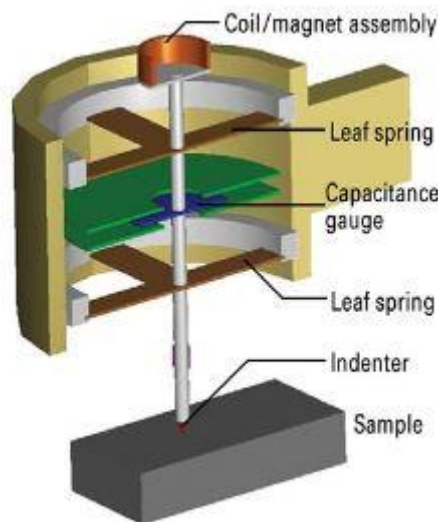


Figure 3.2 – Représentation schématique du nanoindenteur G200 (notice nanoindenteur, Agilent technologies).

Une méthode de test a été développée spécifiquement pour tester des matériaux mous comme le ménisque. Le cycle d'indentation appliqué à l'échantillon est composé d'une charge, d'un maintien de la pénétration et d'une décharge. La charge est effectuée à $5 \mu\text{m/s}$, jusqu'à une pénétration de $100 \mu\text{m}$. On considère que l'indenteur est en contact avec l'échantillon lorsque la pente force – déplacement est supérieure à 5 N/m . La durée de la

phase de maintien est de 400 s, pour assurer une stabilisation de la force. La décharge est réalisée à 0,5 $\mu\text{m/s}$. Pour bloquer le déplacement de l'indenteur sur la phase de maintien, la force appliquée par le système bobine – aimant est maintenue constante. Cependant, étant donné le comportement viscoélastique du matériau, la pointe continue à s'enfoncer dans le matériau lorsque cette force est maintenue, ce qui a pour effet de déformer les lames ressort et donc de diminuer la force sur l'échantillon. La figure 3.3b représente la courbe Force – Temps imposée à la pointe de l'indenteur lors d'un essai de fluage sur un échantillon de cartilage (Ebenstein *et al.*, 2004). La figure 3.3c représente l'augmentation du déplacement et la décroissance de la force sur la phase de maintien, correspondant à la portion de courbe entre les points P1 et P2. Le déplacement de la pointe doit donc être pris en compte pour l'identification du module viscoélastique.

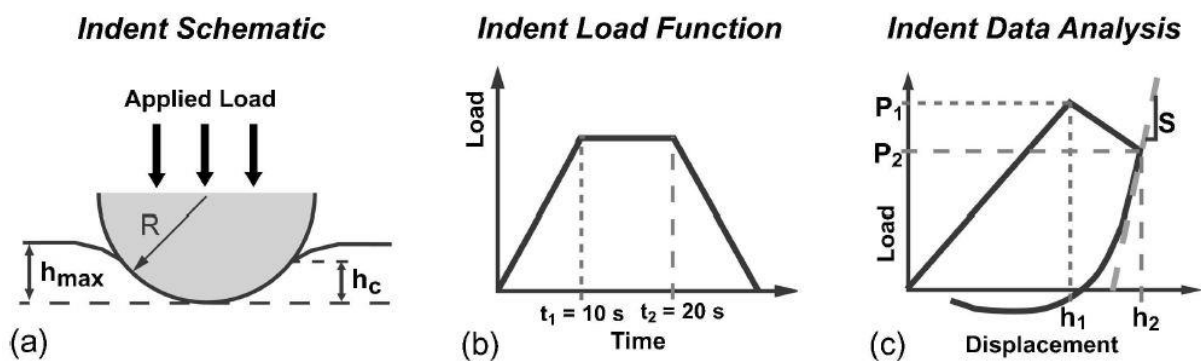


Figure 3.3 – a) Schéma représentant l'indentation de cartilage avec une pointe sphérique. R : rayon de l'indenteur. h_{max} : déplacement de la pointe. h_c : profondeur de contact. b) Courbe Force – temps imposée à la pointe de l'indenteur. La force est maintenue entre les temps t_1 et t_2 . c) Courbe Force – déplacement appliquée à l'échantillon de cartilage. P_1 : force à la fin de la phase de charge. h_1 : profondeur à la fin de la phase de charge. P_2 : force à la fin de la phase de maintien. h_2 : profondeur à la fin de la phase de maintien (Ebenstein *et al.*, 2004).

1.3 Résolution

L'équation (3.3) n'admet pas de solution analytique pour le type de déplacement imposé. La solution exacte est donc approchée avec un algorithme d'optimisation utilisant la méthode du point intérieur, implémenté dans Matlab dans le cadre de ces travaux. L'intégrale est calculée avec la méthode du point médian. Les paramètres à déterminer sont le module à l'équilibre, G_0 , les paramètres viscoélastiques, G_i et τ_i , $i = 1..n$, et le coefficient de Poisson, ν . Pour limiter la durée d'identification, on essaie de réduire le nombre de paramètres dépendants, puis on détermine le nombre de branches du modèle, n .

1.3.1 Choix du coefficient de Poisson

Le coefficient de Poisson d'un matériau ne peut pas être déterminé à partir d'un essai d'indentation uniquement. Dans la plupart des études mécaniques sur les ménisques, le coefficient de Poisson est fixé en fonction d'études précédentes, portant sur les ménisques ou

sur d'autres tissus. Une grande variabilité dans le choix de ce coefficient de Poisson est observée selon les études, avec des valeurs allant de 0 à 0,5 (tableau 3.1).

Etude	Essai effectué	Modèle utilisé	Coefficient de Poisson	Justification
Sweigart (2004)	Indentation pointe poreuse	Théorie biphasique	0-0,01	Calcul théorie biphasique
Li (2006)	Indentation	Théorie de Hertz	0,45	
Chia (2007)	Compression	Modèle de Fung	0,5	Incompressible
Hauch (2009)	Indentation	Modèle de Oyen	0,3	Hu (2001)
Moyer (2012, 2013)	Indentation	Modèle de Oyen	0,38	Hu (2001)
Abraham (2014)	Indentation	Modèle de Oyen	0,3	Hu (2001)
Kwok (2014)	Indentation AFM	Théorie de Hertz	0,04	-
Fischenich (2014, 2015)	Indentation	Théorie de Hertz	0,01	Sweigart (2004)
Li (2015)	Indentation AFM	Théorie de Hertz	0	Sweigart (2004)
Sanchez-Adams (2013)	Indentation AFM	Théorie de Hertz	0,04	Alexopoulos (2005)
Danso (2015)	Indentation	Théorie de Hertz	0,5 instantané 0,3 à l'équilibre	Incompressible Essais compression
Abdelgaied (2015)	Indentation	Théorie biphasique	0-0,1	Calcul théorie biphasique

Tableau 3.1 – Variabilité dans le choix du coefficient de Poisson du ménisque (les études portent sur des espèces différentes).

Les valeurs de coefficient de Poisson proches de 0 ont été déterminées en utilisant la théorie biphasique. Cette théorie est souvent utilisée pour analyser des essais de compression confinée, lorsque les parois ou le substrat sont poreux, ou des essais d'indentation avec une pointe poreuse. Au cours de ces essais, l'eau s'échappe par les pores. On détermine donc la rigidité du matériau solide, lorsque toute l'eau s'est échappée. La plupart des autres études considèrent le ménisque comme incompressible et utilisent donc un coefficient de Poisson proche de 0,5. En effet, le ménisque est composé d'environ 70% d'eau (Herwig *et al.*, 1984). On peut tout de même noter des valeurs allant de 0,3 à 0,5. Dans cette étude, le ménisque est

considéré comme étant incompressible et une valeur proche de 0,5 est choisie. Pour des raisons numériques, le coefficient de Poisson est fixé à 0,49.

1.3.2 Effet du module à l'équilibre sur la force normalisée.

Les paramètres viscoélastiques du matériau peuvent être dissociés du module à l'équilibre, en les normalisant par la réponse instantanée :

$$g_i = \frac{G_i}{G_0 + \sum_{j=1}^n G_j}, \quad (3.7)$$

ce qui donne :

$$F(t) = \frac{8G_0\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \int_0^t \left(1 + \sum_{i=1}^n \frac{g_i}{1 - \sum_{j=1}^n g_j} \exp\left(-\frac{(t-s)}{\tau_i}\right) \right) \frac{dh^{3/2}}{ds} ds. \quad (3.8)$$

Le module à l'équilibre, G_0 , a une influence uniquement sur l'amplitude de la force. En normalisant la force, F , par rapport à la force à la fin de la phase de charge, $F(t_{chg})$, il est possible d'identifier les paramètres viscoélastiques, indépendamment de G_0 (équation 3.9). Le module à l'équilibre est ensuite calculé à partir de l'amplitude de la force à la fin de la phase de charge, selon l'équation (3.8) :

$$\frac{F(t)}{F(t_{chg})} = \frac{\int_0^t \left(1 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{g_i}{1 - \sum_{j=1}^n g_j} \right) \exp\left(-\frac{(t-s)}{\tau_i}\right) \right) \frac{dh(s)^{3/2}}{ds} ds}{\int_0^{t_{chg}} \left(1 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{g_i}{1 - \sum_{j=1}^n g_j} \right) \exp\left(-\frac{(t-s)}{\tau_i}\right) \right) \frac{dh(s)^{3/2}}{ds} ds}. \quad (3.9)$$

1.3.3 Choix du nombre de branches

Pour déterminer le nombre de branches du modèle, les paramètres viscoélastiques d'un ménisque ont été identifiés à partir d'un essai d'indentation – relaxation, en utilisant des modèles à 1, 2, 3 et 4 branches. La courbe expérimentale ainsi que les courbes correspondant à chacun des modèles sont représentées sur la figure 3.4. Pour chaque modèle, la durée d'identification a été relevée, l'écart (au sens des moindres carrés) par rapport à la courbe expérimentale a été calculée, ainsi que l'erreur relative sur les paramètres E_{ins} , E_{eq} et f , par rapport au modèle à 4 branches (tableau 3.2).

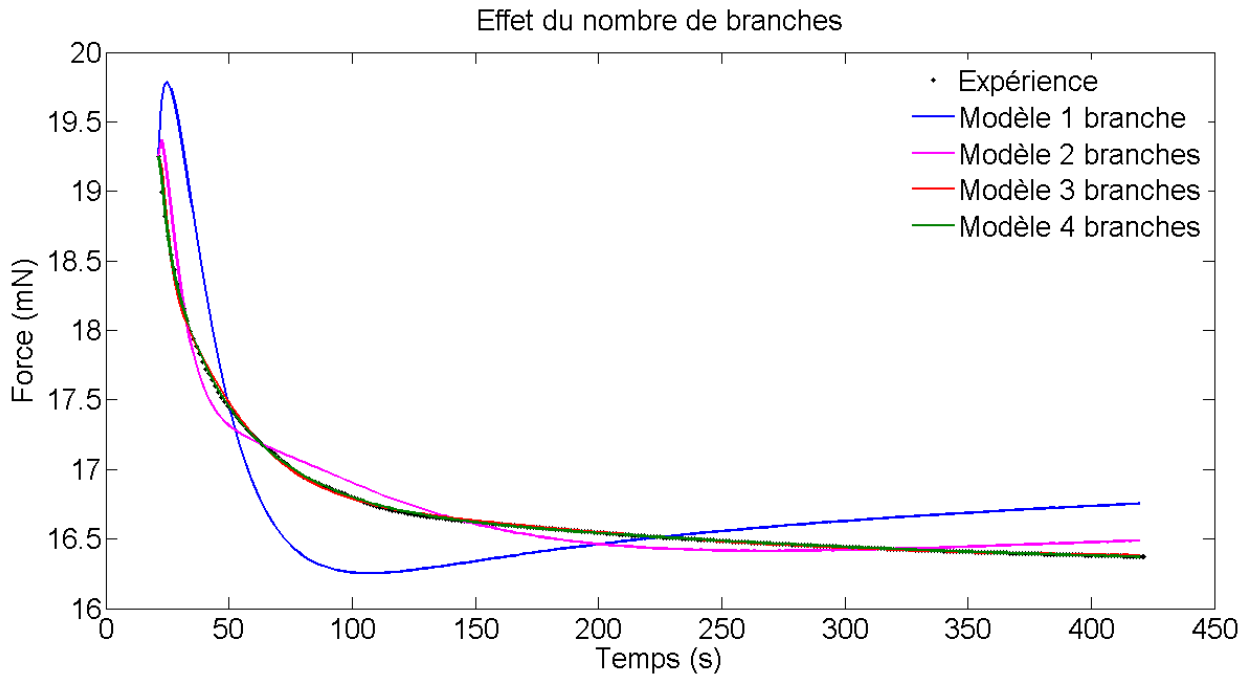


Figure 3.4 – Effet du nombre de branches dans le modèle viscoélastique (traits pleins) et comparaison avec la courbe expérimentale (pointillés).

Nb branches	Durée (s)	Ecart (mN ²)	E_{eq} (MPa)	E_{ins} (MPa)	f
1	5	41	0,28 (4%)	0,64 (36%)	0,45 (63%)
2	14	2.3	0,28 (2.5%)	0,77 (23%)	0,36 (33%)
3	45	0.077	0,28 (0.8%)	0,94 (6%)	0,29 (7,8%)
4	165	0.021	0,27	1,0	0,27

Tableau 3.2 – Durée d'identification, écart (au sens des moindres carrés) par rapport à la courbe expérimentale et valeurs de E_{eq} , E_{ins} et f pour chaque modèle. L'écart relatif par rapport au modèle à 4 branches est donné entre parenthèses.

Pour les quatre modèles, la durée d'identification est très faible. L'écart entre la force expérimentale et la force obtenue avec le modèle diminue lorsque le nombre de branches augmente. On cherche alors un compromis entre le nombre de paramètres décrivant le comportement du matériau et l'erreur par rapport à la courbe expérimentale.

Les modèles à 1 et 2 branches sont insuffisants pour décrire le comportement du ménisque. L'erreur sur la fraction élastique, calculée à partir de cette identification, est respectivement de 63% et 33%. Les courbes correspondant aux modèles à 3 et 4 branches et la courbe expérimentale sont très proches (figure 3.4). De plus, l'écart entre les différents paramètres viscoélastiques calculés dans le cas des modèles à 3 et 4 branches est inférieur à 10%. Le modèle à 3 branches est donc choisi.

1.4 Validation du modèle avec un calcul éléments finis

Pour valider le modèle analytique et la méthode de résolution, notre solution a été comparée à un calcul éléments finis (Abaqus). Comme les tests effectués sont unidirectionnels, un maillage axisymétrique de hauteur 2 mm et de largeur 1 mm est utilisé, avec des éléments CAX4R de 5 μm . La bille est définie comme un solide rigide, tandis que le ménisque est affecté d'une loi de comportement homogène, isotrope, viscoélastique linéaire. Les paramètres du matériau utilisé sont ceux identifiés précédemment avec le modèle viscoélastique à 3 branches ; ils sont résumés dans le tableau 3.3. Le déplacement appliqué à la bille correspond au déplacement expérimental de l'indenteur. La force de la bille sur l'échantillon est comparée avec la force calculée avec le modèle analytique.

Elastique		Viscoélastique					
E_{ins} (MPa)	ν_{ins}	g_1	τ_1 (s)	g_2	τ_2 (s)	g_3	τ_3 (s)
0,94	0,49	0,51	3,03	0,16	21	0,034	161

Tableau 3.3 – Paramètres matériaux utilisés pour le ménisque dans la simulation éléments finis

La force à la fin de la phase de charge est de 19.25 mN avec le modèle analytique et 18,3 mN avec le calcul éléments finis, soit un écart de 5% entre les deux valeurs. La courbe de force normalisée en fonction du temps est tracée pour le modèle analytique et la simulation éléments finis (figure 3.5). L'écart entre les deux courbes étant très faible, ce modèle analytique a été retenu pour la suite de nos travaux.

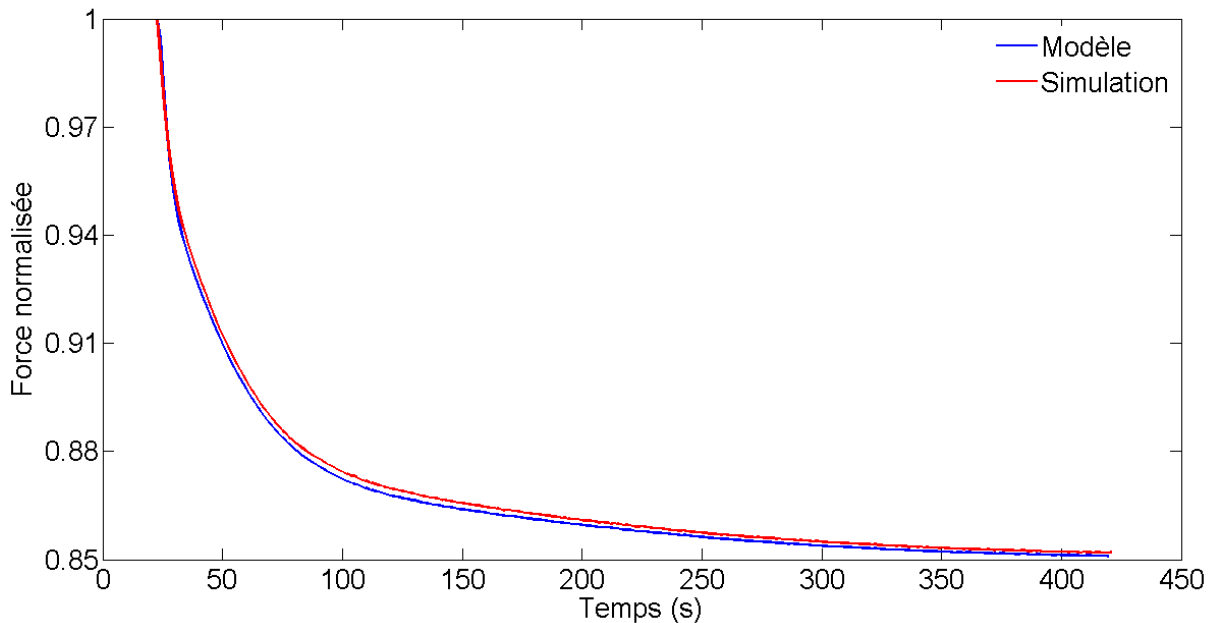


Figure 3.5 – Courbe force - temps normalisée, pour le modèle analytique et la simulation éléments finis.

2. Viscoelastic properties of rabbit osteoarthritic menisci: A correlation with matrix alterations²

A. Levillain^a, H. Magoaric^a, C. Boulocher^b, A. Decambon^c, V. Viateau^c, T. Hoc^a

^a LTDS, UMR CNRS 5513, Université de Lyon, Ecole centrale de Lyon, 36 av Guy de Collongue, 69134 Ecully Cedex, France

^b Research unit ICE, UPSP 2011.03.101, Université de Lyon, veterinary campus of VetAgro Sup, 69 280 Marcy l’Etoile France.

^c B2OA, UMR 7052, ENVA, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

Corresponding author: Thierry Hoc thierry.hoc@ec-lyon.fr +334 72 18 62 14

² Article en révision dans Journal of the Mechanical Behavior of Biological Materials

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of early osteoarthritis (OA) on the viscoelastic properties of rabbit menisci and to correlate the mechanical alterations with the microstructural changes. Anterior Cruciate Ligament Transection (ACLT) was performed in six male New-Zealand White rabbits on the right knee joint. Six healthy rabbits served as controls. Menisci were removed six weeks after ACLT and were graded macroscopically. Indentation-relaxation tests were performed in the anterior and posterior regions of the medial menisci. The collagen fibre organization and glycosaminoglycan (GAG) content were assessed by biphotonic confocal microscopy and histology, respectively. OA menisci displayed severe macroscopic lesions compared with healthy menisci ($p = 0.009$). The instantaneous and equilibrium moduli decreased significantly ($p = 0.03$ and $p = 0.004$, respectively) in the anterior region, indicating a global decrease in meniscal stiffness. The equilibrium modulus alone decreased significantly ($p = 0.04$) in the posterior region, inducing a loss of tissue elasticity. These mechanical changes were associated in the posterior region with a structural disruption of the superficial layers, from which the tie fibres emanate, and with a decrease in the GAG content in the anterior region. Consequently, the circumferential collagen fibres of the deep zone were dissociated and the collagen bundles were less compact. Our results demonstrate the strong meniscal modifications induced by ACLT at an early stage of OA and highlight the relationship between structural and chemical matrix alterations and mechanical properties.

Keywords: Meniscus; Osteoarthritis; Viscoelasticity; Collagen; Glycosaminoglycans

Introduction

Human knee menisci are wedge-shaped fibrocartilages that are mainly composed of water, collagen and glycosaminoglycans (GAGs) (Herwig *et al.*, 1984). In healthy joints, they transmit and distribute loads across the knee (Walker *et al.*, 2015) and play a protective role through shock absorption (Light *et al.*, 1980; Voloshin and Woskt, 1983). These functions are fulfilled by their complex mechanical behaviour, which has been characterized using elastic (Sandmann *et al.*, 2013; Tissakht and Ahmed, 1995), non-linear (Danso *et al.*, 2015; Haemer *et al.*, 2012), heterogeneous (Chia and Hull, 2007; Danso *et al.*, 2015; Tissakht and Ahmed, 1995), transversely isotropic (Chia and Hull, 2007; Haemer *et al.*, 2012; Tissakht and Ahmed, 1995), and viscoelastic (Chia and Hull, 2007; Danso *et al.*, 2015; Moyer *et al.*, 2012 and 2013; Pereira *et al.*, 2014; Seitz *et al.*, 2013) models. Menisci mechanical properties are primarily governed by their extracellular matrix—in particular, the circumferential collagen fibres of the deep zone. These fibres are organized in packed bundles that are surrounded by tie fibres that originate from the superficial layers and prevent the separation of these bundles (Andrews *et al.*, 2014; Rattner *et al.*, 2011). The circumferential collagen fibres provide resistance to hoop stresses caused by compressive loads from the femoral condyles to the tibial plateau (Bullough *et al.*, 1970; Makris *et al.*, 2011), making them essential for load distribution over the knee joint.

In osteoarthritic (OA) knees, menisci are often injured and can display severe macroscopic lesions at an advanced stage of the disease (Berthiaume *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2007; Zarins *et al.*, 2010). To characterize the effect of OA at the onset of pathology development, animal models are often used (Coatney *et al.*, 2015; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001a and 2001b; Mäkelä *et al.*, 2014). A previous study using an anterior cruciate ligament transection (ACLT) rabbit model of OA reported a disorganization of the circumferential collagen bundles in the deep zone, leading to a global decrease in the unloading modulus, which represents the stiffness of the tissue (Levillain *et al.*, 2015). However, the effect of these microstructural changes on the viscoelastic properties has not been investigated yet in post-traumatic OA.

Recent studies have shown that modification of the viscoelastic properties of menisci using a traumatic impact model of OA (Fischenich *et al.*, 2014 and 2015a; Weatley *et al.*, 2015). However, the posterior region of the medial meniscus has seldom been characterized due to severe lesions. However, this region is of particular interest because it is the most affected by OA (Zarins *et al.*, 2010). In healthy menisci, the posterior region is known to be less stiff than the anterior region (Chia and Hull, 2007; Danso *et al.*, 2015; Sweigart *et al.*, 2004). Characterizing the effect of OA on the viscoelastic properties of menisci in both regions and understanding the mechanisms of collagen fibre disorganization are necessary to prevent this high occurrence of lesions.

The aim of this study was to characterize the viscoelastic properties of both healthy and ACLT rabbit medial menisci in the anterior and posterior regions in parallel with modifications of the collagen fibre organization. Special attention was given to the organization of the tie collagen fibres and to changes in the GAG content to decipher the mechanisms of alteration, depending on the region. The viscoelastic properties were identified using indentation-relaxation tests, while collagen fibre organization and the GAG content were assessed by biphonic confocal microscopy and histology, respectively.

2.1 Materials and methods

2.1.1 Animal model

All of the experiments and procedures involving animals were approved by the local Ethics Committee (ComEth Anses/ENVA/UPEC number 16) and were performed in full accordance with European legislation. Twelve healthy adult male New Zealand White rabbits (six months of age, 3.8 kg in weight on average) that were free of degenerative joint disease were obtained from a licensed vendor (EUROLAP, Gosné, France). After two weeks in acclimatization and quarantine, experimental OA was surgically induced by ACLT, performed by a trained veterinary surgeon, in the right knee (stifle) of six rabbits. The left limb, called “the contralateral limb” hereafter, was not operated. The right operated limb, called “the operated limb” hereafter, was not immobilized postoperatively, and the rabbits were allowed to move freely in their individual cages after surgery. The remaining six rabbits were not operated and are called “healthy rabbits” hereafter. After a six-week observation

period, the healthy and operated rabbits were euthanized. Both knees were explanted and carefully dissected, and the medial menisci were detached. Meniscus and cartilage degradations, as well as osteophyte production, were graded in the medial compartment of right healthy (n = 6), contralateral (n = 6), and operated (n = 6) knees using a macroscopic grading system developed by Laverty *et al.* (2010) and given in Table 3.4.

<i>Meniscus</i>
1 : Normal 2 : Minimal fibrillation 3 : Moderate surface fibrillation but no tears 4 : Severe fibrillation, incomplete tears 5 : Complete tears, bucket-handle tears or multiple incomplete tears
<i>Articular cartilage (tibial and femoral condyles)</i>
0 : Surface smooth with normal color 1 : Surface rough with minimal fibrillation or a slight yellowish discoloration 2 : Cartilage erosion extending into the superficial or middle layers 3 : Cartilage erosion extending into the deep layers 4 : Complete cartilage erosion with subchondral bone exposed
<i>Osteophyte formation (tibial plateau, femoral condyles and trochlea)</i>
0 : Absence 1 : Mild 2 : Moderate 3 : Severe

Table 3.4 – Grading system used to quantify the meniscus and articular cartilage degradation as well as osteophyte formation (Laverty *et al.*, 2010).

2.1.2 Experimental procedure

The medial menisci from the right knee of both healthy (n = 6) and operated (n = 6) rabbits were stored at -20°C in wet compresses soaked with 10× PBS until ready for use in subsequent biomechanical and micro-architectural analyses. After thawing the menisci for one day at 4°C, two slices measuring 2 mm in width were cut with a scalpel in the anterior and posterior regions (Figure 3.6A), and each sample was cut parallel to the tibial meniscal surface, approximately 1 mm above this surface. Indentation-relaxation tests were performed on the (x,y) horizontal plane in the vertical direction (Figure 3.6B). Next, the tibial and femoral surfaces and deep zone of each sample were imaged by biphotonic confocal imaging (figure 3.6C). Finally, the GAG content was quantified on the indented surface of each sample by histology.

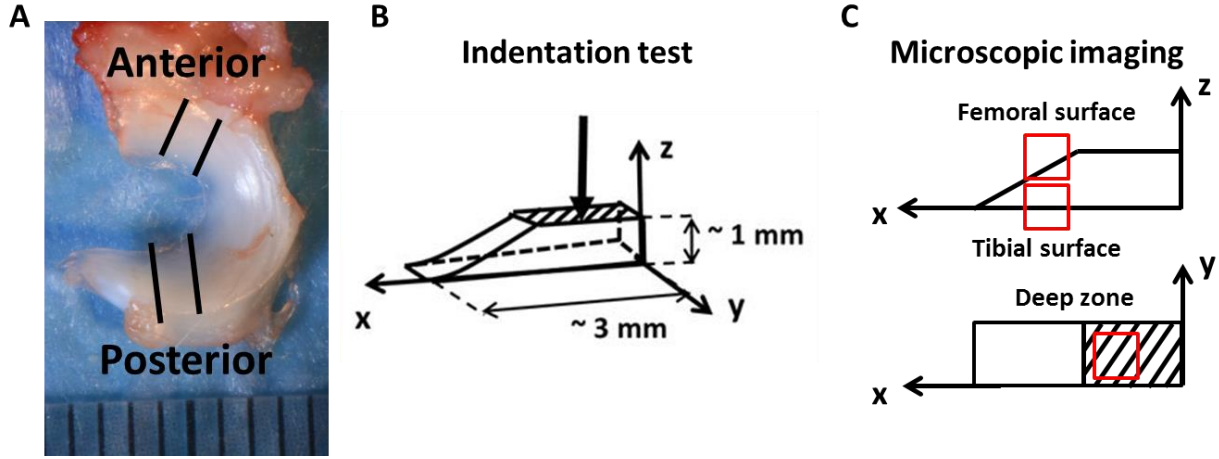


Figure 3.6 – Experimental procedure. A) Optical image of the femoral surface of a healthy medial meniscus (left knee) and localization of the two studied regions (2 slices of 2 mm in width). B) Cutting plane horizontal to the tibial surface and representation of the indentation direction (perpendicular to the cutting plane). C) Representation of the areas imaged by biphotonic microscopy.

2.1.3 Mechanical testing

Indentation-relaxation tests were performed on meniscus samples immersed in 10× PBS at 25°C using a commercial Nanoindenter (Agilent Nanoindenter G200; ScienTec, Les Ulis, France). The indenter was a spherical sapphire tip with a radius of curvature, R , of 0.479 mm. The tibial surface (opposite to the indented surface) was glued onto an aluminium support (glue 3; Loctite®). Indentation tests were conducted on three locations with a minimum spacing of 200 μm between two locations. Each series of tests on three locations was repeated three times. The difference between the calculated moduli on each point was always less than 5%. A constant displacement rate of 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ and a penetration of 100 μm were imposed to avoid surface and fibre disruption effects. Contact with the sample was defined from a slope of 5 N/m in the load vs displacement curve. The indenter displacement was then maintained for 400 s until equilibrium was reached. Unloading was carried out at 0.5 $\mu\text{m}/\text{s}$.

2.1.4 Viscoelastic model

Both instantaneous and equilibrium moduli were determined from the resultant force-time data using the Hertzian contact for a linearly viscoelastic material (Huang and Lu, 2006; Lee and Radok, 1960). For a spherical indenter, the force-displacement relationship is given by Equation (3.10).

$$F(t) = \frac{8\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \int_0^t G(t-s) \frac{dh(s)^{3/2}}{ds} ds, \quad (3.10)$$

where F is the force, h is the penetration, ν is the Poisson ratio, and G is the relaxation modulus. A constant Poisson ratio equal to 0.49 was chosen, assuming incompressibility of the menisci (Chia and Hull, 2007; Danso *et al.*, 2015).

The relaxation modulus was described using Prony series (Equation (3.11)).

$$G(t) = G_0 + \sum_{i=1}^N G_i \exp(-t/\tau_i), \quad (3.11)$$

where G_0 and G_i are relaxation coefficients, τ_i is the retardation time, and N is a positive integer corresponding to the number of Maxwell elements (Chen *et al.*, 2012).

The term on the right hand of Equation (3.10) cannot be integrated analytically. Thus, the relaxation function was determined with recourse to a numerical solution using the Matlab algorithm *fmincon* (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA). To reduce the number of unknown dependent parameters, the normalized relaxation modulus, $g_R(t)$, was defined by Equations (3.12) and (3.13):

$$g_R(t) = \frac{G(t)}{G(0)} = 1 - \sum_{i=1}^N g_i \left(1 - \exp(-t/\tau_i)\right), \quad (3.12)$$

$$g_i = \frac{G_i}{G_0 + \sum_{j=1}^N G_j}. \quad (3.13)$$

Next, the force-displacement relationship was expressed as:

$$F(t) = \frac{8G_0\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \int_0^t \left(1 + \sum_{i=1}^N \frac{g_i}{1 - \sum_{j=1}^n g_j} \exp\left(-\frac{(t-s)}{\tau_i}\right)\right) \frac{dh^{3/2}}{ds} ds. \quad (3.14)$$

It can be seen that G_0 only acts on the force amplitude. Hence, the experimental force on the relaxation part, F_{exp} , was normalized to the maximum force and $\kappa := \{g_i, \tau_i, i = 1, \dots, N\}$ was identified using the algorithm, by minimizing the objective function, $f(\kappa)$

$$f(\kappa) = \sum \left(\frac{F_{exp}(t)}{F_{exp}(t_l)} - \frac{F(t)}{F(t_l)} \right)^2, \quad (3.15)$$

where t_l is the time of the loading phase. Three Maxwell elements ($N = 3$) provided a good fit to the experimental data (Figure 3.7). Next, G_0 was derived by proportionality.

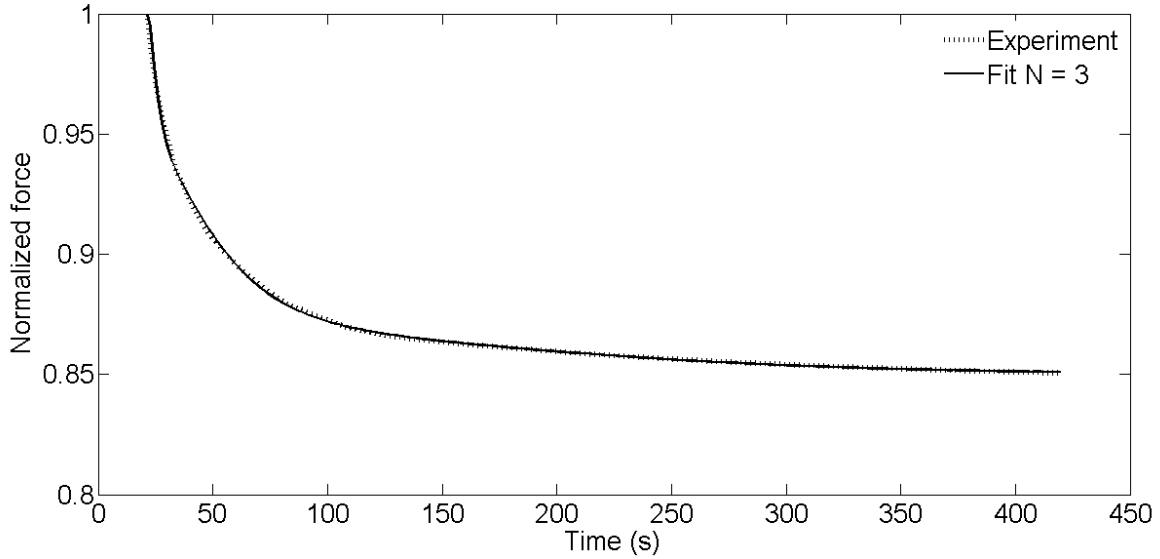


Figure 3.7 – Curve representing the normalized force vs time curve for the experiment (dotted line) and the viscoelastic model (solid line)

Finally, the instantaneous modulus, equilibrium modulus, and elastic fraction were calculated according to Equations (3.16), (3.17), and (3.18) (Oyen, 2013).

$$E_{ins} = 2(1 + \nu) \left(G_0 + \sum_{i=1}^3 G_i \right), \quad (3.16)$$

$$E_{eq} = 2(1 + \nu)G_0, \quad (3.17)$$

$$f = \frac{E_{eq}}{E_{ins}}. \quad (3.18)$$

The elastic fraction describes the elastic/viscous behaviour of the material: $f = 1$ corresponds to a perfectly elastic material, whereas $f = 0$ corresponds to a perfectly viscous material.

These parameters were calculated for each indent and were then averaged for each sample. As classically performed in nanoindentation, a rubber reference material was indented before each series of tests to calibrate the device.

2.1.5 Microscopic imaging and grading

The collagen microstructure was observed by biphotonic confocal imaging (A1RMP PLUS®, Nikon) using an excitation wavelength of 850 nm. Second harmonic generated light from collagen was collected at a channel with a specific band-pass filter of 400 to 490 nm. A 25×, 1.1-NA water immersion objective (CFI Apo LWD 25XW; Nikon) was used. The image field of view was $512 \times 512 \mu\text{m}^2$ with a resolution of 0.5 μm . To scan the thickness of the meniscus, stacks of 2D images were recorded in each area, with a time scan of 2 s and an average of two scans per image, every 2 μm from 0 to 200 μm in depth.

The whole stack of 2D images of the tibial and femoral surfaces of the menisci was projected using ImageJ 1.47v (NIH, Bethesda, Maryland, USA) on a single slice. Each pixel of the

output image contained the maximum intensity value over all of the images in the stack at the particular pixel location. Moreover, 3D reconstructions of the image stack acquisitions in the deep zone were performed using NIS element Viewer (Nikon Instruments Europe B.V, France) to characterize the organization of the circumferential collagen fibres. The organization of the tie fibres with respect to the tibial and femoral superficial layers was characterized using the following grading system: grade 0: the tie fibres emanate from both surfaces; grade 1: the tie fibres are only linked to the tibial or femoral surface of the meniscus; grade 2: the tie fibres are not linked to the surface; and grade 3: no tie fibres are detected.

2.1.6 Detection of GAGs

After microscopic imaging, the meniscal samples were fixed in 10% formalin for GAG quantification. They were then embedded in paraffin, and 4- μ m-thick sections parallel to the indented surface were sliced using a Microm HM 340 E microtome. In each sample, at least two slices were stained with Safranin O-fast green (SOFG), which turns GAGs red.

Histological sections were imaged using an Eclipse TS100 microscope and a DS-FI2 colour camera (Nikon instruments). Red coverage of SOFG staining was semi-quantitatively analysed using ImageJ. Colour images were first converted to Red-Green-Blue stacks and were viewed as grey-scale images under the blue stack. Tissue appeared light, and SOFG-positive stained regions appeared dark. Images were analysed using the threshold function with a black to red ratio of 1:3. The percentage of GAG coverage was then measured for each section and was averaged for each sample.

2.1.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The effect of OA on the mechanical data, microscopic score, and GAG coverage was assessed using the Wilcoxon sum-rank test, with a level of significance of 0.05. This test was performed for each region, leading to 6 independent observations in the healthy and operated groups. The differences in the macroscopic scores among the healthy, contralateral, and operated groups were analysed using the Kruskal-Wallis test with a level of significance of 0.05, followed by a post-hoc Dunn's test.

2.2 Results

2.2.1 Macroscopic grading

The macroscopic scores attributed to menisci and cartilage degradation as well as osteophyte formation are given in Table 3.5 for the healthy, contralateral, and operated groups. All of the healthy rabbits displayed normal menisci, rare cartilage alterations and minute osteophytes. The macroscopic scores of the cartilage and osteophyte formation were very similar between the healthy and contralateral groups, but the meniscal score tended to be higher in the contralateral group ($p = 0.07$). Half of the contralateral menisci displayed some fibrillation. All of the rabbits from the operated group exhibited fibrillation or erosion of both tibial and femoral cartilage, as well as osteophyte formation, especially in the femoral trochlea. Complete cartilage erosion was not observed in any rabbit, indicating an early stage of OA development.

Group	Rabbit #	Meniscus	Cartilage		Osteophyte formation		
			Tibia	Femur	Tibia	Condyle	Trochlea
Healthy	1	1	1	0	0	0	0
	2	1	1	1	1	0	0
	3	1	1	0	0	0	0
	4	1	1	0	0	0	0
	5	1	1	0	1	0	0
	6	1	1	0	0	0	0
	Mean	1	1	0.17	0.33	0	0
Contralateral	7	1	1	0	0	0	0
	8	2	2	0	0	0	0
	9	2	1	0	0	0	0
	10	1	1	0	0	0	0
	11	2	1	0	1	0	0
	12	1	1	0	1	0	0
	Mean	1.5	1.2	0	0.33	0	0
Operated	7	1	2	1	1	1	3
	8	3	2	1	1	0	2
	9	5	2	1	1	2	2
	10	5	2	1	1	1	3
	11	2	2	2	1	0	1
	12	2	2	1	2	1	2
	Mean	3*	2*	1.2*	1.2*	0.83*	2.2*

Table 3.5 – Grading score of meniscus and cartilage degradation, as well as osteophyte formation, for the healthy, contralateral and operated groups. * denotes a significant difference from the healthy group.

2.2.2 Modification of the viscoelastic properties

The instantaneous modulus, equilibrium modulus, and elastic fraction are given in Figure 3.8 for healthy and OA menisci in each region. In the anterior region, instantaneous and equilibrium moduli decreased significantly after the induction of OA, with mean values ranging from 2.9 MPa and 0.60 MPa for healthy menisci ($p = 0.03$), respectively, to 1.3 MPa and 0.26 MPa for OA menisci ($p = 0.004$), respectively. In the posterior region, the mean equilibrium modulus was significantly decreased ($p = 0.016$) from 0.14 MPa in healthy menisci to 0.077 MPa in OA menisci. The instantaneous modulus was approximately 1.5 times lower in OA menisci, although not significantly. The elastic fraction was not affected in the anterior region, while it was significantly decreased ($p = 0.016$) in the posterior region. In healthy and operated knees, the anterior medial meniscal region was stiffer for both the instantaneous and equilibrium responses. Interestingly, the elastic fractions were not significantly different in the anterior and posterior regions of healthy menisci.

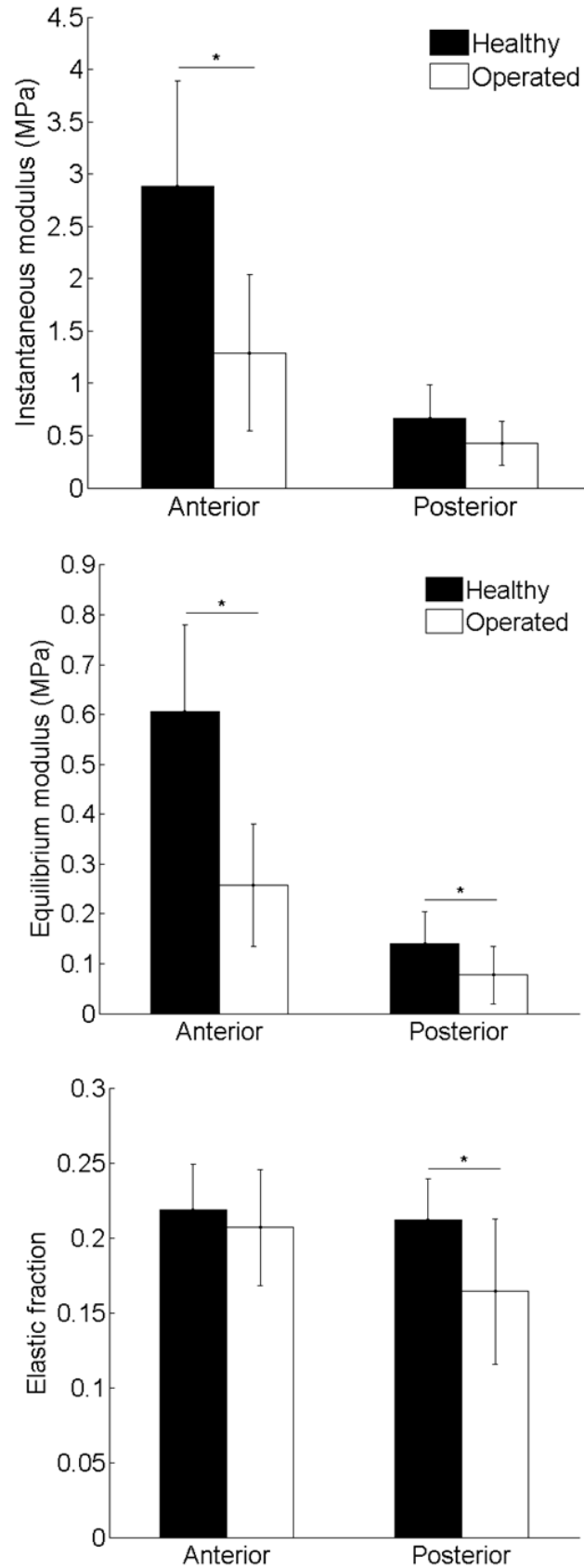


Figure 3.8 – Instantaneous modulus, equilibrium modulus, and elastic fraction of menisci from the healthy and operated groups in the anterior and posterior regions. * denotes a significant difference.

2.2.3 Modification of the collagen bundle organization

Representative 3D reconstructions of collagen fibres in the deep zone of healthy and OA menisci are given in Figures 4 and 5 for each region. Healthy menisci displayed compact collagen bundles that were made of straight fibres aligned in the circumferential direction (Figure 3.9). This organization was similar in the anterior and posterior regions. OA menisci displayed less compact bundles, with undulated fibres in both regions (Figure 3.10).

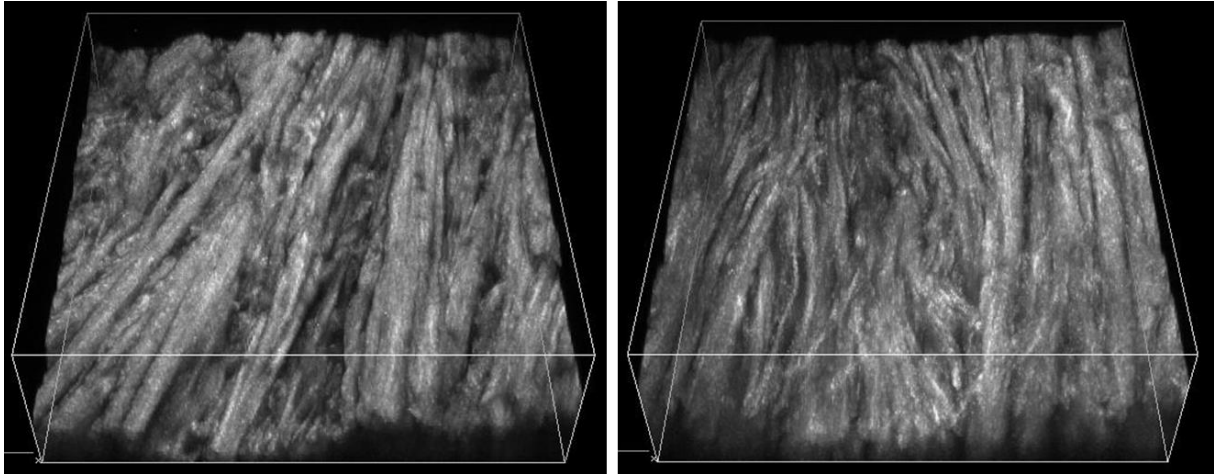


Figure 3.9 – Representative 3D reconstructions of collagen fibres in a healthy medial meniscus in the anterior (on the left side) and posterior (on the right side) regions.

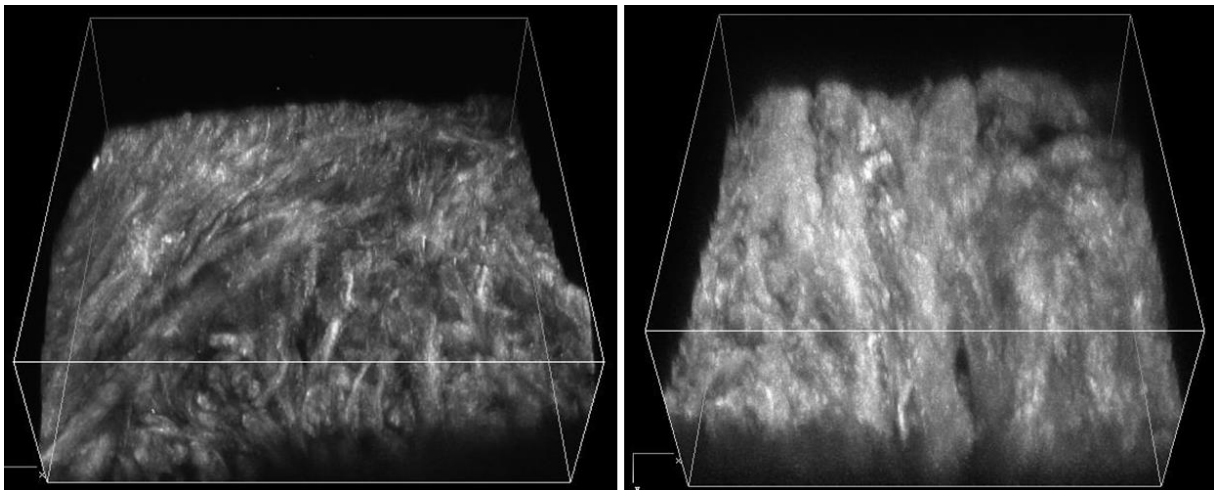


Figure 3.10 – Representative 3D reconstructions of collagen fibres in an OA meniscus in the anterior (on the left side) and posterior (on the right side) regions.

2.2.4 Tie fibre organization and GAG coverage

The microscopic scores and values of the GAG coverage of menisci are given in Table 3.6 for healthy and operated knees in each region.

All of the healthy menisci had a null score regarding the organization of the tie fibres in each region. They were composed of a superficial layer with radially oriented fibres (Figure 3.11A). The deep zone comprised circumferential bundles, with the tie fibres intermingled and originated from the superficial layer. This score increased for OA menisci, but was only significant ($p = 0.028$) in the posterior region. For OA menisci, the tibial superficial layer was partially (Figure 3.11B) or totally (Figure 3.11C) torn. Consequently, the tie fibres were not linked to the surface (Figure 3.11B) or were not visible (Figure 3.11C). Similar organizations were observed in the femoral surface for each group (data not shown).

In healthy menisci, GAGs were primarily located in the anterior region. In OA menisci, GAG coverage was significantly ($p = 0.017$) lower than that in healthy menisci in the anterior region; the mean values decreased from 17% in healthy menisci to 11% in OA menisci. In the posterior region, GAG coverage was not significantly different between each group.

Group	Score tie fibres		GAG coverage (%)	
	Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
Healthy	0 (0)	0 (0)	17 (8.8)	3.2 (3.3)
Operated	1(1.2)	1.5 (1.3)*	11 (16)*	9.4 (14)

Tableau 3.6 – Microscopic scores for tie fibre organization and values of GAG coverage (%) in each region of medial menisci in healthy and operated knees. Values are given as the means (std). * corresponds to a significant difference between the healthy and operated groups.

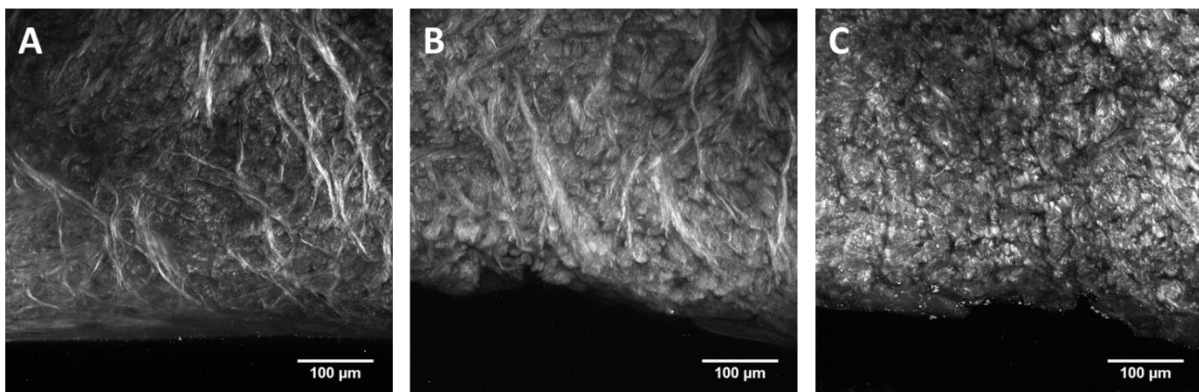


Figure 3.11 – Tibial superficial surface of healthy (A) and OA (B,C) medial menisci showing tie fibre organization. A) Tie fibres emanate from the superficial layer. B) Tie fibres are not linked to the superficial layer. C) Tie fibres are not visible.

3. Discussion

In the present study, the viscoelastic properties of medial menisci were characterized for the first time in healthy and ACLT rabbit knees. Six weeks following ACLT, all of the joints developed OA at an early stage, as assessed by the gross lesions in the operated knees. As expected, meniscal lesions were also present in the contralateral knees. Indeed, several studies reported systematic OA changes in the contralateral limb in rabbit models of OA due to weight transfer (Han *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2015). This motivated the use of a healthy control group instead of considering the contralateral limb as the control (Coatney *et al.*, 2015; Fischenich *et al.*, 2014 and 2015a; Levillain *et al.*, 2015; Wheatley *et al.*, 2015).

To date and to our knowledge, the viscoelastic properties of rabbit menisci have been determined in only one study using a finite element model (Wheatley *et al.*, 2015). In the current study, the viscoelastic properties of rabbit menisci were identified using the analytical model developed by Lee and Radok (1960). This model has been used recently to characterize the surface and deep zone of human healthy menisci (Moyer *et al.*, 2012 and 2013). The mean instantaneous modulus in the anterior region was very similar to that obtained in our study, but they did not find any significant difference between the anterior and posterior regions for any mechanical parameters. These differences are likely due to the smaller size of their indenter tip and lower penetration (Ebenstein and Pruitt, 2006). Interestingly, the values of the instantaneous modulus calculated using this viscoelastic model are within the same range as the unloading modulus calculated in a previous study (Levillain *et al.*, 2015), as predicted by Cheng and Cheng (2006). Moreover, the values of the equilibrium modulus calculated in the anterior and posterior regions of healthy menisci are in good agreement with the values of the aggregate modulus, which measures the stiffness of a material at equilibrium, obtained by Sweigart *et al.* (2004) on healthy rabbit menisci. They found aggregate moduli of 0.50 MPa in the anterior region and 0.12 MPa in the posterior region compared with equilibrium moduli in the present study of 0.60 MPa and 0.14 MPa, respectively. Here, no significant difference was found between the elastic fractions of each region. This finding is consistent with the study of Danso *et al.* (2015) on healthy human menisci, who did not find any significant difference in the phase angle, which characterizes the viscosity of the material between each region.

Indentation-relaxation tests on healthy and OA menisci revealed a modification of the viscoelastic properties only six weeks after the induction of OA in both the anterior and posterior regions. In most studies, the severity of OA made it difficult to perform mechanical tests in the posterior region of the medial meniscus; thus, only the anterior or central regions could be generally characterized (Katsuragawa *et al.*, 2010; Fischenich *et al.*, 2014 and 2015a; Weatley *et al.*, 2015). In the present study, it was shown that the anterior and posterior regions are not affected by OA in the same way at an early stage of the disease. In the anterior region, a significant decrease in both the instantaneous and equilibrium moduli was observed, suggesting a global effect of OA on the stiffness of the tissue. This is consistent with other studies on rabbit menisci (Fischenich *et al.*, 2014 and 2015a; Weatley *et al.*, 2015) using a traumatic impact model of OA and on human menisci (Fischenich *et al.*, 2015b). No change

in the elastic fraction was observed, which is in agreement with the similar total relaxation between the contralateral and impacted menisci found by Weatley *et al.* (2015). In the posterior region, the equilibrium modulus was significantly decreased, but not the instantaneous modulus, inducing a loss of elasticity. This suggests that the equilibrium response is affected first in this region by OA. These results differ from those obtained by Coatney *et al.* (2015) on rabbit menisci following a traumatic impact because they not find any significant difference between equilibrium and instantaneous moduli of contralateral and impacted limbs after 6 weeks. This discrepancy can be explained by less severe lesions created by the traumatic impact model of OA compared with surgical ACLT.

The decrease in the viscoelastic meniscal properties was explained by a modification of the collagen fibre organization. Biphotonic confocal microscopy revealed that circumferential fibres in healthy menisci were straight, aligned, and organized in densely packed bundles. This organization was similar in the anterior and posterior regions. OA menisci displayed a fibrillar organization in both regions, with less compact bundles and undulated fibres. These results are consistent with those of other studies on healthy (Katsuragawa *et al.*, 2010; Pauli *et al.*, 2011; Petersen and Tillmann, 1998; Sun *et al.*, 2012) and OA (Katsuragawa *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012) human menisci and with a previous study on rabbit menisci (Levillain *et al.*, 2015). The disorganization of collagen bundles led to a loss of mechanical strength in the deep zone. Indeed, Meyer *et al.* (2011) showed that in mouse muscle, the elastic modulus of collagen fibre bundles was about four times higher than that of fibre groups. Moreover, Danso *et al.* (2015) found that collagen fibres in the meniscus strongly contribute to the equilibrium modulus. Our results support these latter two studies because the equilibrium modulus was decreased in the anterior and posterior regions and both regions displayed less compact collagen bundles.

Analyses of the tie fibre organization and GAG content in healthy and OA menisci suggest that the mechanisms of collagen fibre alterations in the deep zone differ depending on the region. In the posterior region, the modification of the circumferential fibre organization was caused by the disruption of the tie fibres. Indeed, in healthy menisci, the radial collagen fibres of the superficial layers extended to the deep zone to tie the circumferential bundles together. This organization of tie fibres is consistent with healthy menisci studies in humans (Rattner *et al.*, 2011) and bovine species (Andrews *et al.*, 2014). In the posterior region of OA menisci, the tie fibres were no longer linked to the superficial layers, which were partially or completely torn and could not resist separation of the circumferential bundles. Thus, these circumferential bundles were less packed, leading to fibril organization. This relationship between the tie fibres and circumferential collagen bundles is in agreement with the findings by Skaggs *et al.* (1994), who demonstrated that the tensile modulus of the meniscus was higher when the number of tie fibres was increased. Moreover, this loss of tie fibres in the posterior region can explain the significant decrease in the elastic fraction, a result that was not observed in the anterior region.

In the anterior region, the modification of the circumferential fibre organization was associated with a decrease in the GAG content. In healthy menisci, GAGs were mainly located in the anterior region, a finding that is in agreement with that of Killian *et al.* (2010) in healthy rabbit menisci. The main functions GAGs are to support compressive loading and to facilitate collagen sliding during tensile loading (Vanderploeg *et al.*, 2012). Thus, the decrease in the GAG content, which was also found in other studies on rabbit menisci (Fischenich *et al.*, 2014 and 2015a), could be the cause of the fibril organization of the circumferential collagen bundles in the anterior region, and explains the significant decrease in the instantaneous modulus in this region.

In conclusion, this study demonstrated that OA induced by ACLT strongly affects the surface integrity of rabbit menisci at both the macroscopic and microscopic scales. In the posterior region, the tibial and femoral superficial layers were torn, leading to a loss of tie fibres and fibril organization of the circumferential collagen fibres. In the anterior region, the GAG content was decreased, altering the sliding between the circumferential collagen bundles. This modification of the microstructure caused a strong decrease in the stiffness of the OA menisci and a loss of elasticity in the posterior region. The equilibrium modulus of the more compliant posterior region reached very low values, explaining the higher prevalence of macroscopic lesions in this region (Zarins *et al.*, 2010). All of these mechanical and microstructural modifications occurred at an early stage of OA development, underlying the need for early treatment. Future studies will be aimed at assessing the efficacy of the widely used OA intra-articular therapy (viscosupplementation) on the mechanical and microstructural properties of the meniscus.

Acknowledgement

The authors wish to thank Morad Bensidhoum and the staff from Biomedical Research Centre of Alfort (CRBM), histology unit of VetAgro Sup, and IVTV platform, for their technical support. We would also like to thank the IVTV ANR-10-EQPX-06-01 for their financial support.

3. Caractérisation des ménisques controlatéraux : pertinence en tant que groupe contrôle

Dans la plupart des modèles animaux étudiés dans la littérature, l'arthrose est induite dans une seule des deux pattes (Turunen *et al.*, 2013; Mäkelä *et al.*, 2014; Fischenich *et al.*, 2014 and 2015; Coatney *et al.*, 2015; Wheatley *et al.*, 2015). La patte controlatérale est alors utilisée comme patte contrôle, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux et de s'affranchir de la variabilité inter-individus. Cependant, plusieurs études ont montré que cette patte subissait des modifications systématiques, notamment au niveau du cartilage, dues à un report de poids (Han *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2015). Comme présenté précédemment (section 2.2.1, chapitre 3), le ménisque subit également des modifications : la moitié des ménisques controlatéraux présentait en effet de la fibrillation de surface. L'objectif de cette troisième partie est de comparer les résultats obtenus en considérant la patte controlatérale comme référence, par rapport aux résultats de la partie précédente qui comportait un groupe sain, afin d'évaluer la pertinence du choix des pattes controlatérales comme groupe contrôle.

3.1 Protocole expérimental

Des essais d'indentation ont été effectués dans les régions antérieure et postérieure des 6 ménisques controlatéraux selon le protocole décrit dans la section précédente, et leurs propriétés viscoélastiques ont été déterminées à partir du modèle de Maxwell généralisé. Pour comparer chacun des paramètres entre les groupes controlatéraux et opérés et représenter la répartition des données, des boîtes à moustache ont été tracées. De plus, pour chaque paramètre mécanique (module instantané, module à l'équilibre et fraction élastique), les ratios entre la valeur pour la patte opérée et pour la patte controlatérale ont été calculés pour chaque lapin, dans les deux régions.

Ces ménisques ont ensuite été observés au microscope confocal biphoton afin de caractériser l'organisation des fibres de collagène dans l'épaisseur des ménisques (au niveau des surfaces tibiale et fémorale et dans la partie centrale des ménisques).

Un test de Wilcoxon apparié a été effectué sur les ratios entre les paramètres mécaniques des ménisques opérés et controlatéraux, comparés à un groupe composé de six 1, pour déterminer les différences significatives entre ces deux groupes.

3.2 Propriétés viscoélastiques

Le module instantané, le module à l'équilibre ainsi que la fraction élastique des ménisques controlatéraux et opérés sont représentés sur les figures 3.12 à 3.14. Dans la région antérieure des ménisques controlatéraux, on peut noter une grande variabilité des données concernant les modules instantanés et à l'équilibre, avec des valeurs allant de 0,5 MPa à 3,2 MPa pour le module instantané et de 0,11 MPa à 0,80 MPa pour le module à l'équilibre. Cette variabilité est plus faible dans la région postérieure, notamment au niveau du module à l'équilibre. Ainsi, on peut supposer que la faible rigidité des ménisques opérés dans la région

postérieure entraîne un report de poids sur la région antérieure, et que ce report de poids dépend de la façon de marcher de chaque individu. Par contre, la variabilité est plus faible au niveau de la fraction élastique.

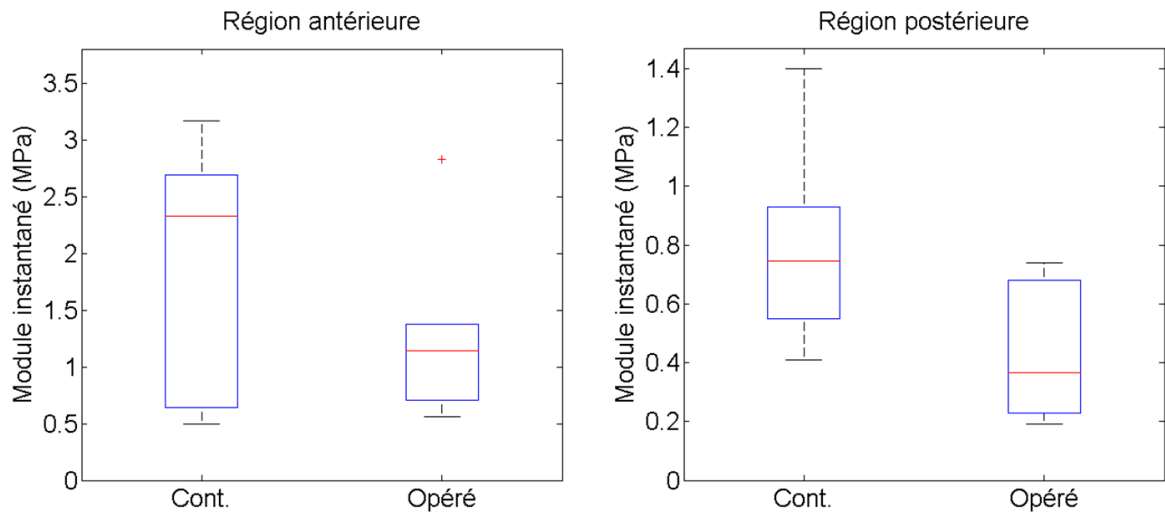


Figure 3.12 – Module instantané des ménisques controlatéraux (Cont.) et opérés, dans les régions antérieure (gauche) et postérieure (droite).

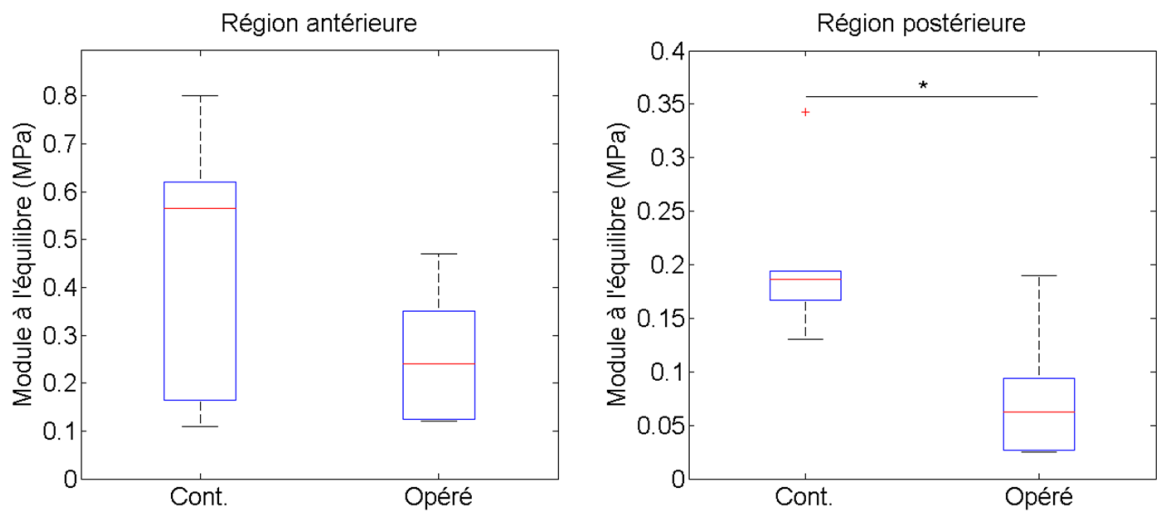


Figure 3.13 – Module à l'équilibre des ménisques controlatéraux (Cont.) et opérés, dans les régions antérieure (gauche) et postérieure (droite). * indique une p-value inférieure à 0.05.

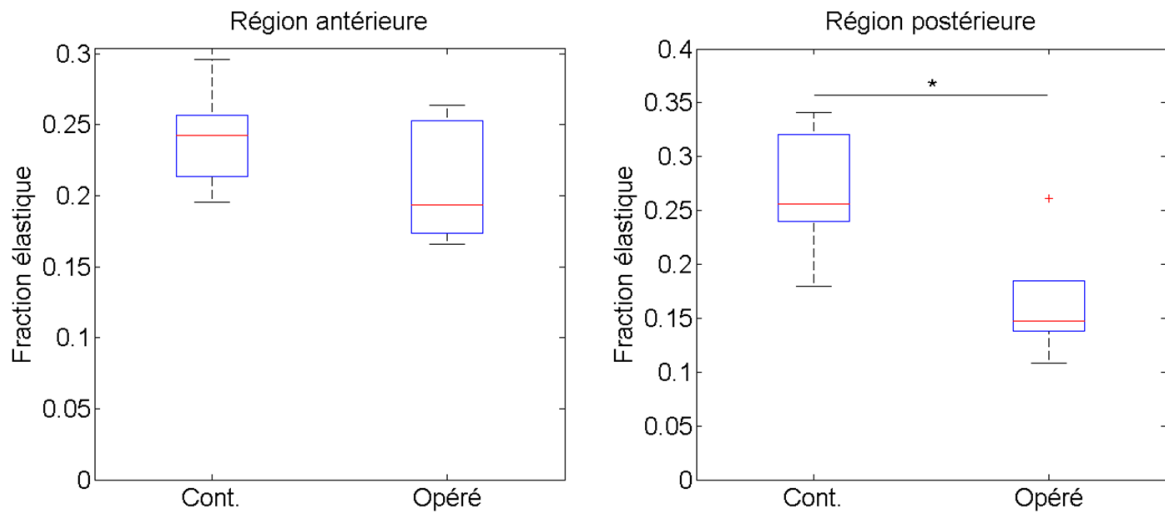


Figure 3.14 – Fraction élastique des ménisques controlatéraux (Cont.) et opérés, dans les régions antérieure (gauche) et postérieure (droite). * indique une p-value inférieure à 0.05.

Le tableau 3.7 répertorie les ratios entre les paramètres mécaniques de la patte opérée et ceux de la patte controlatérale, dans chaque région. Les modules instantané et à l'équilibre augmentent dans la région antérieure des ménisques opérés de deux lapins. Ainsi, aucun des paramètres viscoélastiques n'est significativement différent entre les groupes opéré et controlatéral dans cette région, alors que les modules instantané et à l'équilibre diminuent significativement par rapport au groupe sain (section 2.2.2, chapitre 3). Les conclusions sont donc différentes en considérant la patte controlatérale comme contrôle. Dans la région postérieure, le module instantané augmente pour un ménisque opéré. Le module à l'équilibre et la fraction élastique des ménisques opérés diminuent significativement dans cette région, comparés aux ménisques controlatéraux. Les conclusions sont les mêmes que celles obtenues avec le groupe sain comme contrôle.

# Lapin	Ratio E_{ins}		Ratio E_{eq}		Fraction élastique	
	Antérieur	Postérieur	Antérieur	Postérieur	Antérieur	Postérieur
7	0,61	0,94	0,42	0,48	0,70	0,51
8	2,6	0,17	3,3	0,073	1,2	0,44
9	4,4	0,21	2,8	0,16	0,65	0,79
10	0,23	0,99	0,21	0,57	0,90	0,58
11	0,36	0,42	0,31	0,27	0,85	0,64
12	0,22	1,3	0,20	1,0	0,90	0,77
Moyenne	1,4	0,68	1,2	0,43*	0,87	0,62*

Tableau 3.7 – Ratios entre les modules instantanés, modules à l'équilibre et fractions à l'élastiques entre les ménisques opérés et controlatéraux, dans chaque région. * représente un ratio significativement différent de 1 ($p < 0.05$).

3.3 Organisation des fibres de collagène

Afin de comprendre pourquoi la rigidité du ménisque controlatéral de deux lapins est plus faible que celle du ménisque opéré correspondant, l'organisation des fibres de collagène dans la région antérieure du ménisque controlatéral n°8 est représentée figure 3.15, au niveau de ses surfaces tibiale et fémorale, et figure 3.16 au niveau de sa partie centrale. La couche superficielle tibiale du ménisque est totalement rompue, tandis que sa couche fémorale présente de fortes ondulations (figure 3.15). Cela entraîne une absence de fibres liantes au niveau de la partie centrale et une désolidarisation des torons circonférentiels qui deviennent moins compacts (figure 3.16).

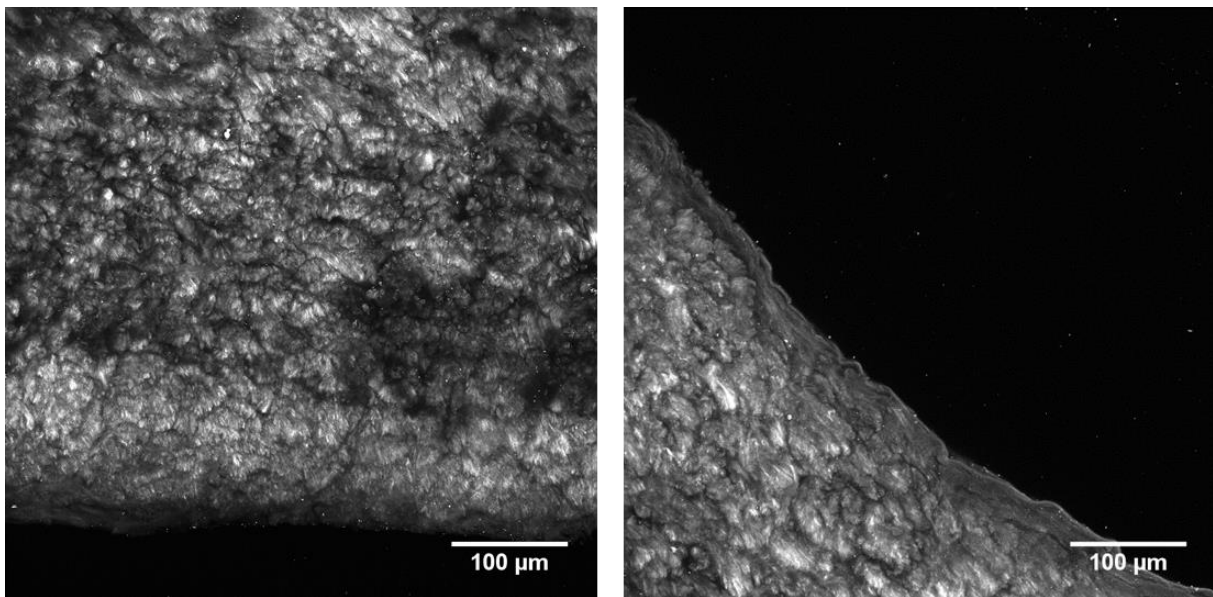


Figure 3. 15 – Surfaces tibiale (gauche) et fémorale (droite) du ménisque controlatéral n°8, dans la région antérieure.

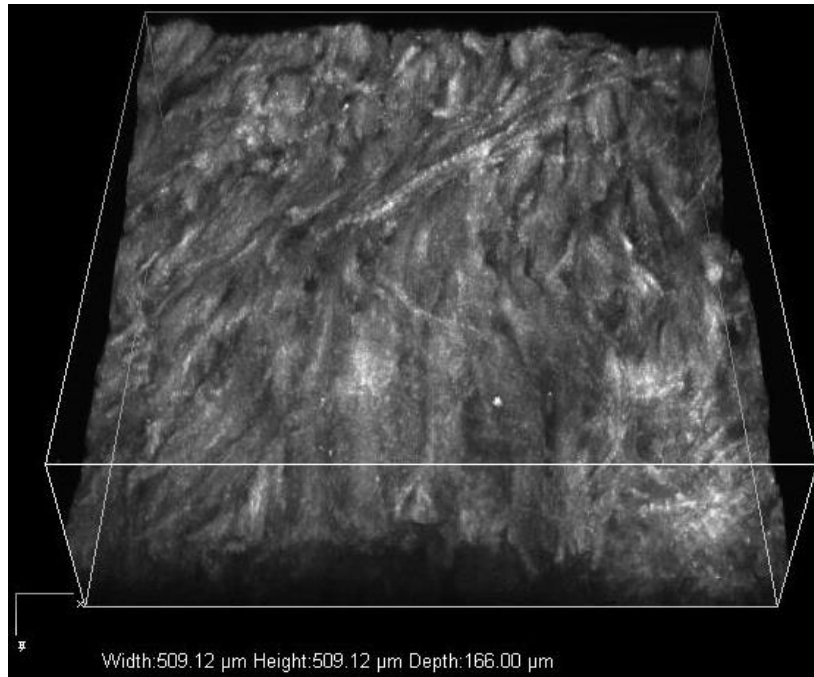


Figure 3. 16 – Reconstruction 3D des fibres de collagène dans la partie centrale du ménisque n°8, région antérieure.

3.4 Conclusion sur la pertinence de la référence controlatérale

Les ménisques controlatéraux subissent des lésions, macroscopiques et microscopiques, dues à un report de poids. Cela entraîne une modification de leurs propriétés viscoélastiques, en particulier dans la région antérieure, qui dépend de la façon de marcher de chaque individu. Dans les études où il n'est pas possible d'avoir de groupe sain (pour des raisons éthiques, de coût...), il faut donc avoir conscience que considérer la patte controlatérale comme contrôle peut mener à des conclusions erronées.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, les propriétés viscoélastiques des ménisques médiaux sains et opérés ont été déterminées en utilisant un modèle de Maxwell généralisé à trois branches. La résolution a été effectuée à l'aide d'un algorithme d'optimisation puis validée avec un calcul éléments finis. Ce modèle a permis de caractériser la rigidité instantanée et à l'équilibre de ces ménisques, ainsi que leur fraction élastique. Cette étude a montré une modification des propriétés viscoélastiques des ménisques après induction d'arthrose et une forte hétérogénéité entre les régions antérieure et postérieure. Dans la région antérieure, une diminution globale de la rigidité est observée, mais la fraction élastique reste identique, ce qui signifie que la viscosité du tissu ne change pas. Dans la région postérieure, la réponse à l'équilibre est plus fortement altérée, entraînant une perte d'élasticité du tissu. La région antérieure reste plus rigide que la région postérieure, à la fois pour les ménisques sains et opérés. Cela explique pourquoi les lésions sont plus fréquentes dans la région postérieure.

Les causes de ces changements de propriétés mécaniques ont ensuite été étudiées à l'échelle de la microstructure. L'organisation des fibres de collagène a été caractérisée dans les différentes couches du ménisque et la quantité de GAGs a été évaluée sur la surface indentée, pour comprendre les mécanismes de dégradation dans chaque région. Dans la région postérieure, les couches superficielles tibiales et fémorales des ménisques opérés sont partiellement ou totalement arrachées. Ainsi, elles ne retiennent plus les fibres liantes, émanant de ces couches. Cela entraîne une désolidarisation des torons de collagène dans la couche centrale et une organisation plus fibrillaire. Ces fibres ne résistent plus efficacement aux contraintes circonférentielles transmises par le fémur, diminuant ainsi la rigidité du tissu et son élasticité. Dans la région antérieure, la quantité de GAGs diminue. Ainsi, leurs rôles dans la résistance aux efforts de compression et dans le glissement entre les fibres de collagène ne sont plus assurés efficacement. Cela conduit à une organisation plus fibrillaire des torons de collagène circonférentiels et à une diminution globale de la rigidité en compression. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans l'étude précédente (chapitre 2), où une augmentation de la quantité de GAGs après induction d'arthrose a été observée. Cependant, dans la précédente étude, les lapins avaient reçu une injection de saline une fois par semaine ; il est donc possible que cette injection de saline ait accéléré le retour à la normale de la quantité de GAGs. En effet, Adams *et al.* (1983) ont montré sur les ménisques de chien que la quantité de GAGs diminuait suite à la dégradation, puis augmentait avec la progression de la pathologie.

Enfin, cette étude a permis de souligner l'importance d'utiliser une référence saine. Une forte variabilité des modules instantanés et à l'équilibre a été observée dans la région antérieure des ménisques controlatéraux. Pour certains individus, ces modules deviennent plus faibles dans la patte controlatérale que dans la patte opérée correspondante, ce qui mène à des conclusions erronées quant à l'effet de l'arthrose. Cette modification des propriétés viscoélastiques des ménisques controlatéraux peut s'expliquer par un transfert de poids, dû à la douleur dans la patte opérée. Ce transfert de poids semble être plus important dans la région

antérieure et dépendre des individus. Il serait intéressant pour des futures études de mesurer l'effort au niveau de chaque patte durant la période de développement de l'arthrose.

Ainsi, cette étude a montré une usure des ménisques au niveau de la surface et une diminution de la quantité de GAGs, provoquant une modification des propriétés viscoélastiques dans leur couche centrale. Le prochain chapitre vise à évaluer l'efficacité d'une thérapie de viscosupplémentation, souvent utilisée pour ralentir la progression d'arthrose et atténuer la douleur, sur les propriétés viscoélastiques du ménisque et sur sa microstructure.

CHAPITRE 4 – EFFET D’UNE THERAPIE DE VISCOSUPPLEMENTATION SUR LES PROPRIETES DES MENISQUES

Introduction du chapitre

Le chapitre précédent a permis de mieux comprendre les mécanismes d’altération des ménisques médiaux engendrés par l’induction d’arthrose à l’échelle microstructurale. Dans la région postérieure de ces ménisques, une rupture des fibres de collagène des couches superficielles a été observée, entraînant une rupture des fibres liantes. Dans la région antérieure de ces ménisques, une forte diminution de la quantité de GAGs a été montrée. Tous ces changements induisent une modification de l’organisation des fibres de collagène en profondeur et donc une diminution des propriétés viscoélastiques des ménisques dans les deux régions. De plus, la plupart des ménisques présentent des lésions macroscopiques six semaines après la rupture du LCA. Ces résultats soulignent la nécessité de diagnostiquer l’arthrose à un stade précoce et de développer des traitements pour prévenir ces dégradations.

La viscosupplémentation est une thérapie intra articulaire très utilisée par les patients souffrant d’arthrose symptomatique, consistant à injecter de l’acide hyaluronique dans le genou (figure 4.1) (Strauss *et al.*, 2009). Son rôle est de restaurer les propriétés viscoélastiques du liquide synovial pour qu’il assure sa fonction de lubrification. Plusieurs études ont montré des résultats prometteurs de ce traitement sur le cartilage, avec une surface plus lisse et une stimulation de la synthèse de protéoglycanes (Moreland, 2003). A l’heure actuelle, très peu d’études se sont intéressées à son effet sur le ménisque (Hope *et al.*, 1993; Sonoda *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). Cette problématique fait donc l’objet de ce chapitre.

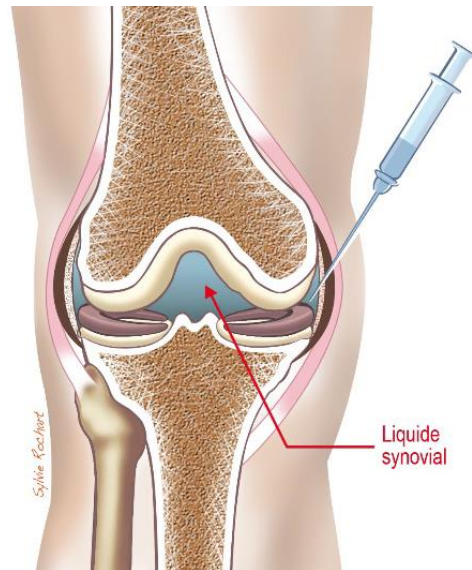


Figure 4.1 – Représentation schématique de l'injection intra-articulaire dans un genou droit (vue antérieure).
<<http://www.centre-orthopedique-santy.com/images/arthrose-je-m-informe-sur-la-viscosupplementation-2.jpg>>

Plusieurs produits de viscosupplémentation existent sur le marché (section 2.4.3, chapitre 1). Pour cette étude, le Synvisc one® (Hylan G-F 20) a été choisi. Le Synvisc® est un dérivé de l'acide hyaluronique composé de deux polymères hylanes réticulés dans une solution physiologique de chlorure de sodium (Migliore *et al.*, 2010). Le hylane A, qui compose 80% de la solution, est une molécule soluble à haut poids moléculaire (6000 kDa), tandis que le hylane B, qui compose 20% de la solution, est un gel insoluble. La plupart des produits de viscosupplémentation ont des temps de résidence dans l'articulation relativement courts, avec des temps de demi vie n'excédant pas 24h chez le lapin. Un des avantages du Synvisc® est que l'insolubilité du hylane B retarde sa suppression par les hyaluronidases, permettant au produit d'avoir des temps de résidence plus longs. Le Synvisc one® s'administre en une seule injection, au lieu de trois pour le synvisc®.

La population de douze lapins précédemment étudiée a été complétée par six lapins ayant reçu ce traitement. L'injection de Synvisc one® a eu lieu deux semaines après la rupture du LCA. Le tableau 4.1 récapitule les différents groupes, ainsi que les opérations chirurgicales et les traitements associés pour chacun d'eux. Le même protocole expérimental que celui présenté au chapitre 3 a ensuite été suivi pour ces lapins, à savoir l'évaluation macroscopique des lésions, la caractérisation des propriétés viscoélastiques par des essais d'indentation – relaxation, l'observation des fibres de collagène par microscopie confocale biphoton et la quantification des GAGs par histologie. Les différences statistiques entre les trois groupes (sain, opéré non traité, opéré traité) ont été évaluées par un test de Kruskal-Wallis sur chacun des paramètres.

CHAPITRE 4 – EFFET D'UNE THERAPIE DE VISCOSUPPLEMENTATION

	Semaine 0	Semaine 2	Semaine 6
Groupe sain			Prélèvement
Groupe opéré non traité	Rupture du LCA		Prélèvement
Groupé opéré traité	Rupture du LCA	1 injection de Synvisc one®	Prélèvement

Tableau 4.1 – Chronologie des interventions effectuées sur chacun des groupes. LCA : ligament croisé antérieur.

Effect of a viscosupplementation therapy on rabbit menisci in an anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis³

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the morphological, microstructural, and mechanical effects of a viscosupplementation therapy on rabbit menisci at an early stage of osteoarthritis (OA).

Design: Anterior Cruciate Ligament Transection (ACLT) was performed in twelve male New-Zealand White rabbits on the right knee joint. Six out of these twelve rabbits received an intra-articular injection of hyaluronic acid (HA) two weeks after ACLT. Six additional healthy rabbits served as controls. Medial menisci were removed for all right knees (n = 18) six weeks after ACLT and were graded macroscopically. Indentation-relaxation tests were performed in the anterior and posterior regions of the menisci. Collagen fibers organization and glycosaminoglycans (GAGs) content were assessed by biphotonic confocal microscopy and histology, respectively.

Results: Viscosupplementation significantly ($p = 0.002$) improved the surface integrity of the medial menisci compared to the operated non treated group. Moreover, the injection enhanced the GAGs synthesis in the anterior region of the menisci. However, the viscoelastic properties of both operated groups were significantly lower than those of the healthy group, which was explained by their collagen fiber organization. Both operated groups displayed disruption of the tie fibers due to structural alterations of the superficial layers from which they emanate, leading to modifications in the deep zone.

Conclusion: The viscosupplementation therapy prevents macroscopic lesions by improving the lubrication over the knee and enhances the GAGs synthesis of post traumatic OA menisci, but it fails to restore their collagen fibers organization and their viscoelastic properties.

Keywords: Meniscus; Osteoarthritis; Viscosupplementation; Viscoelasticity; Collagen; Glycosaminoglycans

³ Article à soumettre

Introduction

Menisci are essential for load transmission and shock absorption across the knee (Makris *et al.*, 2011). In healthy joints, these functions are fulfilled thanks to their complex mechanical behavior, which is mainly governed by their extracellular matrix (Danso *et al.*, 2015; Tissakht and Ahmed, 1995). In a previous study (Levillain *et al.*, 2016), we have demonstrated that post traumatic osteoarthritic (OA) menisci were torn at an early stage of disease progression. Moreover, they displayed a disruption of the tie collagen fibers in the posterior region as well as a decrease in the GAGs content in the anterior region, leading to modifications of the viscoelastic properties in both regions. These alterations contribute to the progression of OA and often create cartilage loss and subchondral bone defects (Ijima *et al.*, 2014). Currently, there is no efficient treatment to restore the meniscal properties in OA knees.

OA knees exhibit a decrease in the concentration and the molecular weight of hyaluronic acid (HA) in the synovial fluid (Moreland, 2002; Watterson and Esdaile, 2000), altering its lubricative properties. Viscosupplementation is a widely used intra-articular therapy for the non-operative management of patients with symptomatic OA, which consists in replacing the lost HA within the joint (Strauss *et al.*, 2009). Several injectable forms of HA are approved by Food and Drug Administration (Migliore *et al.*, 2010). Among them, Hylan G-F 20 is a high molecular weight crosslinked HA composed of a mixture of hylan A and hylan B, whose insolubility delays its removal from the joint. It is now well-established that HA injections provide pain relief and functional improvement in OA knees (Hemphfling, 2007; McArthur *et al.*, 2012), but their effects on the menisci have been poorly investigated (Hope *et al.*, 1993; Sonoda *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). Moreover, these studies were mostly limited to morphological and biochemical assessments. Thus, the effects of viscosupplementation therapy on the mechanical properties of the menisci are still unknown.

The aim of this study was to evaluate the effects of intra-articular injection of HA on the medial menisci in an anterior cruciate ligament transection (ACLT) rabbit model of OA. The surface integrity of the menisci, their collagen fibers organization, their GAGs content and their viscoelastic properties were assessed in the anterior and posterior regions through macroscopic grading, biphotonic confocal microscopy, histology, and indentation – relaxation testing, respectively.

1. Materials and methods

1.1. Animal model

All of the experiments and procedures involving animals were approved by the local Ethics Committee (ComEth Anses/ENVA/UPEC number 16) and were performed in full accordance with European legislation. Eighteen healthy adult male New Zealand White rabbits (six months of age, 3.8 kg in weight on average) that were free of degenerative joint disease were obtained from a licensed vendor (EUROLAP, Gosné, France). After two weeks

in acclimatization and quarantine, experimental OA was surgically induced by ACLT, performed by a trained veterinary surgeon, in the right knee of twelve rabbits. The complete rupture of the anterior cruciate ligament was assessed with the anterior drawer sign (manual horizontal dislocation) before the closure of the articular capsule. The left limb was not operated. The right operated limb was not immobilized postoperatively and the rabbits were allowed to move freely in their individual cages after surgery. The remaining six rabbits were not operated and are called “healthy rabbits” hereafter. Two weeks after ACLT, six out of twelve operated rabbits received a single 300 µL intra-articular injection of Hylan G-F 20 (Synvisc one®) (concentration: 48 mg/6mL; molecular weight: 6.10^3 kDa) in the right knee. These six rabbits are called “operated treated rabbits” and the six other operated rabbits are called “operated non treated rabbits” hereafter. After a six-week observation period, all rabbits were euthanized. The right knees were explanted and carefully dissected, and the medial menisci were detached. One operated treated rabbit was excluded of the study due to its abnormal behaviour. Degradations of the femoral meniscal surface and of the articular cartilages, as well as osteophyte production, were graded in the medial compartment of right healthy (n = 6), operated non treated (n = 6), and operated treated (n = 5) knees using the macroscopic grading system developed by Laverty *et al.* (2010) and given in Table 4.2.

Meniscus (femoral surface)

- 1 : Normal
 - 2 : Minimal fibrillation
 - 3 : Moderate surface fibrillation but no tears
 - 4 : Severe fibrillation, incomplete tears
 - 5 : Complete tears, bucket-handle tears or multiple incomplete tears
-

Articular cartilage (tibial and femoral condyles)

- 0 : Surface smooth with normal color
 - 1 : Surface rough with minimal fibrillation or a slight yellowish discoloration
 - 2 : Cartilage erosion extending into the superficial or middle layers
 - 3 : Cartilage erosion extending into the deep layers
 - 4 : Complete cartilage erosion with subchondral bone exposed
-

Osteophyte formation (tibial plateau, femoral condyles and trochlea)

- 0 : Absence
 - 1 : Mild
 - 2 : Moderate
 - 3 : Severe
-

Table 4.2 – Grading system used to quantify the meniscus and articular cartilage degradation as well as osteophyte formation (Laverty *et al.*, 2010).

1.2. Experimental procedure

The medial menisci (n = 17) from the right knee of all rabbits were stored at -20°C in wet compresses soaked with 10× PBS until ready for use in subsequent biomechanical and micro-architectural analyses. After thawing the menisci for one day at 4°C, two slices measuring 2 mm in width were cut with a scalpel in the anterior and posterior regions (Figure 4.2A), and each sample was cut parallel to the tibial meniscal surface, approximately 1 mm above this surface. Indentation-relaxation tests were performed on the (x,y) horizontal plane in the vertical direction (Figure 4.2B). Next, the tibial and femoral surfaces and deep zone of each sample were imaged by biphotonic confocal imaging (Figure 4.2C). Finally, the GAG content was quantified on the indented surface of each sample by histology.

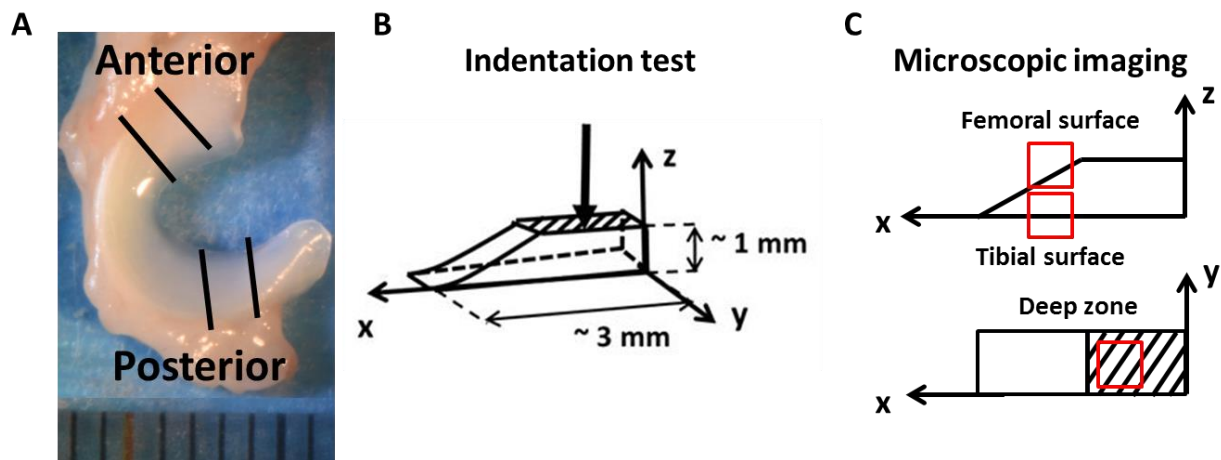


Figure 4.2 – Experimental procedure. A) Optical image of the femoral surface of a healthy medial meniscus and localization of the two studied regions (2 slices of 2 mm in width). Graduation: 1 mm. B) Cutting plane horizontal to the tibial surface and representation of the indentation direction (perpendicular to the cutting plane). C) Representation of the areas imaged by biphotonic microscopy (red squares). GAG content was quantified in the hatched area.

1.3. Mechanical analyses

Indentation-relaxation tests were performed on meniscus samples immersed in 10× PBS at 25°C using a commercial Nanoindenter (Agilent Nanoindenter G200; ScienTec, Les Ulis, France). The indenter was a spherical sapphire tip with a radius of curvature, R, of 0.479 mm. The tibial surface (opposite to the indented surface) was glued onto an aluminium support (glue 3; Loctite®). Indentation tests were conducted on three locations with a minimum spacing of 200 µm between two locations. Each series of tests on three locations was repeated three times. The difference between the calculated moduli on each point was always less than 5%. A constant displacement rate of 5 µm.s⁻¹ and a penetration of 100 µm were imposed to avoid surface and fiber disruption effects. Contact with the sample was defined from a slope of 5 N/m in the load vs displacement curve. The indenter displacement was then maintained for 400 s until equilibrium was reached. Unloading was carried out at 0.5 µm/s.

Both instantaneous and equilibrium moduli were determined from the resultant force-time data using a previously described method (Levillain *et al.*, 2016). The elastic fraction, f , was calculated according to Equation 4.1.

$$f = \frac{E_{eq}}{E_{ins}}, \quad (4.1)$$

where E_{eq} and E_{ins} are the equilibrium and instantaneous moduli, respectively.

The elastic fraction describes the elastic/viscous behaviour of the material: $f = 1$ corresponds to a perfectly elastic material, whereas $f = 0$ corresponds to a perfectly viscous material (Oyen, 2013). These parameters were calculated for each indent and were then averaged for each sample. As classically performed in nanoindentation, a rubber reference material was indented before each series of tests to calibrate the device.

1.4. Microscopic imaging and grading

The collagen microstructure was observed by biphotonic confocal imaging (A1RMP PLUS®, Nikon) using an excitation wavelength of 850 nm. Second harmonic generated light from collagen was collected at a channel with a specific band-pass filter of 400 to 490 nm. A 25×, 1.1-NA water immersion objective (CFI Apo LWD 25XW; Nikon) was used. The image field of view was $512 \times 512 \mu\text{m}^2$ with a resolution of 0.5 μm . To scan the thickness of the meniscus, stacks of 2D images were recorded in each area, with a time scan of 2 s and an average of two scans per image, every 2 μm from 0 to 200 μm in depth.

The whole stack of 2D images of the tibial and femoral surfaces of the menisci was projected using ImageJ 1.47v (NIH, Bethesda, Maryland, USA) on a single slice. Each pixel of the output image contained the maximum intensity value over all of the images in the stack at the particular pixel location. Moreover, 3D reconstructions of the image stack acquisitions in the deep zone were performed using NIS element Viewer (Nikon Instruments Europe B.V, France) to characterize the organization of the circumferential collagen fibers. The organization of the tie fibers with respect to the tibial and femoral superficial layers was characterized using the following grading system: grade 0: the tie fibers emanate from both surfaces; grade 1: the tie fibers are only linked to the tibial or femoral surface of the meniscus; grade 2: the tie fibers are not linked to the surface; and grade 3: no tie fibers are detected.

1.5. Detection of GAGs

After microscopic imaging, the meniscal samples were fixed in 10% formalin for GAG quantification. They were then embedded in paraffin and 4- μm -thick sections parallel to the indented surface were sliced using a Microm HM 340 E microtome. In each sample, at least two slices were stained with Safranin O-fast green (SOFG), which turns GAGs red.

Histological sections were imaged using an Eclipse TS100 microscope and a DS-FI2 colour camera (Nikon instruments). Red coverage of SOFG staining was semi-quantitatively analysed using ImageJ. Colour images were first converted to Red-Green-Blue stacks and were viewed as grey-scale images under the blue stack. Tissue appeared light, and SOFG-positive stained regions appeared dark. Images were analysed using the threshold function with a black to red ratio of 1:3. The percentage of GAG coverage was then measured for each section and was averaged for each sample.

1.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The differences in the macroscopic scores, mechanical data, microscopic score, and GAG coverage among the healthy, operated non treated, and operated treated groups were analysed using the Kruskal-Wallis test with a level of significance of 0.05, followed by a post-hoc Dunn's test with Bonferroni correction.

2. Results

2.1. Gross morphological assessment

The macroscopic scores attributed to meniscus and cartilage degradations as well as osteophyte formation are given in Table 4.3 for the healthy, operated non treated, and operated treated groups. All of the healthy rabbits displayed normal menisci, rare cartilage alterations, and minute osteophytes. The surface of the menisci was smooth and brilliant (Figure 4.3A). Operated non treated rabbits exhibited meniscal lesions with different degrees of severity (Figures 4.3B and 4.3C), fibrillation or erosion of both tibial and femoral cartilage, as well as osteophyte formation. One of the menisci displayed a bucket handle tear (Figure 4.3C) and the lesions were mainly located in the posterior region. The macroscopic score for meniscal degradation was significantly lower ($p = 0.002$) for operated non treated than for operated treated groups. All of the menisci from the operated treated knees had a minimal score, with a smooth and brilliant surface (Figure 4.3D), as for the healthy group. Moreover, tibial and femoral cartilage scores were significantly lower ($p = 0.0004$ and $p = 0.02$, respectively) for the operated treated group than for the operated non treated group and were very similar to those of the healthy group. On the contrary, the macroscopic scores for osteophyte formation in the tibial plateau and in the trochlea were significantly higher ($p = 0.0007$ and $p = 0.001$, respectively) for the operated treated group than for the healthy group and were very similar to those of the operated non treated group.

Group	Rabbit #	Meniscus	Cartilage		Osteophyte formation		
			Tibia	Femur	Tibia	Condyle	Trochlea
Healthy	1	1	1	0	0	0	0
	2	1	1	1	1	0	0
	3	1	1	0	0	0	0
	4	1	1	0	0	0	0
	5	1	1	0	0	1	0
	6	1	1	1	0	0	0
	Mean	1	1	0.17	0.33*	0	0*
Operated non treated	7	1	2	1	1	1	3
	8	3	2	1	1	0	2
	9	5	2	1	1	2	2
	10	5	2	1	1	1	3
	11	2	2	2	1	0	1
	12	2	2	1	2	1	2
	Mean	3*	2*	1.2*	1.2	0.83	2.2
Operated treated	13	1	1	1	1	0	1
	14	1	1	0	1	0	3
	15	1	1	0	2	0	3
	16	1	1	0	2	0	3
	17	1	1	1	1	2	3
	18	1	1	1	1	2	3
	Mean	1	1	0.4	1.6	0.6	2.4

Table 4.3 – Grading score of meniscus and cartilage degradation, as well as osteophyte formation, in the medial compartment of the healthy, operated non treated and operated treated knees. * denotes a significant difference from the operated treated group.

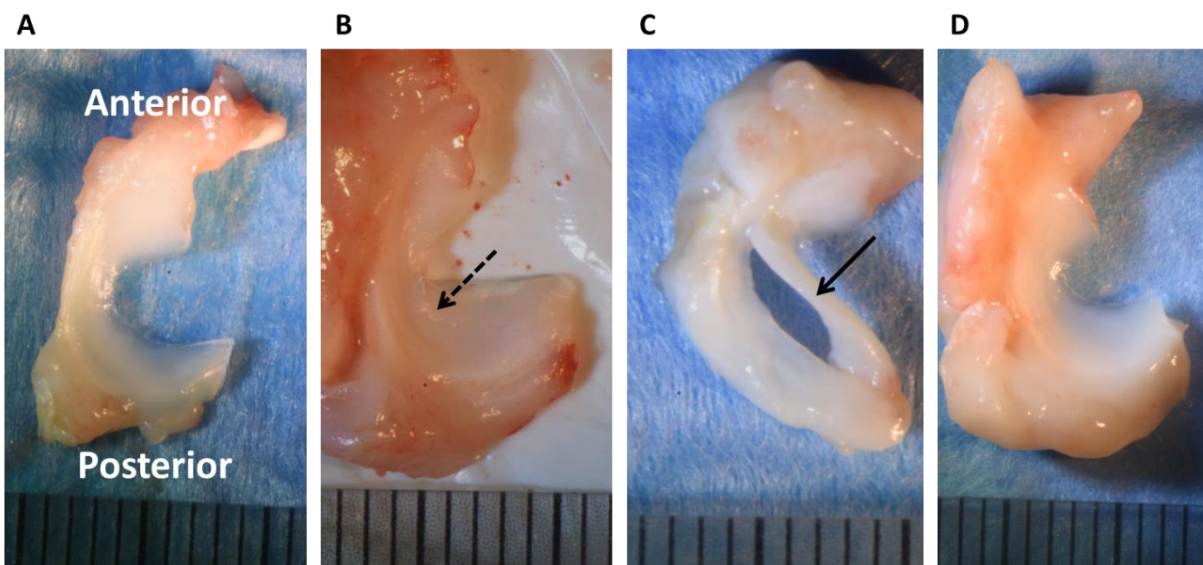


Figure 4.3 – Optical images of medial menisci from A) healthy, B) and C) operated non treated, and D) operated treated groups. B) Presence of moderate fibrillation (dashed arrow). C) Presence of a bucket handle tear (arrow). Graduation: 1 mm.

2.2. Viscoelastic properties

The instantaneous modulus, equilibrium modulus, and elastic fraction of the menisci in each region are given in Figure 4.4 for healthy, operated non treated, and operated treated groups. The equilibrium moduli in the anterior region of the menisci from the operated non treated and operated treated groups were significantly lower ($p = 0.0149$ and $p = 0.0059$, respectively) than that of menisci from the healthy group, with respective mean values of 0.26 MPa, 0.26 MPa, and 0.60 MPa. Moreover, the elastic fraction in the posterior region were significantly lower for the operated non treated ($p = 0.038$) and operated treated ($p = 0.0078$) groups than for the healthy group, with respective mean values of 0.16, 0.14, and 0.22. None of the mechanical parameters were significantly different between operated non treated and operated treated groups. However, the variability of the mechanical parameters of the menisci in the anterior region was higher for the operated treated group than for the operated non treated group.

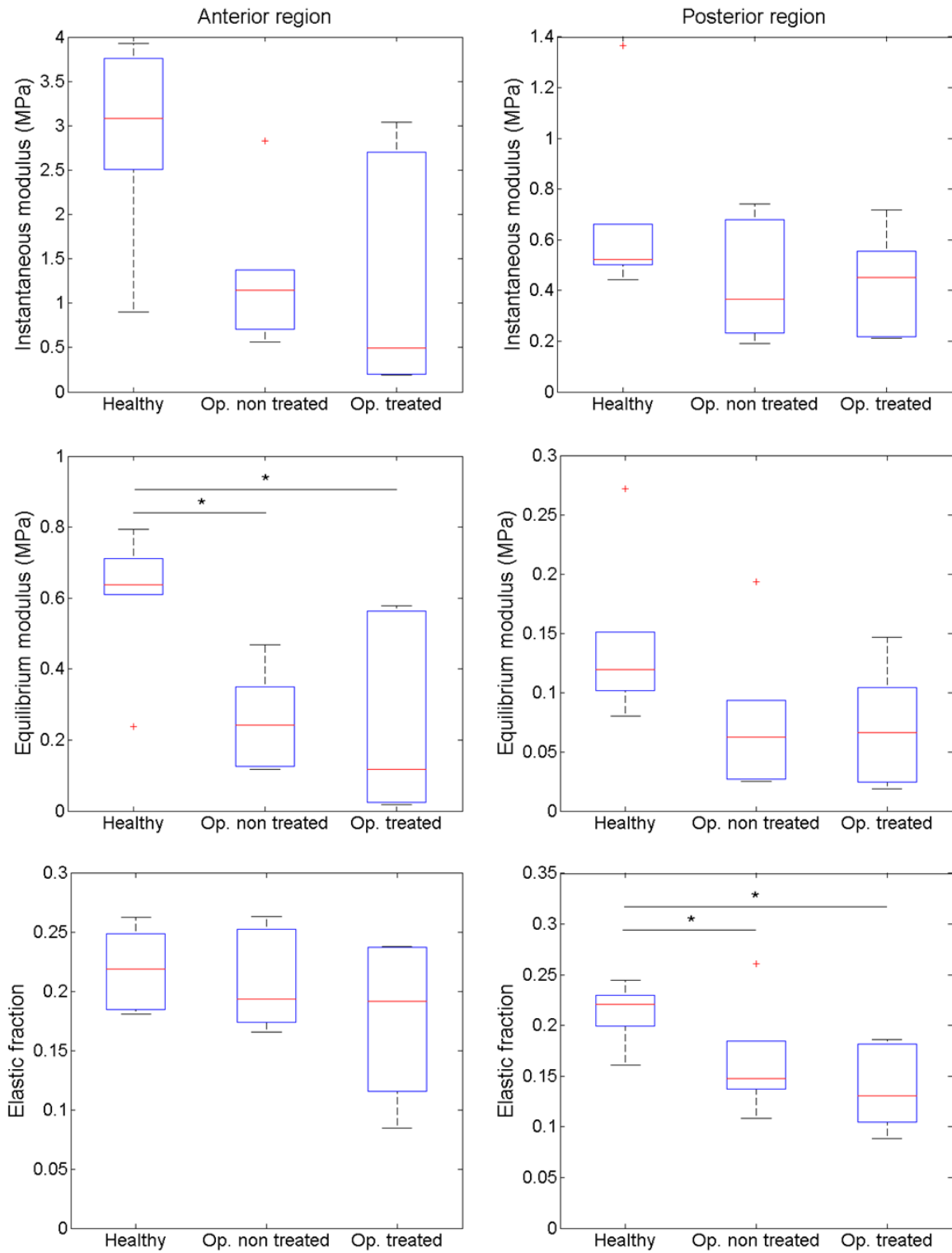


Figure 4.4 – Instantaneous modulus, equilibrium modulus, and elastic fraction of menisci from the healthy, operated non treated, and operated treated groups, in the anterior and posterior regions. * denotes a significant difference between two groups.

2.3. Collagen fibers organization

Representative 3D reconstructions of collagen fibers in the deep zone are given in Figure 4.5, for each region of the menisci from the healthy, operated non treated and operated treated groups. Menisci from the healthy knees displayed compact collagen bundles that were made of straight fibers aligned in the circumferential direction (Figures 4.5A and 4.5D). By contrast, menisci from the operated non treated (Figures 4.5B and 4.5E) and operated treated (Figures 4.5C and 4.5F) knees displayed less compact bundles, with undulated fibers in both regions.

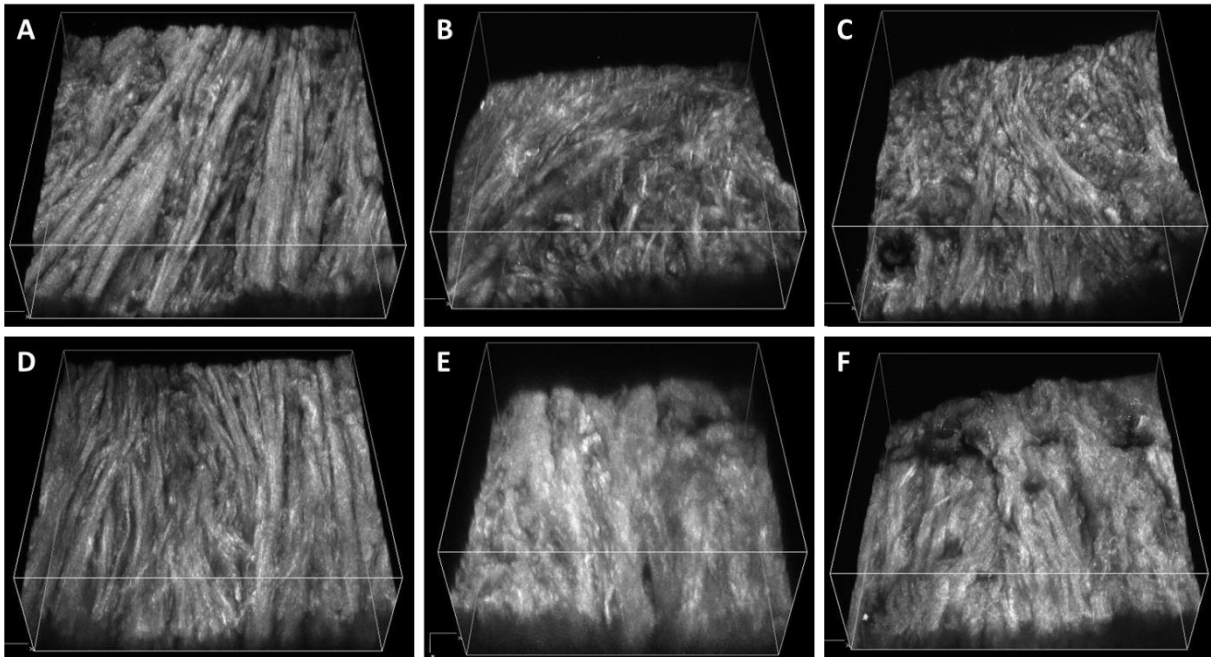


Figure 4.5 – Representative 3D reconstructions of collagen fibers in the anterior (A,B,C) and posterior (D,E,F) regions of healthy (A,B), operated non treated (B,E), and operated treated (C,F) medial menisci.

The microscopic scores for tie fibers organization are given in Table 4.4 for healthy, operated non treated, and operated treated knees, in each region. All of the menisci from the healthy group had a null microscopic score in each region. This score significantly increased in the anterior ($p = 0.006$) and posterior ($p = 0.004$) regions of the menisci from the operated treated groups, with mean values of 2 and 1.4, respectively. No significant difference was found between the microscopic scores of the menisci from the operated non treated and operated treated groups, in any region.

Group	Score tie fibers	
	Anterior region	Posterior region
Healthy	0 ± 0*	0 ± 0*
Operated non treated	1 ± 1.5	1.5 ± 1.3
Operated treated	2 ± 1.3	1.4 ± 0.8

Table 4.4 – Microscopic scores for tie fibers in each region of medial menisci from healthy, operated non treated and operated treated knees. Values are given as the means ± std. * denotes a significant difference from the operated treated group.

2.4. GAGs coverage

Measurements of GAGs coverage are given in Figure 4.6 for healthy, operated non treated and operated treated groups, in each region of the menisci. The anterior region of the menisci from the operated non treated group demonstrated a significant decrease ($p = 0.0074$) in GAGs coverage compared to the healthy group. The GAGs coverage in the anterior region of the menisci from the operated treated group was not significantly different to that of the healthy group, nor to that of the operated non treated group, and showed a great variability of values. GAGs coverage was very low in the posterior region of the menisci and no significant difference was found between the groups.

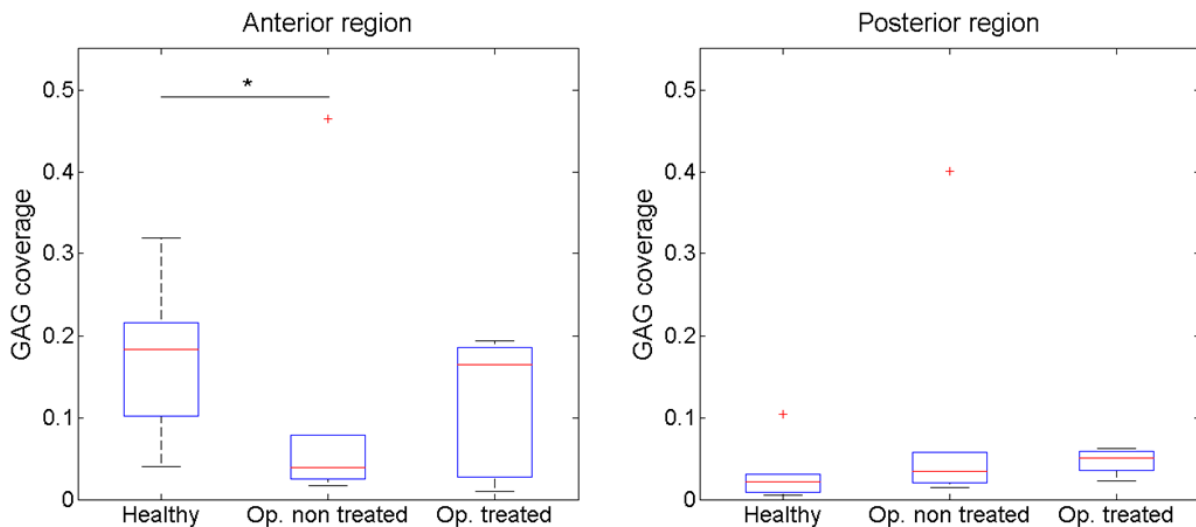


Figure 4.6 – GAG coverage in healthy, operated (Op.) non treated, and operated (Op.) treated medial menisci, in the anterior and posterior regions. * denotes a significant difference between two groups.

3. Discussion

OA induced by ACLT results in degenerative changes in the menisci, which have been investigated morphologically (Boulocher *et al.*, 2008; Fischenich *et al.*, 2015; Hellio Le Graverand *et al.*, 2001; Killian *et al.*, 2010b; Levillain *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2002), histologically (Fischenich *et al.*, 2015 and 2016; Levillain *et al.*, 2015 and 2016; Lopez-

Franco *et al.*, 2011) and mechanically (Fischenich *et al.*, 2015 and 2016; Levillain *et al.*, 2015 and 2016; Wheatley *et al.*, 2015) at an early stage of disease progression. To the best of our knowledge, this is the first study examining the effect of a viscosupplementation therapy on the morphological, microstructural, and mechanical properties of the medial menisci using a post traumatic model of OA. This study showed promising results of HA injection for the early treatment of OA menisci at the macroscopic scale, but it did not demonstrate significant effect on their mechanical behavior.

Intra-articular injection of HA in the OA knees greatly improved the surface integrity of the menisci and cartilages in the medial compartment. All menisci from the operated treated group had a normal appearance, with a smooth and brilliant surface, while most of the menisci from the operated non treated group had gross morphological evidence of fibrillation or tearing. This finding supports the effect of viscosupplementation in improving the lubrication over the OA knee (Strauss *et al.*, 2009; Moreland, 2003). Inconsistent results were obtained in another study on rabbit menisci, in which sodium hyaluronan was first injected four weeks after ACLT (Sonoda *et al.*, 2000). They did not find any significant difference in the medial meniscal tear frequencies between control operated and HA-injected knees nine weeks after OA induction. This discrepancy may be due to the different HA formulations or to the different times of first injection, as Hellio Le Graverand *et al.* (2001a) showed that most rabbit medial menisci presented with fibrillation or tears as early as three weeks after ACLT. Taken together, these findings emphasized the need for early viscosupplementation therapy to prevent the occurrence of meniscal lesions at the macroscopic scale.

Surprisingly, biphotonic confocal imaging did not reveal any significant difference in the organization of the collagen fibers at the surface and in the deep zone of the menisci between operated non treated and operated treated groups. Both groups displayed disruption of the tie fibers, due to alterations of the superficial layers from which they emanate (Andrews *et al.*, 2014; Rattner *et al.*, 2011). As a consequence, these tie fibers could not resist the separation of the circumferential collagen bundles in the deep zone, which were less packed and more undulated compared to those of the healthy group. This result indicates that, while the viscosupplementation therapy improved the lubrication over the knee and significantly decreased the occurrence of macroscopic lesions, it did not prevent tearing of the surface at the microscopic scale, leading to structural modifications in the deep zone.

As a result, no significant effect of the viscosupplementation therapy was found on the viscoelastic properties of the menisci. None of the mechanical parameters were significantly different between operated non treated and operated treated groups, while the equilibrium modulus in the anterior region and the elastic fraction in the posterior region of the menisci from the operated treated group were significantly lower than those of the healthy group. These results imply that HA injection in the OA knee did not allow the mechanical properties of the menisci to revert to normal. However, it is worst noting that menisci from the operated treated groups showed a greater variability of the instantaneous and equilibrium moduli in the anterior region, with higher maximal values. One possible explanation is that mechanical

alterations occurred in the first weeks following OA induction and that HA injection slowed down the decrease in the mechanical properties of the preserved menisci two weeks after ACLT. This hypothesis is in agreement with the study of Fischenich *et al.* (2016), who showed that the instantaneous and equilibrium moduli of the rabbit menisci were decreased four weeks after OA induction and were then stabilized, indicating that mechanical alterations occurred very early in the progression of the disease.

Histological analysis demonstrated a beneficial effect of the viscosupplementation therapy on the GAGs content of the menisci. GAGs are essential in healthy menisci to support the compressive loading and facilitate collagen sliding (Vanderploeg *et al.*, 2012). Several studies demonstrated that their content decreased following post traumatic OA (Adams *et al.*, 1983; Fischenich *et al.*, 2014, 2015, 2016; Le Graverand *et al.*, 2011; Kwok *et al.*, 2016) and then increased to revert to normal (Adams *et al.*, 1983; Fischenich *et al.*, 2016). In the present study, it was found that the operated non treated knees exhibited a significant decrease in the GAGs coverage of the menisci in the anterior region six weeks after ACLT, while no significant difference was found between the healthy and operated treated groups. These results are consistent with those obtained by Hope *et al.* (1993) and Sonoda *et al.* (2000) and suggest that HA played a role in GAGs regulation of OA menisci, as observed in OA cartilage (Williams *et al.* 2003).

In conclusion, this study demonstrated the positive effect of the viscosupplementation therapy in preventing macroscopic lesions and regulating the GAGs synthesis of post traumatic OA menisci. However, it did not show any significant effect of the treatment on the disorganization of the collagen fibers at the surface and in the deep zone, leading to lower mechanical properties than healthy menisci. These microstructural and mechanical changes likely occurred in the first weeks following OA induction and could not be addressed by the treatment. Several studies demonstrated the importance of the injection timing on the efficacy of the viscosupplementation therapy (Moreland, 2003). Thus, the effect of an earlier HA injection in preventing alterations of the microstructural and mechanical properties of the menisci merits future studies.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'effet d'une thérapie de viscosupplémentation sur les ménisques médiaux a été étudié à un stade précoce d'arthrose. Les résultats ont montré un effet positif du traitement sur l'état de surface des ménisques à l'échelle macroscopique, confirmant son rôle dans l'amélioration de la lubrification au niveau du genou. Par contre, il n'a pas été observé de différence qualitative dans l'organisation des fibres de collagène des ménisques entre les groupes traités et non traités, ni au niveau de la couche centrale, ni au niveau des couches superficielles. En effet, les fibres de collagène à la surface des ménisques traités sont rompues ; les fibres liantes n'assurent donc plus leur fonction de maintien des torons de collagène en profondeur, qui se désorganisent et deviennent moins compacts que dans les ménisques sains. Par conséquent, les propriétés mécaniques des ménisques du groupe traité ne sont pas significativement améliorées par rapport au groupe non traité. Une hypothèse possible est que les fibres de collagène au niveau des couches superficielles se sont rompues dans les premières semaines après l'induction d'arthrose, avant que l'acide hyaluronique ait été injecté dans l'articulation. Ainsi, en améliorant la lubrification au niveau du genou, la viscosupplémentation a permis de ralentir la progression de ces lésions à l'échelle macroscopique, mais n'a pas rétabli l'organisation initiale des fibres de collagène. Elle aurait donc plus un rôle préventif que curatif sur la formation de ces lésions macroscopiques.

Cette étude a également mis en évidence l'effet de l'injection d'acide hyaluronique sur la régulation de la synthèse de GAGs dans la région antérieure des ménisques. Des études ont montré que la quantité de GAGs des ménisques arthrosiques diminuait, puis qu'elle augmentait après plusieurs semaines jusqu'à atteindre une quantité normale (Adams *et al.*, 1983 ; Fischenich *et al.*, 2016). Après l'injection du traitement, plusieurs ménisques ont une quantité de GAGs similaire à celle des ménisques sains, tandis que les ménisques non traités n'ont quasiment plus de GAGs. La viscosupplémentation joue donc un rôle dans la régulation des GAGs des ménisques arthrosiques, qui ont un rôle essentiel pour supporter les efforts de compression et faciliter le glissement entre les fibres de collagène (Vanderploeg *et al.*, 2012).

Ainsi, la thérapie de viscosupplémentation a des effets positifs sur l'état de surface des ménisques et sur la synthèse de GAGs, mais n'a pas d'effet significatif sur leur microstructure ni sur leurs propriétés viscoélastiques. Des études futures pourraient être effectuées en diminuant la durée entre l'induction d'arthrose et la première injection, pour déterminer si cette thérapie pourrait être efficace comme traitement préventif de l'arthrose au niveau des ménisques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les ménisques du genou sont des tissus complexes, à la fois au niveau de leur anatomie, de leur microstructure et de leurs propriétés mécaniques. Ils assurent des fonctions essentielles au sein de l'articulation, telles que la transmission des efforts et l'absorption des chocs. En cas d'arthrose, ils subissent des lésions et des modifications de leurs propriétés à différentes échelles, notamment en cas d'arthrose post-traumatique (rupture du ligament croisé antérieur par exemple). L'objectif de ce travail de thèse était de proposer une caractérisation expérimentale multi-échelle des ménisques du genou, afin d'étudier l'effet de l'arthrose et d'un traitement commercial sur leurs propriétés morphologiques, microstructurales et mécaniques à un stade précoce de développement de la pathologie. Pour ce faire, un modèle animal a été utilisé : notre choix s'est porté sur la rupture du ligament croisé antérieur chez le lapin, qui est un modèle très répandu pour l'étude de l'arthrose post-traumatique.

L'étude bibliographique (chapitre 1) a mis en évidence les fortes relations existant entre la matrice extracellulaire des ménisques sains et leurs propriétés mécaniques. Deux composants majeurs participent à la résistance des efforts de traction et de compression : les fibres de collagène et les GAGs. Leur orientation et leur distribution dans le ménisque donnent lieu à un comportement mécanique anisotrope et à des propriétés mécaniques très hétérogènes, dépendant notamment du site anatomique (médial, latéral) et de la région méniscale (antérieure, postérieure). Les modifications de ces composants de la matrice extracellulaire avec l'arthrose et les conséquences sur les propriétés mécaniques des ménisques n'avaient jamais été étudiées simultanément.

Un protocole expérimental a donc été développé pour caractériser les ménisques de lapin des sites médial et latéral, dans les régions antérieure et postérieure, à travers plusieurs techniques et à différentes échelles. L'état de surface des ménisques, leurs propriétés mécaniques dans la couche centrale, la structure secondaire du collagène, l'organisation des fibres et la quantité de GAGs ont été déterminés respectivement à partir d'un score macroscopique, d'essais d'indentation, de microspectroscopie Raman, de microscopie confocale biphotonique et d'une analyse histologique. Toutes ces techniques de caractérisation ont été utilisées sur les mêmes échantillons, permettant ainsi de minimiser le nombre de lapins nécessaires et de pouvoir établir des relations entre les différentes propriétés.

Ce protocole a permis d'étudier l'effet précoce de l'arthrose post-traumatique sur les propriétés des ménisques. Une première étude (chapitre 2) a été effectuée sur un faible nombre d'échantillons, en utilisant un modèle mécanique simplifié qui ne prend pas en compte la viscosité du tissu et en se focalisant sur l'organisation des fibres de collagène dans

une seule couche du ménisque : la couche centrale. La référence était ici la patte controlatérale. Cette étude a permis de déterminer les principales modifications engendrées par ce type d'arthrose, ainsi que la direction de sollicitation et le site anatomique les plus pertinents à étudier. Cette étude préliminaire a montré une baisse globale de la rigidité des ménisques, une modification de l'organisation des fibres de collagène et de la quantité de GAGs, mais pas de modification de la structure secondaire du collagène, ni de présence de minéralisation. Elle a également mis en évidence la conservation de l'anisotropie du comportement mécanique des ménisques avec l'arthrose et la forte hétérogénéité des propriétés entre les régions antérieure et postérieure. Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les sites médial et latéral.

A partir de ces résultats, une caractérisation plus complète de la microstructure des ménisques médiaux de six lapins arthrosiques et de six lapins sains a été effectuée dans les régions antérieure et postérieure, ainsi qu'une modélisation plus réaliste de leur comportement viscoélastique à partir d'essais d'indentation – relaxation dans la direction verticale (chapitre 3). Cette étude a révélé deux mécanismes de dégradation différents en fonction de la région, avec une altération des couches superficielles dans la région postérieure, entraînant une rupture des fibres de collagène liantes, et une forte diminution de la quantité de GAGs dans la région antérieure, entravant le glissement entre les fibres. Ces deux phénomènes engendrent une modification de l'organisation des fibres de collagène en profondeur (couche centrale) et donc également des propriétés viscoélastiques. De plus, la plupart des ménisques présentent de la fibrillation en surface et des lésions macroscopiques. Cette étude a également mis en avant les différences de propriétés mécaniques entre les ménisques de la patte controlatérale et les ménisques de la patte saine, qui peuvent s'expliquer par un report de poids des lapins arthrosiques. Cela souligne l'importance du choix de la référence pour ce type d'études.

Enfin, l'effet d'une thérapie de viscosupplémentation, couramment utilisée dans le cas d'arthrose symptomatique, a été étudié sur des ménisques médiaux à partir du même protocole de caractérisation qu'au chapitre 3 (chapitre 4). Injecté dans l'articulation deux semaines après l'induction d'arthrose, ce traitement améliore l'état de surface des ménisques à l'échelle macroscopique et participe à la régulation des GAGs dans la région antérieure, mais n'a pas d'effet significatif sur l'organisation des fibres de collagène, ni sur les propriétés viscoélastiques.

En conclusion, nous avons montré au cours de cette thèse que le ménisque était un marqueur précoce d'arthrose dans le cas d'une rupture du LCA. Le ménisque médial subit de fortes modifications au niveau de l'organisation de ses fibres de collagène et de sa quantité de GAGs, entraînant une diminution de ses propriétés mécaniques et la formation de lésions à l'échelle macroscopique. Bien que l'injection d'acide hyaluronique améliore l'état de surface des ménisques et participe à la régulation des GAGs, ce traitement ne permet pas de retrouver les propriétés mécaniques de ménisques sains.

Ce travail de thèse soulève plusieurs interrogations et présente certaines limitations; nous proposons donc des pistes de réflexion pour des travaux futurs. Tout d'abord, dans cette étude, il n'a pas été observé d'efficacité du traitement au niveau des couches superficielles du ménisque à l'échelle microscopique. En effet, une rupture des fibres de collagène est observée, alors que l'absence de lésions à l'échelle macroscopique semble confirmer son effet dans l'amélioration de la lubrification. Une explication possible est que la rupture des fibres a eu lieu avant l'injection du traitement, soit dans les deux premières semaines qui ont suivi l'induction d'arthrose. Ainsi, en injectant l'acide hyaluronique dans l'articulation immédiatement après la rupture du LCA, on peut penser que le traitement ralentirait la dégradation des couches superficielles à l'échelle microscopique et donc également la diminution des propriétés viscoélastiques des ménisques. Pour vérifier cette hypothèse et évaluer l'efficacité de la viscosupplémentation en préventif, une étude similaire à celle effectuée dans cette thèse consisterait à caractériser les ménisques de lapins deux semaines après la rupture du LCA, avec un groupe opéré non traité et un groupe opéré traité immédiatement après l'induction d'arthrose.

De plus, il serait intéressant de suivre le développement de l'arthrose et l'effet du traitement sur les ménisques en effectuant une étude à différents stades. Cela permettrait de mieux comprendre les interactions entre la désorganisation des fibres de collagène et la dégradation ou synthèse des GAGs, ainsi que l'action du traitement sur la régulation des GAGs. Les chapitres 2 et 3 suggèrent que la diminution de la quantité de GAGs provoque une désorganisation des fibres de collagène, puis que la quantité de GAGs augmente dans les zones dégradées. Une étude effectuée à plusieurs stades de développement de l'arthrose, qui pourrait être complétée par une étude de l'activité des enzymes extracellulaires, permettrait d'identifier les phases de synthèse et de dégradation des constituants de la matrice. De plus, on pourrait déterminer si l'injection d'acide hyaluronique prévient la diminution des GAGs, ou si elle a pour effet de stimuler la synthèse de GAGs. Ainsi, la connaissance de ces mécanismes pourrait permettre à plus long terme de développer de nouveaux traitements plus ciblés.

Enfin, la compréhension des relations entre les composants de la matrice extracellulaire et les propriétés mécaniques des ménisques pourrait conduire à l'élaboration d'un modèle micromécanique. Dans le cadre de cette thèse, le comportement viscoélastique des ménisques a été caractérisé à partir d'un modèle rhéologique, qui a permis de déterminer la réponse instantanée et à l'équilibre du matériau ainsi que sa viscosité. Avec ce modèle, nous avons pu établir des relations qualitatives entre la modification des paramètres viscoélastiques et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Un modèle micromécanique permettrait de limiter le nombre de paramètres à identifier et de leur attribuer un sens physique. Nous pourrions ainsi prendre en compte l'orientation, l'ondulation et la densité des fibres de collagène ainsi que la quantité et la répartition des GAGs.

Références

Abdelgaied, A., Stanley, M., Galfe, M., Berry, H., Ingham, E., Fisher, J., Comparison of the biomechanical tensile and compressive properties of decellularised and natural porcine meniscus, *Journal of Biomechanics*, 48(8), 1389-1396, 2015.

Abraham, A.C., Pauly, H.M., Haut Donahue, T.L., Deleterious effects of osteoarthritis on the structure and function of the meniscal enthesis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, 275-283, 2014.

Abramson, S.B., Attur, M., Developments in the scientific understanding of osteoarthritis, *Arthritis Research and Therapy*, 11(3), 227, 2009.

Adams, M.E., Muir, H., The glycosaminoglycans of canine menisci, *The Biochemical Journal*, 197(2), 385-389, 1981.

Adams, M.E., Billingham, M.E.J., Muir, H. The glycosaminoglycans in menisci in experimental and natural osteoarthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 26(1), 69-76, 1983.

Alexopoulos, L.G., Williams, G.M., Upton, M.L., Setton, L.A., Guilak, F., Osteoarthritic changes in the biphasic mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage, *Journal of Biomechanics*, 38(3), 509-517, 2005.

Allen, A.A., Caldwell, G.L., Fu, F.H., Anatomy and biomechanics of the meniscus, *Operative Techniques in Orthopaedics*, 5(1), 2-9, 1995.

Allen, C.R., Wong, E.K., Livesay, G.A., Sakane, M., Fu, F.H., Woo, S.L.-Y., Importance of the medial meniscus in the anterior cruciate ligament-deficient knee, *Journal of Orthopaedic Research*, 18, 109-115, 1999.

Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T.D., Greenwald, R., Hochberg, M., Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association, *Arthritis and Rheumatism*, 29(8), 1039-1049, 1986.

Altman, R.D., Ibuprofen, acetaminophen and placebo in osteoarthritis of the knee: a six-day double-blind study [abstract]. *Arthritis & Rheumatism*, 42(9), 1999.

American College of Rheumatology subcommittee on osteoarthritis guidelines, Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee, *Arthritis & Rheumatism*, 43(9), 1905-1915, 2000.

- Andersson-Molina, H., Karlsson, H., Rockborn, P., Arthroscopic partial and total meniscectomy: A long-term follow-up study with matched controls, *Arthroscopy*, 18(2), 183-189, 2002.
- Andrews, S., Shrive, N., Ronsky, J., The shocking truth about meniscus, *Journal of Biomechanics*, 44, 2737-2740, 2011.
- Andrews, S.H.J., Ronsky, J.L., Rattner, J.B., Shrive, N.G., Jamniczky, H.A., An evaluation of meniscal collagenous structure using optical projection tomography, *BMC Medical Imaging*, 13-21, 2013.
- Andrews, S.H.J., Rattner, J.B., Abusara, Z., Adesida, A., Shrive, N.G., Ronsky, J.L., Tie-fibre structure and organization in the knee menisci, *Journal of anatomy*, 224, 531-537, 2014.
- Arnoczky, S.P., Warren, R.F., Microvasculature of the human meniscus, *The American Journal of Sports Medicine*, 10(2), 90-95, 1982.
- Arnoczky, S.P., Warren, R.F., The microvasculature of the meniscus and its response to injury: An experimental study in the dog, *The American Journal of Sports Medicine*, 11(3), 131-141, 1983.
- Aspden, R.m., Yarker, Y.E., Hukins, W.L., Collagen orientations in the meniscus of the knee joint, *Journal of Anatomy*, 140(3), 371-380, 1985.
- Ayhan, E., Kesmezacar, H., Akgun, I., Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis, *World Journal of Orthopedics*, 5(3), 351-361, 2014.
- Baptiste, D.L., Kirkley, A., Laverty, S., Thain, L.M., Spouge, A.R., Holdsworth, D.W., Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT, *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(12), 986-996, 2004.
- Baratz, M.E., Fu, F.H., Mengato, R., Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report, *The American Journal of Sports Medicine*, 14, 270-275, 1986.
- Baro, V.J., Bonnevie, E.D., Lai, X., Price, C., Burris, D.L., Wang, L., Functional characterization of normal and degraded bovine meniscus: Rate-dependent indentation and friction studies, *Bone*, 51, 232-40, 2012.
- Bellamy, N., The WOMAC Knee and Hip Osteoarthritis Indices: Development, validation, globalization and influence on the development of the AUSCAN Hand Osteoarthritis Indices, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 23(39), 148-153, 2005.
- Bendele, A.M., Animal models of osteoarthritis, *Journal of Musculoskeletal & neuronal interactions*, 1(4), 363-376, 2001.

- Berthiaume, M.-J., Raynauld, J.-P., Martel-Pelletier, J., Labonte, F., Beaudoin, G., Bloch, D.A., Choquette, D., Haraoui, B., Altman, R.D., Hochberg, M., Meyer, J.M., Cline, G.A., Pelletier, J.-P., Meniscal tear and extrusion are strongly associated with progression of symptomatic knee osteoarthritis as assessed by quantitative magnetic resonance imaging. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 556-563, 2005.
- Bloecker, K., Wirth, W., Hudelmaier, M., Burgkart, R., Frobell, R., Eckstein, F., Morphometric differences between the medial and lateral meniscus in healthy men - A three-dimensional analysis using magnetic resonance imaging, *Cells Tissue Organs*, 195, 353-364, 2012.
- Boulocher, C., Duclos, M.E., Arnault, F., Roualdes, O., Fau, D., Hartmann, D.J., Roger, T., Vignon, E., Viguier, E., Knee joint ultrasonography of the ACLT rabbit experimental model of osteoarthritis: relevance and effectiveness in detecting meniscal lesions, *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(4), 470-479, 2008.
- Breville, P., Le Quintrec, J.-L., Cadet, C., Verlhac, B., Vetel, J.-M., Levy-Raynaud, O., Jeandel, C., Maheu, E., Association gériatrie et rhumatologie, Le fardeau de l'arthrose, *Cahiers de l'Année Gériatologique*, 7, 45-51, 2015.
- Brouwer, R.W., Huizinga, M.R., Duivenvoorden, T., Van Raaij, T.M., Verhagen, A.P., Bierma-Zeinstra, S.M.A., Verhaar, J.A.N., Osteotomy for treating knee osteoarthritis, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, 2014.
- Buckwalter, J.A., Felson, D.T., Post-traumatic arthritis: Definitions and burden of disease, *Post-Traumatic Arthritis*, 7-15, 2015.
- Bullough P.G., Munuera L., Murphy J., Weinstein A.M., The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure, *Journal of Bone Joint Surgery*, 53(3), 564-570, 1970.
- Chen, D.-L., Yang, P.-F, Lai, Y.-S., A review of three-dimensional viscoelastic models with an application to viscoelasticity characterization using nanoindentation, *Microelectronics Reliability*, 52(3), 541-558, 2012.
- Cheng, Y.T., Cheng, C.H., Relationship between contact stiffness, contact depth, and mechanical properties for indentation in linear viscoelastic solids using axisymmetric indenters, *Structural Control and Health Monitoring*, 13, 561-659, 2006.
- Cheung, H.S., Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci, *Connective tissue research*, 16(4), 343-356, 1987.
- Chevrier A., Nelea M., Hurtig M.B., Hoemann C.D., Buschmann M.D., Meniscus structure in human, sheep, and rabbit for animal models of meniscus repair, *Journal of Orthopaedic Research*, 27, 1197:1203, 2009.

Chia, H.N., Hull, M.L., Compressive moduli of the human medial meniscus in the axial and radial directions at equilibrium and at a physiological strain rate, *Journal of Orthopaedic Research*, 26(7), 951-956, 2008.

Cicuttini, F.M., Baker, J., Hart, D.J., Spector, T.D., Association of pain with radiological changes in different compartments and views of the knee joint, *Osteoarthritis and Cartilage*, 4(2), 143-147, 1996.

Coatney, G.A., Abraham, A.C., Fischenich, K.M., Button, K.D., Haut, R.C., Haut-Donahue, T.L., Efficacy of P188 on lapine meniscus preservation following blunt trauma, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 47, 57-64, 2015.

D'Lima, D.D., Fregly, B.J., Patil, S., Steklov, N., Colwell, C.W., Knee joint forces: prediction, measurement, and significance, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineerings*, 226(2), 95-102, 2012.

Danso, E.K., Honkanen, J.T.J., Saarakkala, S., Korhonen, R.K., Comparison of nonlinear mechanical properties of bovine articular cartilage and meniscus, *Journal of Biomechanics*, 47, 200-206, 2014.

Danso, E.K., Mäkelä, J.T.A., Tanska, P., Mononen, M.E., Honkanen, J.T.J., Jurvelin, J.S., Töyräs, J., Julkunen, P., Korhonen, R.K., Characterization of site-specific biomechanical properties of human meniscus – Importance of collagen and fluid on mechanical non linearities, *Journal of Biomechanics*, 48(8), 1499-1507, 2015.

Ebenstein, D.M., Kuo, A., Rodrigo, J.J., Reddi, A.H., Ries, M., Pruitt, L., A nanoindentation technique for functional evaluation of cartilage repair tissue, *Journal of Materials Research*, 19(1), 273-281, 2004.

Ebenstein, D.M., Pruitt, L.A., Nanoindentation of biological materials. *Nano Today*, 1(3), 26-33, 2006.

Edouard, P., Rannou, F., Coudeyre, E., Animal evidence for hyaluronic acid efficacy in knee trauma injuries. Review of animal-model studies, *Physical Therapy in Sport*, 14(2), 116-123, 2013.

Esmonde-White K.A., Mandair G.S., Raaii F., Jacobson J.A., Miller B.S., Urquhart A.G., Roessler, B.J., Morris, M.D., Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis, *Journal of Biomedical Optics*, 14(3), 2009.

Fairbank, T.J., Knee joint changes after meniscectomy, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 30B(4), 664-670, 1948.

Fautrel, B., Hilliquin, P., Rozenberg, S., Allaert, F.A., Coste, P., Leclerc, A., Rossignol, M. Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA, *Joint Bone Spine*, 72(3), 235-240, 2005.

Fischenich K, Coatney G, Haverkamp J, Button K, DeCamp C, Haut R, Haut-Donahue, T.L., Evaluation of meniscal mechanics and proteoglycan content in a modified anterior cruciate ligament transection model, *Journal of Biomechanical Engineering*, 136(7), 1-8, 2014.

Fischenich, K.M., Button, K.D., Coatney, G.A., Fajardo, R.S., Leikert, K.M., Haut, R.C., Haut Donahue, T.L., Chronic Changes in the articular cartilage and meniscus following traumatic impact to the lapine knee. *Journal of Biomechanics*, 48, 246–253, 2015a.

Fischenich, K.M., Lewis J., Kindsfater K.A., Bailey T.S., Haut Donahue T.L., Effects of degeneration on the compressive and tensile properties of human meniscus. *Journal of Biomechanics*, 48(8), 1407-1411, 2015b.

Fischenich, K.M., Button, K.D., DeCamp, C., Haut, R.C., Haut Donahue, T.L., Comparison of Two Models of Post-Traumatic Osteoarthritis; Temporal Degradation of Articular Cartilage and Menisci, *Journal of Orthopaedic Research*, 2016.

Fox, A.J.S., Bedi, A., Rodeo, S.A., The basic science of human knee menisci: Structure, composition, and function, *Sports Health*, 4(4), 340-351, 2012.

Fox, A.J.S., Wanivenhaus, F., Burge, A.J., Warren, R.F., Rodeo, S.A., The human meniscus: A review of anatomy, function, injury, and advances in treatment, *Clinical Anatomy*, 28, 269-287, 2015.

Freutel, M., Galbusera, F., Ignatius, A., Durselen, L. Material properties of individual menisci and their attachments obtained through inverse FE-analysis, *Journal of Biomechanics*, 48(8), 1343-1349, 2015.

Fukuda, Y., Takai, S., Yoshino, N., Murase, K., Tsutsumi, S., Ikeuchi, K., Hirasawa, Y., Impact load transmission of the knee joint-influence of leg alignment and the role of meniscus and articular cartilage, *Clinical Biomechanics*, 15(7), 516-521, 2000.

Fukubayashi, T., Kurosawa, H., The contact area and pressure distribution pattern of the knee: A study of normal and osteoarthritis knee joints, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 51, 871-879, 1980.

Gabrion, A., Aïmedieu, P., Laya, Z., Havet, E., Mertl, P., Grebe, R., Laude, M., Relationship between ultrastructure and biomechanical properties of the knee meniscus, *Surgical and Radiologic Anatomy*, 27, 507-510, 2005.

Ghadially, F.N., Thomas, I., Yong, N., Lalonde, J.-M.A., Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages, *Journal of anatomy*, 125(3), 499-517, 1978.

Ghadially, F.N., Lalonde, J.-M.A., Wedge, J.H., Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint, *Journal of Anatomy*, 136(4), 773-791, 1983.

Goldblatt, J.P., Richmond, J.C., Anatomy and biomechanics of the knee, *Operative Techniques in sports Medicine*, 11(3), 172-186, 2003.

- Goertzen D., Budney D., Cinats J., Methodology and apparatus to determine material properties of the knee joint meniscus, *Medical Engineering & Physics*, 19(5), 412-419, 1997.
- Goppert-Mayer, M., Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen, *Annalen der Physik*, 401(3), 273-294, 1931.
- Gregory, M.H., Capito, N., Kuroki, K., Stoker, A.M., Cook, J.L., Sherman, S.L., A review of translational animal models for knee osteoarthritis, *Arthritis*, 2012.
- Greis, P.E., Bardana, D.D., Holmstrom, M.C., Burks, R.T., Meniscal injury: I. Basic science and evaluation, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 10(3), 168-176, 2002.
- Grosjean, F., Dommergues, J.Y, *La statistique en clair*, Ellipse, 2011.
- Gu, K.B., Li, L.P., A human knee joint model considering fluid pressure and fiber orientation in cartilages and menisci, *Medical Engineering & Physics*, 33(4), 497-503, 2011.
- Guess, T.M., Thiagarajan, G., Kia, M., Mishra, M., A subject specific multibody model of the knee with menisci, *Medical Engineering & Physics*, 32(5), 505-515, 2010.
- Haemer, J.M., Carter, D.R., Giori, N.J., The low permeability of healthy meniscus and labrum limit articular cartilage consolidation and maintain fluid load support in the knee and hip, *Journal of Biomechanics*, 45, 1450-1456, 2012.
- Haq, I., Murphy, E., Dacre, J., Osteoarthritis, *Postgraduate Medical Journal*, 79, 377-383, 2003.
- Han, S.-K., Seerattan, R., Herzog, W., Mechanical loading of in situ chondrocytes in lapine retropatellar cartilage after anterior cruciate ligament transection, *Journal of the Royal Society Interface*, 7, 895-903, 2009.
- Hao, Z., Jin, D., Zhang, Y., Zhang, J., A Finite Element 3D Model of in Vivo Human Knee Joint Based on MRI for the Tibiofemoral Joint Contact Analysis, *Digital Human Modeling*, 4561, 616-622, 2007.
- Hauch, K.N., Oyen, M.L., Odegard, G.M., Haut Donahue, T.L., Nanoindentation of the insertional zones of human meniscal attachments into underlying bone, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2(4), 339-347, 2009.
- Haut-Donahue, T.L., Hull, M.L., Rashid, M.M., Jacobs, C.R., A finite element model of the human knee joint for the study of tibio-femoral contact, *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(3), 273-280, 2002.
- Haut-Donahue, T.L., Hull, M.L., Rashid, M.M., Jacobs, C.R., How the stiffness of meniscal attachments and meniscal material properties affect tibio-femoral contact pressure computed

using a validated finite element model of the human knee joint, *Journal of Biomechanics*, 36(1), 19-34, 2003.

Hellio Le Graverand, M.-P., Vignon, E., Otterness, I.G., Hart, D.A., Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: part I: cellular and matrix alterations, *Osteoarthritis Cartilage*, 9, 56-64, 2001a.

Hellio Le Graverand, M.-P., Vignon, E., Otterness, I.G., Hart, D.A., Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development Part II: Molecular alterations, *Osteoarthritis Cartilage*, 9, 65-72, 2001b.

Hellio Le Graverand, M.-P., Ou, Y., Schield-Yee, T., Barclay, L., Hart, D., Natsume, T., Rattner, J.B., The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture, *Journal of Anatomy*, 198, 525-535, 2001c.

Hemplfing, H., Intra-articular hyaluronic acid after knee arthroscopy: a two-year study, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 15(5), 537-546, 2007.

Herwig, J., Egner, E., Buddecke, E., Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 43, 635-640, 1984.

Holzappel, G.A., Ogden, R.W., Constitutive modelling of arteries, *Proceedings of the Royal Society*, 2010.

Hope, N., Ghosh, P., Taylor, T.K.F., Sun, D., Read, R., Effects of intraarticular hyaluronan on matrix changes induced in the lateral meniscus by total medial meniscectomy and exercise, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 22(6), 43-51, 1993.

Hu, K., Radhakrishnan, P., Patel, R.V., Mao, J.J., Regional structural and viscoelastic properties of fibrocartilage upon dynamic nanoindentation of the articular condyle, *Journal of Structural Biology*, 136(1), 46-52, 2001.

Huang, G., Lu, H., Measurement of Young's relaxation modulus using nanoindentation, *Mechanics of Time-Dependent Materials*, 10, 229-243, 2006.

Hunter, D.J., Felson, D.T., Osteoarthritis, *BMJ*, 332(7542), 639-642, 2006a.

Hunter, D.J., Zhang, Y.Q., Niu, J.B., Tu, X., Amin, S., Clancy, M. et al. The association of meniscal pathologic changes with cartilage loss in symptomatic knee osteoarthritis, *Arthritis and Rheumatism*. 54, 795-801, 2006b.

Ihn, J.C., Kim, S.J., Park, I.H., In vitro study of contact area and pressure distribution in the human knee after partial and total meniscectomy, *International Orthopaedics*, 17, 214-218, 1993.

Iijima, H., Aoyama, T., Ito, A., Tajino, J., Nagai, M., Zhang, X., Yamaguchi, S., Akiyama, H., Kuroki, H., Destabilization of the medial meniscus leads to subchondral bone defects and

- site-specific cartilage degeneration in an experimental rat model, *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, 1036-1043, 2014.
- Kambic, H.E., McDevitt, C.A., Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus, *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 145-149, 2005.
- Kapadia, R.D., Badger, A.M., Levin, J.M., Bhattacharyya, A., Dodds, R.A., Coatney, R.W., Lark, M.W., Meniscal ossification in spontaneous osteoarthritis in the guinea-pig, *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(5), 374-377, 2000.
- Kasemi, M., Li, L.P., A viscoelastic poromechanical model of the knee joint in large compression, *Medical Engineering & Physics*, 36, 998-1006, 2014.
- Katsamenis, O.L., Karoutsos, V., Kontostanos, K., Panagiotopoulos, E.C., Papadaki, H., Bouropoulos, N., Microstructural characterization of CPPD and hydroxyapatite crystal depositions on human menisci, *Crystal Research and Technology*, 47(11): 1201-1209, 2012.
- Katsuragawa, Y., Saitoh, K., Tanaka, N., Wake, M., Ikeda, Y., Furukawa, H., Tohma, S., Sawabe, M., Ishiyama, M., Yagishita, S., Suzuki, R., Mitomi, H., Fukui, N., Changes of human menisci in osteoarthritic knee joints, *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, 1133-1143, 2010.
- Kavanagh, E., Ashhurst, D.E., Distribution of biglycan and decorin in collateral and cruciate ligaments and menisci of the rabbit knee joint, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(7), 877-885, 2001.
- Kawamura, S., Lotito, K., Rodeo, S.A., Biomechanics and healing response of the meniscus, *Operative Techniques in Sports Medicine*, 11(2), 68-76, 2003.
- Kellgren, J.H., Lawrence, J.S., Radiological assessment of osteo-arthrosis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 16, 494-502, 1957.
- Killian, M.L., Lepinski, N.M., Haut, R.C., Haut Donahue, T.L., Regional and zonal histomorphological characteristics of the lapine menisci, *The Anatomical Record*, 293, 1991-2000, 2010a.
- Killian, M.L., Isaac, D.I., Haut, R.C., Déjardin, L.M., Leetun, D., Haut Donahue, T.L., Traumatic anterior cruciate ligament tear and its implications on meniscal degradation : A preliminary novel lapine osteoarthritis model, *Journal of Surgical Research*, 164, 234-241, 2010b.
- Kutzner, I., Heinlein, B., Graichen, F., Bender, A., Rohlmann, A., Halder, A., Beier, A., Bergmann, G., Loading of the knee joint during activities of daily living measured in vivo in five subjects, *Journal of Biomechanics*, 43, 2164-2173, 2010.

Kuyinu, E.L., Narayanan, G., Nair, L.S., Laurencin C.T., Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 11-19, 2006.

Kuzuhara, A, Analysis of structural changes in bleached keratin fibers (black and white human hair) using Raman spectroscopy, *Biopolymers*, 81(16): 506-514, 2006.

Kwok, J., Grogan, S., Meckes, B., Arce, F., Lal, R., D'Lima, D., Atomic force microscopy reveals age-dependent changes in nanomechanical properties of the extracellular matrix of native human menisci: Implications for joint degeneration and osteoarthritis, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(8), 1777-85, 2014.

Kwok, J., Onuma, H., Olmer, M., Lotz, M.K., Grogan, S.P., D'Lima, D.D., Histopathological analyses of murine menisci: implications for joint aging and osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 24, 709-718, 2016.

Lakes, E.H., Kline, C.L., McFetridge, P.S., Allen, K.D., Comparing the mechanical properties of the porcine knee meniscus when hydrated in saline versus synovial fluid, *Journal of Biomechanics*, 48, 4333-4338, 2015.

Lampropoulou-Adamidou, K., Lelovas, P., Karadimas, E.V., Liakou, C., Triantafillopoulos, I.K., Dontas, I., Papaioannou, N.A., Useful animal models for the research of osteoarthritis, *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 24(3), 263-271, 2014.

Lange, A.K., Singh, M.A.F., Smith, R.M., Foroughi N., Baker, M.K., Shnier, R., Vanwanseele, B., Degenerative meniscus tears and mobility impairment in women with knee osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, 701-708, 2007.

Laverty, S. Girard, C.A., Williams, J.M., Hunziker, E.B., Pritzker, K.P.H., The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit, *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, S53-S65, 2010.

Le Pen, C., Reygrobelle, C., Gérentes, I., Les conséquences socioéconomiques de l'arthrose en France. Etude COART France, *Revue du Rhumatisme*, 72, 1326-1330, 2005.

Lechner, K., Hull, M.L., Howell, S.M., Is the circumferential tensile modulus within a human medial meniscus affected by test sample location and cross-sectional area? *Journal of Orthopaedic Research*, 18, 945-951, 2000.

Lee, E.H., Radok, J.R.M., The contact problem for viscoelastic bodies, *Journal of Applied Mechanics* 27(3), 438-444, 1960.

LeRoux, M.A., Setton, L.A., Experimental and biphasic FEM determinations of the material properties and hydraulic permeability of the meniscus in tension, *Journal of Biomechanical Engineering*, 124, 2002.

Leslie, B.W., Gardner, D.L., McGeough, J.A., Moran, R.S., Anisotropic response of the human knee joint meniscus to unconfined compression, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*, 214 Part H, 631-635, 2000.

Levillain A., Boulocher, C., Kaderli, S., Viguier, E., Hannouche, D., Hoc, T., Magoaric, H., Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 23, 1186-1193, 2015.

Levillain, A., Magoaric, H., Boulocher, C., Decambon, A., Viateau, V., Hoc, T., Viscoelastic properties of rabbit osteoarthritic menisci: A correlation with matrix alterations, en revision dans *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.

Li, X., An, Y.H., Wu, Y.-D., Song, Y.C., Chao, Y.J., Chien, C.-H., Microindentation test for assessing the mechanical properties of cartilaginous tissue, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 80(1), 25-31, 2006.

Li, Q., Doyran, B., Gamer, L.W., Lu, X.L., Qin, L., Ortiz, C., Grodzinsky, A.J., Rosen, V., Han, L., Biomechanical Properties of murine meniscus surface via AFM-based nanoindentation, *Journal of Biomechanics*, 48(8), 1364-1370, 2015.

Light, L.H., McLellan, G.E., Klenerman, L., Skeletal transients on heel strike in normal walking with different footwear, *Journal of Biomechanics*, 13(6), 477-480, 1980.

Link, T.M., Steinbach, L.S., Ghosh, S., Ries, M., Lu, Y., Lane, N., Majumdar, S., Osteoarthritis: MR imaging findings in different stages of disease and correlation with clinical findings, *Radiology*, 226(2), 373-381, 2003.

Lohmander, S., Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease, *Baillière's Clinical Rheumatology*, 2(1), 37-62, 1988.

López-Franco, M., López-Franco, O., Murciano-Anton, M.A., Cafiamero-Vaquero, M., Herrero-Beaumont, G., Fernandez-Acenero, M.J., Gomez-Barrena, E., An experimental study of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in the rabbit menisci, *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 131, 1167-1176, 2011.

Lu, X.L., Mow, V.C., Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties, *Medicine and Science in Sport and Exercise*, 40(2), 193-199, 2008.

Madry, H., Luyten, F.P., Facchini, A., Biological aspects of early osteoarthritis, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 20, 407-422, 2012.

Mäkelä, J., Rezaeian, Z., Mikkonen, S., Madden, R., Han S.-K., Jurvelin, J., Herzog, W., Korhonen, R.K., Site-dependent changes in structure and function of lapine articular cartilage 4 weeks after anterior cruciate ligament transection, *Osteoarthritis Cartilage*, 22, 869-878, 2014.

Makris, E.A., Hadidi, P., Athanasiou, K.A., The knee meniscus: Structure, function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration, *Biomaterials*, 32, 7411-7431, 2011.

Mansour J.M., Biomechanics of cartilage. In: *Kinesiology: the Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 66–79, 2003.

McArthur, B.A., Dy, C.J., Fabricant, P.D., Della Valle, A.G., Long term safety, efficacy, and patient acceptability of hyaluronic acid injection in patients with painful osteoarthritis of the knee, *Patient Preference and Adherence*, 6, 905-910, 2012.

McDermott, I.D., Sharifi, F., Bull, A.M., Gupte, C.M., Thomas, R.W., Amis, A.A., An anatomical study of meniscal allograft sizing, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 12(2), 130-135, 2004.

McDermott, I.D., Amis, A.A., The consequences of meniscectomy, *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 88-B, 1549-1556, 2006.

McDermott, I.D., Masouros, S.D., Amis, A.A., Biomechanics of the menisci of the knee, *Current Orthopaedics*, 22, 193-201, 2008.

Meakin, J.R., Shrive, N.G., Frank, C.B., Hart, D.A., Finite element analysis of the meniscus: the influence of geometry and material properties on its behavior, *The Knee*, 10, 33-41, 2003.

Medical Advisory Secretariat. Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee: an evidence-based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 5(12), 2005.

Melrose, J., Smith, S., Cake, M., Read, R., Withelock, J., Comparative spatial and temporal localisation of perlecan, aggrecan and type I, II and IV collagen in the ovine meniscus: an ageing study, *Histochemistry and Cell Biology*, 124(3-4), 225-235, 2005.

Messier, S.P., Loeser, R.F., Miller, G.D., Morgan, T.M., Rejeski, W.J., Sevick, M.A., Ettinger, W.H., Pahor, M., Williamson, J.D., Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial, *Arthritis and Rheumatism*, 50(5), 1501-1510, 2004.

Messner, K., Gao, J., The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics and a rationale for clinical treatment, *Journal of Anatomy*, 193, 161-178, 1998.

Meyer, G.A., Lieber, R.L, Elucidation of extracellular matrix mechanics from muscle fibers and fiber bundles, *Journal of Biomechanics*, 44, 771-773, 2011.

Migliore, A., Giovannangeli, F., Granata, M., Laganà, B., Hylan G-F 20: Review of its Safety and Efficacy in the Management of Joint Pain in Osteoarthritis, *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 3, 55-68, 2010.

Mine, T., Ihara, K., Kawamura, H., Date, R., Umehara, K., Collagen expression in various degenerative meniscal changes: an immunohistological study, *Journal of Orthopaedic Surgery*, 21(2), 216-220, 2013.

Moreland, L.W., Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action, *Arthritis Research and therapy*, 5(2), 54-67, 2003.

Morris, M. D., Mandair, G. S., Raman assessment of bone quality, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(8): 2160-2169, 2011.

Morrison, J.B., The mechanics of the knee joint in relation to normal walking, *Journal of Biomechanics*, 3, 51-61, 1970.

Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U., Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Review*, 42(5), 493-541, 2007.

Moyer, J.T., Abraham, A.C., Haut Donahue, T.L., Nanoindentation of human meniscal surfaces, *Journal of Biomechanics*, 45, 2230-2235, 2012.

Moyer, J.T., Priest, R., Bouman, T., Abraham, A.C., Haut Donahue, T.L., Indentation properties and glycosaminoglycan content of human menisci in the deep zone. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6624-6629, 2013.

Mündermann, A., Dyrby, C.O., D'Lima, D.D., Colwell, C.W., Andriacchi, T.P., In vivo knee loading characteristics during activities of daily living as measured by an instrumented total knee replacement, *Journal of Orthopaedic Research*, 26(9), 1167-1172, 2008.

Nakano, T., Dodd, C.M., Scott, P.G., Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus, *Journal of Orthopaedic Research*, 15, 213-220, 1997.

National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research, <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>.

Nikon, https://www.nikoninstruments.com/fr_FR/Apprendre-et-Decouvrir/Techniques/Microscopie-multiphoton.

Nisbet, H.O., Ozak, A., Yardimci, C., Nisbet, C., Yarim, M., Bayrak, I. Sirin, Y.S., Evaluation of bee venom and hyaluronic acid in the intra-articular treatment of osteoarthritis in an experimental rabbit model, *Research in Veterinary Science*, 93(1), 488-493, 2010.

Oliver, W., Pharr, G., An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load displacement sensing indentation experiments, *Journal of Materials Research*, 7(6), 1564-1583, 1992.

OMS, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr81/fr/>.

- Oprenyeszk, F., Sanchez, C., Dubuc, J.-E., Maquet, V., Henrist, C., Compère, P., Henrotin, Y., Chitosan enriched three-dimensional matrix reduces inflammatory and catabolic mediators production by human chondrocytes, *Plos One*, 10(5), 2015.
- Oyen, M.L., *Nanoindentation of Biological and Biomimetic Materials, Experimental Techniques*, 37, 73-87, 2011.
- Pailler-Mattei, C., Laquière, L., Debret, R., Tupin, S., Aimond, G., Sommer, P., Zahouani, H., Rheological behaviour of reconstructed skin, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 37, 251-263, 2014.
- Papalia, R., Del Buono, A., Osti, L., Denaro, V., Maffulli, N., Meniscectomy as a risk factor for knee osteoarthritis: a systematic review, *British Medical Bulletin*, 99, 89-106, 2011.
- Pauli, C., Grogan, S., Patil, S., Otsuki, S., Hasegawa, A., Koziol, J., Lotz, M.K., D'Lima, D.D., Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 19, 1132-1141, 2011.
- Peloquin, J.M., Santare, M.H., Elliott, D.M., Advances in quantification of meniscus tensile mechanics including nonlinearity, yield, and failure, *Journal of Biomechanical Engineering*, 138(2), 2016.
- Pena, E., Calvo, B., Martinez, M.A., Doblaré, M., A three-dimensional finite element analysis of the combined behavior of ligaments and menisci in the healthy human knee joint, *Journal of Biomechanics*, 39, 1686-1701, 2006.
- Pennock, A.T., Robertson, C.M., Emmerson, B.C., Harwood, F.L., Amiel, D., Role of apoptotic and matrix-degrading genes in articular cartilage and meniscus of mature and aged rabbits during development of osteoarthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 56(5), 1529-1536, 2007.
- Pereira, H., Caridade, S.G., Frias, A.M., Silva-Correia, J., Pereira, D.R., Cengiz, I.F., Mano, J.F., Oliveira, J.M., Espregueira-Mendes, J., Reis, R.L., Biomechanical and cellular segmental characterization of human meniscus: building the basis for Tissue Engineering therapies, *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, 1271-1281, 2014.
- Petersen, W., Tillmann, B., Age-related blood and lymph supply of the knee menisci: A cadaver study, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 66(4), 308-312, 1995.
- Petersen, W., Tillmann, B., Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci, *Anatomy and embryology*, 197, 317-324, 1998.
- Proctor, C.S., Schmidt, M.B., Whipple, R.R., Kelly, M.A., Mow, V.C., Material properties of the normal medial bovine meniscus, *Journal of Orthopaedic Research*, 7, 771-782, 1989.
- Proffen, B.L., McElfresh, M., Fleming, B.C., Murray, M.M., A comparative anatomical study of the human knee and six animal species, *The Knee*, 19, 493-499, 2012.

Rasband W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

Rattner, J.B., Matyas, J.R., Barclay, L., Holowaychuk, S., Sciore, P., Lo, I.K.Y., Shrive, N.G., Frank, C.B., Achari, Y., Hart, D.A., New understanding of the complex structure of knee menisci: Implications for injury risk and repair potential for athletes, *Scandinave Journal of Medicine and Science in Sports*, 21, 543-553, 2011.

Sanchez-Adams, J., Willard, V.P., Athanasiou, K. A., Regional variation in the mechanical role of knee meniscus glycosaminoglycans, *Journal of Applied Physiology*, 111, 1590-1596, 2011.

Sanchez-Adams, J., Wilusz, R.E., Guilak, F., Atomic force microscopy reveals regional variations in the micromechanical properties of the pericellular and extracellular matrices of the meniscus, *Journal of Orthopaedic Research*, 31(8), 1218-1225, 2013.

Sandmann, G.H, Adamczyk, C., Garcia, G., Doebele, S., Buettner, A., Milz, S., Imhoff, A.B., Vogt, S., Burgkart, R., Tischer, T., Biomechanical comparison of menisci from different species and artificial constructs, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14(324), 2013.

Schumacher, B.L., Schmidt, T.A., Voegtline, M.S., Chen, A.C., Sah, R.L., Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus, *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 562-568, 2005.

Scott, P.G., Nakano, T., Dodd, C.M., Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336, 254-262, 1997.

Seedhom, B.B., Hargreaves, D.J., Transmission of the load in the knee joint with special reference to the role of the menisci. Part II: experimental results, discussion and conclusions, *Engineering in Medicine*, 8(4), 220-228, 1979.

Seitz, A.M., Galbusera, F., Kraus, C., Ignatius, A., Dürselen, L., Stress-relaxation response of human menisci under confined compression conditions, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 26, 68-80, 2013.

Skaggs, D.L., Warden, W.H., Mow, V.C., Radial Tie Fibers Influence the Tensile Properties of the Bovine Medial Meniscus, *Journal of Orthopaedic Research*, 12, 176-185, 1994.

Smith, G.N., Mickler, E.A., Albrecht, M.E., Myers, S.L., Brandt, K.D., Severity of medial meniscus damage in the canine knee after anterior cruciate ligament transection, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 321-326, 2002.

SFR, http://www.rhumatologie.asso.fr/04-Rhumatismes/grandes-maladies/0B-dossier-arthrose/A0_definition.asp.

Son, M., Goodman, S., Chen, W., Hargreaves, B., Gold, G., Levenston, M., Regional variation in T1 r and T2 times in osteoarthritic human menisci: correlation with mechanical properties and matrix composition, *Osteoarthritis and Cartilage*, 21, 796-805, 2013.

Sonoda, M., Harwood, F.L., Amiel, M.E., Moriya, H., Amiel, D., The effects of hyaluronan on the meniscus in the anterior cruciate ligament-deficient knee, *Journal of orthopaedic science*, 5, 157-164, 2000.

Strauss, E.J., Hart, J.A., Miller, M.D., Altman, R.D., Rosen, J.E., Hyaluronic acid viscosupplementation and osteoarthritis: current uses and future directions, *The American Journal of Sports Medicine*, 37(8), 1636-1644, 2009.

Suh, J.-K., Spilker, R.L., Indentation analysis of biphasic articular cartilage: nonlinear phenomena under finite deformation, *Journal of Biomechanical Engineering*, 116, 1994.

Sun, Y., Mauerhan, D.R., Honeycutt, P.R., Kneisl, J.S., Norton, H.J., Zinchenko, N. Calcium deposition in osteoarthritic meniscus and meniscal cell culture, *Arthritis Research & Therapy*, 12(56), 2010.

Sun, Y., Mauerhan, D.R., Kneisl, J.S., Norton, H.J., Zinchenko, N., Ingram, J., Hanley, E.N., Gruber, H.E., Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci, *The Open Rheumatology Journal*, 6, 24-32, 2012.

Sweigart, M.A., Athanasiou, K.A., Toward tissue engineering of the knee meniscus, *Tissue Engineering*, 7(2), 111-119, 2001.

Sweigart, M.A., Characterization of the meniscus for future tissue engineering efforts, *Thèse de doctorat*, 2004a.

Sweigart, M.A., Zhu, C.F., Burt, D.M., Deholl, P.D., Agrawal, C.M., Clanton, T.O., Athanasiou, K.A., Intraspecies and interspecies comparison of the compressive properties of the medial meniscus, *Annals of Biomedical Engineering*, 32(11), 1569-1579, 2004b.

Takahashi, K., Hashimoto, S., Kubo, T., Hirasawa, Y., Lotz, M., Amiel, D., Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model, *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 500-503, 2001.

Takahashi, Y., Sugano, N., Takao, M., Sakai, T., Nishii, T., Pezzotti, G., Raman spectroscopy investigation of load-assisted microstructural alterations in human knee cartilage: Preliminary study into diagnostic potential for osteoarthritis, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 31, 77-85, 2014.

Thomas, K.S., Muir, K.R., Doherty, M., Jones, A.C., O'Reilly, S.C., Bassey, E.J., Home based exercise programme for knee pain and knee osteoarthritis: randomised controlled trial, *BMJ*, 5235(7367), 752, 2002.

Tissakht, M., Ahmed, A.M., Tensile stress-strain characteristics of the human meniscal material, *Journal of Biomechanics*, 28, 411-422, 1995.

Tucker, B., Khan, W., Al-Rashin, M., Al-Khateeb, H., Tissue engineering for the meniscus: A review of the literature, *The Open Orthopaedics Journal*, 6(Suppl 2 : M13), 348-351, 2012.

Turunen, S., Han, S.-K., Herzog, W., Korhonen, R., Cell deformation behavior in mechanically loaded rabbit articular cartilage 4 weeks after anterior cruciate ligament transection, *Osteoarthritis and Cartilage*, 21, 505-513, 2013.

Uthman, I., Raynaud, J.-P., Haraoui, B. Intra-articular therapy in osteoarthritis, *Postgraduate Medical Journal*, 79(934), 449-453, 2003.

Van der Bracht, H., Verdonk, R., Verbruggen, G., Elewaut, D., Verdonk, P., Cell-based meniscus tissue engineering, *Topics in Tissue Engineering*, Ed. N Ashammakhi, R Reis, & E Chiellini. Vol. 3. Biomaterials and Tissue Engineering Group (BTE), 2007.

Vanderploeg, E.J., Wilson, C.G., Imler, S.M., Ling, C.H.-Y., Levenston, M.E., Regional variations in the distribution and colocalization of extracellular matrix proteins in the juvenile bovine meniscus, *Journal of Anatomy*, 221, 174-186, 2012.

Verdonk, P.C., Forsyth, R.G., Wang, J., Almqvist, K.F., Verdonk, R., Veys, E.M., Verbruggen, G., Characterisation of human knee meniscus cell phenotype, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(7), 548-560, 2005.

Vignon, E., Bejui, J., Mathieu, P., Hartmann, J., Ville, G., Evreux, J. Descotes, J., Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis, *The Journal of Rheumatology*, 14, 104-106, 1987.

Voloshin, A.S., Wosk, J., Shock absorption of meniscectomized and painful knees: A comparative in vivo study, *Journal of Biomedical Engineering*, 5, 157-161, 1983.

Walker, P.S., Arno, S., Bell, C., Salvadore, G., Borukhov, I., Oh, C., Function of the medial meniscus in force transmission and stability, *Journal of Biomechanics*, 48, 1383-1388, 2015.

Walker, P.S., Erkman, M.J., The role of the menisci in force transmission across the knee, *Clinical orthopaedics and related research*, 109, 184-192, 1975.

Walker-Bone, K, Javaid, K., Arden, N., Cooper, C., Medical management of osteoarthritis, *BMJ*, 321, 936-940, 2000.

Watterson, J.R., Esdaile, J.M., Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee, *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 8(5), 277-284, 2000.

Wenger, M.P.E., Bozec, L., Horton, M.A., Mesquida, P., Mechanical Properties of Collagen Fibrils, *Biophysical Journal*, 93, 1255-1263, 2007.

Wheatley, B.B., Fischenich, K.M., Button, K.D., Haut, R.C., Haut-Donahue, T.L., An optimized transversely isotropic, Hyper-poro-viscoelastic finite element model of the meniscus to evaluate mechanical degradation following traumatic loading, *Journal of Biomechanics*, 48(8), 1454-1460, 2015.

Williams, J.M., Zhang, J., Kang, H., Ummadi, V., Homandberg, G.A., The effects of hyaluronic acid on fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis in skeletally mature rabbits, *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(1), 44-49, 2003.

Yoshioka, M., Coutts, R., Amiel, D., Hacker, S., Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee, *Osteoarthritis and Cartilage*, 4, 87-98, 1996.

Zarins, Z., Bolbos, R., Pialat, J., Link, T., Li, X., Souza, R., Majumdar, S., Cartilage and meniscus assessment using T1rho and T2 measurements in healthy subjects and patients with osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, 1408-1416, 2010.

Zhang, W., Moskowitz, R.W., Nuki, G., Abramson, S., Altman, R.D., Arden, N., Bierma-Zeinstra, S., Brandt, K.D., Croft, P., Doherty, M., Dougados, M., Hochberg, M., Hunter, D.J., Kwoh, K., Lohmander, L.S., Tugwell, P., OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence, *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(9), 981-1000, 2007.

Zhou, Q., Wei, B., Liu, S., Mao, F., Zhang, X., Hu, J., Zhou, J., Yao, Q., Xu, Y., Wang, L., Cartilage matrix changes in contralateral mobile knees in a rabbit model of osteoarthritis induced by immobilization, *Musculoskeletal Disorders*, 16(224), 2015.

Résumé

L'arthrose du genou est une maladie rhumatismale dégénérative touchant tous les tissus de l'articulation. Elle est classée parmi les dix affections les plus invalidantes dans le monde et l'absence de traitement curatif efficace en fait un véritable problème de santé publique. Dans le cas d'arthrose post-traumatique, les lésions méniscales sont fréquentes et entravent leurs fonctions de répartition des efforts, d'absorption des chocs et de stabilité. Les objectifs de ce travail de thèse sont (1) d'analyser les changements de propriétés mécaniques des ménisques à un stade précoce de développement de l'arthrose et de les corrélés avec les modifications morphologiques, biochimiques et microstructurales, et (2) d'évaluer l'effet d'une thérapie de viscosupplémentation commerciale. Le modèle d'arthrose post-traumatique choisi dans cette étude est la rupture du ligament croisé antérieur chez le lapin. Les ménisques de lapins sains, arthrosiques non traités et arthrosiques traités ont été caractérisés six semaines après l'opération par un score macroscopique, puis par indentation – relaxation grâce au développement d'une méthode de test adaptée, ainsi que par microspectroscopie Raman, microscopie confocale biphotonique et histologie. Cette étude a révélé la formation de lésions à la surface des ménisques arthrosiques et une diminution de leurs propriétés viscoélastiques, s'expliquant par une désorganisation de leurs fibres de collagène et une diminution de leur quantité de glycosaminoglycanes. Bien que le traitement améliore significativement l'état de surface des ménisques et joue un rôle dans la régulation des glycosaminoglycanes, il a peu d'effet sur l'organisation des fibres de collagène et sur les propriétés viscoélastiques. Ce travail de thèse apporte une meilleure compréhension des modifications affectant le ménisque, dans l'optique de développer de nouveaux traitements.

Mots clés : arthrose, ménisque, viscoélasticité, collagène, glycosaminoglycanes, viscosupplémentation

Abstract

Knee osteoarthritis (OA) is a rheumatic degenerative disease affecting all tissues of the joint. It is classified among the ten most disabling affections in the world and the lack of efficient curative treatment makes it a real public health issue. In case of post-traumatic OA, meniscal tears are frequent and interfere with their functions of load distribution, shock absorption and stability. The aims of this work are (1) to analyze the changes of mechanical properties of the menisci at an early stage of OA development and to correlate them with morphological, biochemical and microstructural modifications, and (2) to assess the effect of a commercial viscosupplementation therapy. For this study, an anterior cruciate ligament transection model of post-traumatic OA was used in rabbits. Menisci from healthy, non-treated OA and treated OA rabbits were characterized six weeks after surgery through macroscopic grading, indentation-relaxation with the development of an adapted test method, Raman microspectroscopy, biphotonic confocal microscopy and histology. This study revealed the formation of tears at the surface of OA menisci and a decrease in their viscoelastic properties, which was explained by a disorganization of their collagen fibers and a decrease in their glycosaminoglycan content. Although the treatment significantly improves the surface integrity of the menisci and plays a role in the glycosaminoglycan regulation, it has little effect on the organization of their collagen fibers and on their viscoelastic properties. This work brings a better understanding of the disease processes affecting the meniscus, for the purposes of developing new treatments.

Key words: osteoarthritis, meniscus, viscoelasticity, collagen, glycosaminoglycans, viscosupplementation