



ÉCOLE
CENTRALE LYON

N° d'ordre NNT : 2017LYSEC46

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
Opérée au sein de l'Ecole Centrale de Lyon**

Ecole Doctorale N°162

Mécanique - Energétique - Génie civil - Acoustique

Spécialité de doctorat : Biomécanique

Soutenue publiquement le 23 Novembre 2017 par :

Catherine BOSSER

**Biomarqueurs de l'arthrose : Analyse tribologique et
microspectroscopie Raman du liquide synovial**

Devant le jury composé de :

Pr. Stéphanie BRIANCON

Pr. Patrick CHABRAND

Pr. Yves HENROTIN

Dr. Laurent GRANGE

Dr. Caroline BOULOCHER

Dr. Cécile NOUGUIER-LEHON

Université de Lyon

Université d'Aix-Marseille

Université de Liège

CHU Grenoble Alpes

VetAgro Sup

Ecole Centrale de Lyon

Rapporteuse

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Co-encadrante

Table des matières

Table des matières	3
INTRODUCTION GENERALE	13
Chapitre 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
Introduction du chapitre	17
1. L'articulation synoviale saine.....	18
1.1 Le liquide synovial sain.....	18
1.1.1 Le LS, un ultrafiltrat du plasma sanguin	19
1.1.2 Le LS, nutrition et lubrification	19
1.2 Membrane synoviale.....	22
1.2.1 Structure et composition	22
1.2.2 Fonction barrière.....	23
1.2.3 Capsule articulaire	25
1.3 Cartilage articulaire	26
1.3.1 Structure du cartilage articulaire	26
1.3.2 Composition du cartilage	27
1.3.3 Fonctions et propriétés du cartilage.....	31
1.4 Os sous-chondral	31
1.5 Particularités du genou.....	32
1.5.1 Ménisques.....	33
1.5.2 Ligaments croisés	38
2. L'arthrose et dégradations articulaires associées	41
2.1 L'arthrose	41
2.1.1 Facteurs de risque	41
2.1.2 Impacts socioéconomiques	43
2.1.3 Physiopathologie et phénotypes de l'arthrose.....	44
2.1.4 Traitements de l'arthrose	46
2.2 Processus anaboliques et cataboliques	50
2.2.1 Rôle des cytokines, protéases et leurs inhibiteurs	50
2.2.2 Le cercle vicieux catabolique de l'arthrose.....	51
2.2.3 Le liquide synovial arthrosique.....	55
2.3 Moyens diagnostiques actuels et biomarqueurs potentiels	56
2.3.1 Moyens diagnostiques.....	56
2.3.2 Analyses de routine du LS pathologique.....	59
2.3.3 Biomarqueurs	60
3. Techniques expérimentales	64
3.1 Modèles d'arthrose	64
3.1.1 Les modèles animaux.....	65
3.1.2 Les techniques d'induction de l'arthrose.....	66
3.1.3 Aspects éthiques.....	67

3.1.4 Variabilités inter-espèces du LS	68
3.2 Dépôt de gouttes (Drop Deposition).....	70
3.3 La spectroscopie Raman.....	74
3.3.1 Principe de la diffusion Raman.....	74
3.3.2 Les modes vibrationnels des molécules	76
3.3.3 Cas des protéines	77
3.3.4 Drop Deposition Raman Spectroscopy (DDRS)	79
Conclusion du chapitre	80
Chapitre 2 PROTOCOLE DE CARACTERISATION DU LIQUIDE SYNOVIAL	83
Introduction du chapitre	83
1. Protocole expérimental	84
1.1 Le prélèvement de LS	84
1.2 Dépôt de goutte.....	85
1.3 Analyses tribologiques.....	86
1.3.1 Imagerie optique pour caractérisation bidimensionnelle (2D)	86
1.3.2 Interférométrie à lumière blanche pour la caractérisation du profil tridimensionnel (3D)	87
1.4 DDRS	89
1.4.1 Acquisitions spectrales	89
1.4.2 Assignements des bandes Raman	91
1.4.3 Cas des glycosaminoglycanes	93
2. Protocole de traitement des données	96
2.1 Analyses spectrales	96
2.2 Analyse statistique des données	101
2.2.1 Analyses uni-variées.....	101
2.2.2 Analyses multi-variées (chimométrie)	101
Conclusion du chapitre	104
Chapitre 3 MODELE SPONTANE CANIN	105
Introduction du chapitre	105
1. Matériel et méthodes.....	106
1.1 Les échantillons de LS	106
1.1.1 Les chiens sains	106
1.1.2 Les chiens arthrosiques	107
1.2 Les techniques expérimentales.....	107
2. Résultats.....	107
2.1 Analyse tribologique des gouttes.....	107
2.2 Analyse physico-chimique	110
2.2.1 Répétabilité des mesures.....	110
2.2.2 Reproductibilité du modèle sain	111
2.2.3 Discrimination sain <i>versus</i> OA	112
2.3 Bilan physico-tribologique.....	116
3. Discussion.....	118

Conclusion du chapitre	122
Chapitre 4 CORRELATIONS ENTRE LES PROPRIETES DU LS ET LES PROPRIETES VISCOELASTIQUES DES TISSUS ARTICULAIRES SUR MODELE D'ARTHROSE INDUITE LAGOMORPHE	125
Introduction du chapitre	125
Partie A : Modèle animal et suivi macroscopique de la progression de l'arthrose	127
A1. Modèle animal	127
A1.1 Induction de l'arthrose	127
A1.2 Traitement par viscosupplémentation	128
A2. Matériel et méthodes	129
A2.1 Procédure chirurgicale	129
A2.2 Collecte des échantillons	131
A2.3 Evaluation macroscopique	132
A2.4 Analyses statistiques	133
A3. Résultats	133
A3.1 Prélèvement de LS	133
A3.2 Scores macroscopiques	133
A4. Discussion	136
Partie B : Evolution des propriétés viscoélastiques des tissus articulaires OA	140
B1. Les propriétés viscoélastiques	140
B2. Matériel et méthodes	142
B2.1 Préparation des échantillons	142
B2.1.1 Les ménisques	143
B2.1.2 Les cartilages articulaires	143
B2.2 Tests d'indentation-relaxation	144
B2.2.1 Les ménisques	145
B2.2.2 Les cartilages articulaires	145
B2.3 Modèle viscoélastique	145
B2.4 Analyses statistiques	146
B3. Résultats	147
B3.1 Propriétés viscoélastiques des ménisques	147
B3.1.1 Effet de l'évolution de la pathologie	147
B3.1.2 Effet de la thérapie par viscosupplémentation	148
B3.1.3 Analyse globale	149
B3.2 Propriétés viscoélastiques des cartilages articulaires	151
B3.2.1 Effet de l'évolution de la pathologie	152
B3.2.2 Effet de la thérapie par viscosupplémentation	153
B3.2.3 Analyse globale	154
B4. Discussion	155
Partie C : Les propriétés physico-tribologiques du LS	164
C1. Analyse tribologique des gouttes séchées de LS	165

C1.1 Effet de la thérapie par viscosupplémentation	166
C1.2 Effet du stade d'avancement de l'OA	166
C2. Analyse physico-chimique des gouttes séchées de LS	168
C2.1 Répétabilité des mesures	168
C2.2 Analyse des différents groupes	168
C2.3 Effet du stade d'avancement de l'OA	170
C3. Bilan physico-tribologique	172
C4. Discussion	175
Conclusion du chapitre	180
Chapitre 5 TRANSLATION CLINIQUE A L'HOMME	181
Introduction du chapitre	181
1. Matériel et méthodes	181
1.1 Les échantillons	181
1.2 Les techniques expérimentales	182
2. Résultats	183
2.1 Analyse tribologique des gouttes	183
2.2 Analyse physico-chimique	184
2.2.1 Répétabilité des mesures	184
2.2.2 Spectres classés par scores radiographiques	184
2.3 Phénotypage de l'arthrose	185
2.4 Analyse physico-tribologique par phénotypes	187
2.5 Lien avec le degré d'inflammation	192
3. Discussion	193
Conclusion du chapitre	196
Chapitre 6 BILAN INTER-ESPECES : PROPOSITION DE BIOMARQUEURS DE L'ARTHROSE ...	197
Introduction du chapitre	197
1. Biomarqueurs tribologiques	197
2. Biomarqueurs physico-chimiques	199
Conclusion du chapitre	204
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	205
Conclusion générale	205
Perspectives	207
ANNEXE 1 Images 2D des gouttes séchées de chiens	210
ANNEXE 2 Images 3D des gouttes séchées de chiens	212
ANNEXE 3 Images 2D des gouttes séchées de lapins	214
ANNEXE 4 Images 3D des gouttes séchées de lapins	216
ANNEXE 5 Photos des échantillons de LS de patients	218
ANNEXE 6 Images 2D des gouttes séchées de patients	219
ANNEXE 7 Images 3D des gouttes séchées de patients	221

Bibliographie	223
Liste des figures.....	237
Liste des tableaux.....	241
Résumé	244
Abstract	244

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier en premier lieu l'ensemble de mon jury de thèse pour avoir examiné avec rigueur mes travaux de thèse et pour avoir accepté de participer à la soutenance. Merci au Pr Yves HENROTIN de l'Université de Liège pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci au Pr Stéphanie BRIANCON de l'Université de Lyon et au Pr Patrick CHABRAND de l'Université d'Aix Marseille pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Merci au Dr Laurent GRANGE de l'hôpital Grenoble Alpes qui, en tant qu'examinateur, a apporté un point de vue clinique à la soutenance. Je tiens aussi à remercier sincèrement Caroline BOULOCHER et Cécile NOUGUIER-LEHON, pour l'encadrement qu'elles m'ont accordé tout au long de ce travail.

Je remercie Cécile pour s'être investie dans un sujet qui lui était pourtant finalement presque inconnu. Merci d'avoir cherché à comprendre les problématiques et les résultats, et de m'avoir conseillé pour qu'ils soient intelligiblement expliqués, merci pour sa réactivité dans les nombreuses relectures du manuscrit, et pour m'avoir aidé à être toujours plus méticuleuse dans le manuscrit comme dans la soutenance. Merci aussi pour m'avoir guidé dans certains méandres doctoraux et administratifs.

En 2013, quand j'ai rencontré Caroline, venue pour la première fois faire des essais de spectroscopie Raman sur du liquide synovial, j'étais loin d'imaginer que 4 ans plus tard je serais en train de finaliser un manuscrit de thèse sur le sujet. Alors Caroline, un grand merci pour m'avoir fait redécouvrir les gouttes de café sous un nouveau jour ! Merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à toutes mes questions les plus bêtes ou les plus naïves, allant de la chimie organique à l'anatomie du genou, merci pour tous ses conseils pertinents et le recul qu'elle a su prendre pour m'aider à exploiter et comprendre les résultats, merci pour sa relecture très attentive du manuscrit, merci pour m'avoir fait découvrir l'histologie (euh en fait ça non) et merci pour sa bonne humeur à toute épreuve.

Merci à tous ceux qui m'ont encouragé, de près comme de loin et qui m'ont accompagné dans ce périple doctoral. Je remercie ainsi l'ensemble des membres du G8, anciens ou actuels, même s'ils n'ont fait qu'un court passage, ils ont tous contribué à rendre cette équipe formidable grâce à qui tous les jours c'est un plaisir de venir travailler : Agathe (la joie de vivre montée sur ressort), Laurianne (une scientifique sportive à moins que ce ne soit l'inverse), Kélig (au moins aussi bretonne que moi), Hélène

(experte en prénom masculin se terminant en in), Romain (un esprit sain dans un corps sain), Thomas (un gourmand adepte de Matlab), Emna (toujours gentille et souriante), Witold (un G8 à mi-temps), Lucile, Camille, Caroline, Eric, Francesco, Nathanaël, Féda, Noëlie, Noémie, Adi, Duc, James, Jessica. Merci également à Mehdi (grand amateur de café matinal) et Audrey (l'enthousiasme à l'état pur), les G8 de cœur qui ont beaucoup apporté au laboratoire. Un merci particulier à Ophélie (qui s'est elle aussi lancée plus tardivement que d'autre dans l'aventure doctorale) et Benoît (le grand organisateur du G8), qui en plus de contribuer à la bonne ambiance de l'équipe, sont aussi mes collègues sur la plateforme IVTV. Et pour finir, merci à mes co-bureaux Magali (qui écoute de la bonne musique), Aurélie (bien que je ne sois convertie ni à la coinche ni au roller) et dorénavant Sarah (si jeune et pourtant déjà si plein de sagesse) avec qui, dans une ambiance certes studieuse, nous pouvons discuter de tout et n'importe quoi.

Je voudrais également remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé en dehors du laboratoire : le personnel de l'école Vetagro Sup pour les formations en biostatistique et l'histologie, le Dr Adeline DECAMBRON et le Dr Morad BENSIDHOUM du B2OA pour les manips lapin à Maisons-Alfort, et enfin le Pr Cem GABAY, le Dr Anne LUBBEKE-WOLFF et Céline LAMACCHIA de l'hôpital Universitaire de Genève pour avoir mis à notre disposition des échantillons de patients humains.

Je tiens aussi à remercier Isabelle TIXIER, indispensable à toutes démarches administratives, pour sa sympathie et son efficacité. Merci également à Béatrice CHERVET toujours disponible. Merci à toutes les deux d'être venue m'encourager le jour de la soutenance.

Évidemment, un merci spécial à Thierry, mon mari avant tout, sans qui je n'en serais jamais arrivé là ! Il m'a offert l'opportunité de découvrir le monde de la recherche après quinze années passées dans l'industrie automobile. Il a doucement distillé en moi l'idée de faire une thèse. C'est grâce à lui que j'ai pu mener à bien cette parenthèse scientifique, humaine et personnelle, par son aide scientifique, sa remise en question permanente, et sa faculté de voir plus loin, aussi bien que par son appui logistique et familial. Merci enfin à mes enfants d'avoir eu la patience et l'indulgence de me supporter pendant cette période un peu particulière.

Je suis néanmoins contente que cette parenthèse soit close, pour pouvoir mieux continuer à travailler sur ce projet qui offre de nombreuses perspectives

INTRODUCTION GENERALE

L'arthrose est la plus commune des maladies articulaires dans le monde. Elle induit des charges physiques, psychologiques, sociétales et économiques majeures. En France, l'arthrose symptomatique touche 17% de la population soit 10 à 12 millions de personnes et représente un coût important pour les finances publiques estimé à plus de 3,6 milliards d'euros en 2010 (Grange, 2016). Seconde cause d'invalidité en France, elle constitue le premier motif de consultation médicale après les maladies cardio-vasculaires. En 2005, une étude a mis en évidence que 80% des patients arthrosiques sont limités dans leurs activités quotidiennes (s'habiller, se déplacer, faire ses courses ou des activités ménagères) (Fautrel et al., 2005). Pourtant, cette maladie reste mal considérée et, perçue comme une fatalité, ne semble plus être prioritaire dans les plans de santé publique (Grange, 2016).

L'arthrose est une maladie articulaire non réversible, un cercle vicieux, qui se caractérise par la dégradation progressive du cartilage articulaire mais également de l'ensemble des tissus de l'articulation et des tissus périarticulaires (Figure 1).

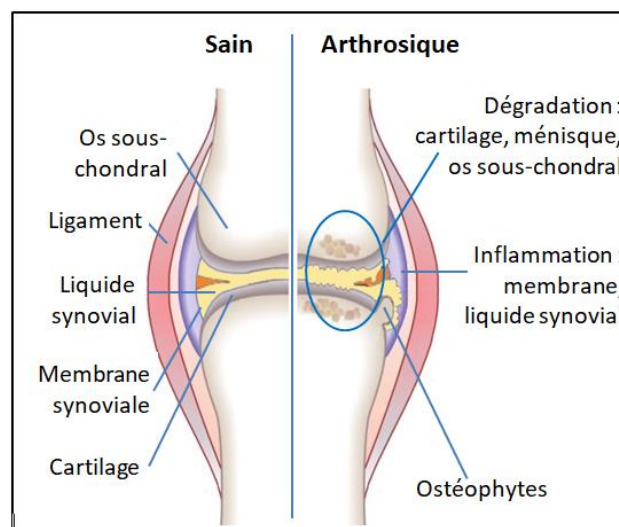


Figure 1 | Illustration des effets de l'arthrose sur l'articulation
Dégradation des cartilage, ménisque et os sous-chondral, avec libération de débris dans le liquide synovial; développement d'excroissances osseuses (ostéophytes); inflammation de la membrane synoviale et du liquide synovial; affaiblissement des ligaments, des muscles et tendons.

Les symptômes cliniques et les techniques d'imagerie constituent les éléments principaux pour le diagnostic et le suivi de l'arthrose aujourd'hui (Litwic et al., 2013a) mais, en dépit de progrès technologiques, restent encore incapables de détecter précocement la maladie et de classer les patients selon le pronostic d'évolution de la maladie.

Actuellement, il n'existe pas de traitement pour guérir l'arthrose, qui est devenue un véritable problème de santé publique. Les traitements proposés aujourd'hui ont pour objectif de réduire la douleur, d'améliorer la qualité de vie ainsi que la mobilité et, si possible, de ralentir ou stabiliser la progression de la maladie (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006; Zhang et al., 2007).

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. Pour cela, ces dernières années, des études se sont orientées vers la recherche de biomarqueurs moléculaires potentiels qui seraient en mesure de détecter l'arthrose précoce et de quantifier l'effet des traitements, sans résultat réel à ce jour, ni consensus des experts. Ce manque de biomarqueurs sensibles, spécifiques et reproductibles limite les progrès dans les traitements et leur utilisation raisonnée.

Le liquide synovial (LS) est le lubrifiant naturel des articulations synoviales. Dans une articulation saine, le liquide synovial du genou assure trois fonctions principales : i) nutrition du cartilage articulaire avasculaire ; ii) lubrification des surfaces articulaires par limitation des frottements et amortissement des chocs ; iii) élimination des déchets métaboliques. Il est au cœur de l'articulation, et à ce titre les lésions des différents tissus articulaires au cours du processus arthrosique sont responsables de ses modifications physico-chimiques qui vont à leur tour se répercuter sur le fonctionnement de l'articulation.

La microspectroscopie Raman est une technique en plein essor dans le milieu de la recherche biomédicale. En effet, cette technique présente l'avantage d'être non destructive et de permettre l'analyse de différentes molécules à partir d'un seul spectre d'acquisition sans recourir à une étape de préparation d'échantillons souvent fastidieuse et source d'artéfacts. Cette technique, qui permet de mieux voir au sein de la matière, fait l'objet d'un grand nombre d'études et est déjà utilisée dans l'industrie pharmaceutique afin de caractériser et de suivre les excipients, les principes actifs et les produits finis. En recherche biomédicale, cette technique a montré sa pertinence pour extraire des biomarqueurs permettant le diagnostic de différentes maladies (ostéogénèse imparfaite, maladie d'Alzheimer, cancers...).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est de proposer une technique mini-invasive, pour l'optimisation de biomarqueurs spécifiques basés sur la caractérisation du LS par approches combinées morphologique, tribologique et physico chimique Raman de l'état arthrosique du liquide synovial pour le diagnostic clinique, le pronostic et le suivi des maladies articulaires des patients.

Ce manuscrit s'articule autour de six chapitres. Le chapitre 1 présente les fonctions et propriétés du liquide synovial ainsi que ses interactions avec les autres tissus articulaires (cartilage articulaire, membrane synoviale, os sous-chondral, ménisque) au sein d'une articulation saine puis détaille le mécanisme de progression de l'arthrose, les dégradations tissulaires associées, les traitements actuellement proposés et les principaux modèles animaux utilisés. Ce chapitre détaille également les techniques expérimentales utilisées dans cette thèse, le dépôt de gouttes, le principe physique de la spectroscopie Raman et l'application sur les gouttes séchées.

Le chapitre 2 explicite les matériels et méthodes d'acquisition, de post-traitement et d'analyses développés pour la caractérisation du liquide synovial, en trois étapes : i) dépôt de gouttes de faible volume de LS sur des lames de verre, ii) analyse tribologique consistant en la mesure de la surface de la goutte séchée par imagerie 2D et du profil périphérique, notamment de la hauteur du bourrelet par interférométrie 3D, iii) analyse physico-chimique par mesure au microscope confocal Raman de la signature spectrale de la périphérie de la goutte séchée. Ce protocole a ensuite été utilisé de manière identique sur les différents modèles d'arthrose détaillés dans les chapitres suivants.

L'arthrose canine est une maladie à progression lente et dégénérative qui est proche de la physiopathogénie de l'arthrose chez l'homme. Le chapitre 3 présente donc les résultats d'une première étude appliquant le protocole de caractérisation de LS de chiens sains et arthrosiques. Cette étude a pour objectif d'identifier les modifications induites par le processus arthrosique pour valider le potentiel de ce protocole à discriminer la pathologie arthrosique par les marqueurs tribologiques et physico-chimiques.

Le chapitre 4 a pour objectifs de vérifier la capacité du protocole à suivre l'évolution de l'arthrose dans le temps. Pour cela, une analyse a été menée pour étudier les changements du liquide synovial engendrés par l'induction chirurgicale d'arthrose et les relier aux modifications des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages. Cette étude se basera sur la comparaison de groupes de

lapins sains, opérés et opérés traités par thérapie intra-articulaire. La première partie présente les dégradations macroscopiques constatées dans les articulations arthrosiques. La deuxième partie concerne la caractérisation des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages sains et arthrosiques. Enfin, la troisième partie, porte sur la caractérisation du liquide synovial selon notre protocole et les corrélations entre les scores macroscopiques, les propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages et les marqueurs tribologiques et physico-chimiques des liquides synoviaux.

Le chapitre 5 est consacré à la translation clinique à l'Homme par la caractérisation de liquides synoviaux de patients arthrosiques à des degrés divers. L'objectif est de vérifier si le protocole de caractérisation du liquide synovial peut permettre le classement des patients arthrosiques dans la perspective d'une médecine personnalisée.

Le chapitre 6 propose une série de biomarqueurs en se basant sur une comparaison inter-espèces des résultats obtenus dans les chapitres 3 à 5. Ces biomarqueurs s'avèrent cohérents avec le processus arthrosique et aptes à séparer les populations d'échantillons.

Une conclusion générale sur ce travail de thèse finalise ce manuscrit et les perspectives qui sont engagées pour de futures études sont présentées.

Chapitre 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction du chapitre

Le liquide synovial (LS) est le lubrifiant naturellement visqueux des articulations synoviales : il limite les frottements et amortit les chocs entre les différentes surfaces articulaires. L'homéostasie est assurée dans les articulations par le maintien d'une composition normale du LS. Dans le cas de pathologie comme l'arthrose ou une blessure traumatique de l'articulation, des changements de composition chimique et de propriétés physiques du LS interviennent en même temps que la dégradation des tissus articulaires.

Ce chapitre bibliographique est composé de deux thématiques distinctes présentant dans un premier temps les articulations synoviales et l'arthrose chez l'Homme puis dans un second temps les techniques expérimentales utilisées dans cette thèse. Le premier chapitre décrit l'articulation synoviale humaine saine en présentant les fonctions et propriétés du liquide synovial ainsi que ses interactions avec les autres tissus articulaires : membrane synoviale, capsule articulaire, cartilage articulaire et os sous-chondral ainsi que les pièces anatomiques spécifiques du genou, à savoir ménisques et ligaments croisés. Le deuxième chapitre détaille le mécanisme de progression de l'arthrose, les dégradations tissulaires associées, les traitements proposés, les moyens diagnostics actuels et les biomarqueurs potentiels. Le troisième chapitre est dédié aux techniques expérimentales utilisées dans ce projet, que ce soit les modèles animaux utilisés pour étudier le processus arthrosique ou les techniques de caractérisation du liquide synovial employées dans ce travail : la théorie du dépôt de gouttes, le principe physique de la spectroscopie Raman et l'application sur les gouttes séchées.

1. L'articulation synoviale saine

Une articulation correspond à la jonction entre deux extrémités osseuses afin de les relier et éventuellement de leur donner une mobilité l'une par rapport à l'autre. L'amplitude de cette mobilité dépend de la forme et de la nature des éléments qui la composent et permet de les classer en trois types : les articulations fixes (au niveau du crâne par exemple), semi-mobiles (entre les vertèbres) ou très mobiles (genou, épaule, ...) (Guay, 2005).

L'articulation synoviale ou diarthrose se caractérise par une grande mobilité, supporte et redistribue les forces de contact articulaire tout en offrant une friction et une usure minimales. A ce titre, elle est considérée comme un système tribologique parfait (Noble et al., 2010). Le LS, cœur de notre étude, remplit la cavité articulaire limitée par la membrane synoviale et le cartilage articulaire (Figure 1.1).

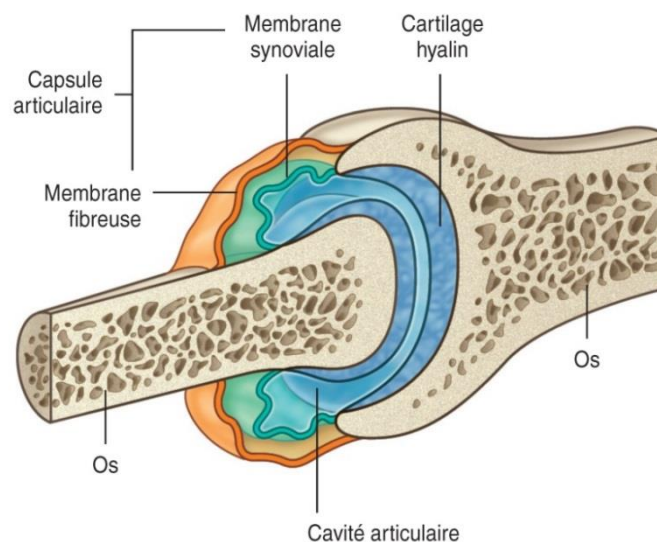


Figure 1.1 | Schéma d'une articulation synoviale saine
(<http://www.blog-elsevier-masson.fr/2016/10/paces-ue-5-organisation-appareils-systemes-systeme-articulaire>)

1.1 Le liquide synovial sain

Le liquide synovial (LS) est le lubrifiant naturel des articulations synoviales. Le LS est un ultrafiltrat du plasma sanguin complété par des macromolécules sécrétées localement. Le LS sain est visqueux, non newtonien et thixotropique : il se comporte comme un matériau visqueux à basse fréquence et comme un matériau élastique à haute fréquence (Hui et al., 2012), dans la plage de fréquence 0,5-0,7 à 2,5-3,0 Hz correspondant au mouvement des articulations pendant la marche et la course, respectivement (Bhuanantanondh et al., 2010; Mazzucco et al., 2002).

1.1.1 Le LS, un ultrafiltrat du plasma sanguin

Le liquide synovial sain est jaune très pâle, visqueux et filant. A l'état normal, produit par la membrane synoviale, il est peu abondant (~0,3-1 ml) (Conrad, 2003), parfaitement clair, sans opacité ni floculation (Noble et al., 2010). Il est en grande partie composé d'eau (environ 85%) (Furey and Burkhardt, 1997). En tant qu'ultrafiltrat du plasma sanguin, la composition chimique du LS ressemble à celle du plasma. Cependant, le LS ne contient pas de fibrinogène, ainsi il ne coagule pas, contrairement au plasma. La teneur totale en protéines du LS est inférieure (~1/3) à celle du plasma en raison de la semi-perméabilité de la membrane synoviale filtrant selon la taille des molécules et permettant ainsi l'entrée dans le LS de protéines de faible poids moléculaire comme l'albumine et la γ -globuline, les principales espèces de protéines dans le LS (Hui et al., 2012).

Les lipides sont également présents en petite quantité dans le LS sain, incluant phospholipides, composante lubrifiante (Schmidt et al., 2007), et cholestérol (0,07-0,08 mg/ml) (Fam et al., 2007). Les niveaux de glucose et d'acide urique sont dans les mêmes proportions que dans le plasma (Brannan and Jerrard, 2006). Le LS contient également des molécules solubles telles que des facteurs de croissance et des cytokines responsables de la communication entre les cellules de l'articulation.

1.1.2 Le LS, nutrition et lubrification

Le LS remplit trois fonctions principales :

- ➔ Liquide nourricier du cartilage articulaire avasculaire
- ➔ Lubrification des surfaces articulaires par limitation des frottements et amortissement des chocs
- ➔ Elimination des déchets métaboliques

Avasculaire, le cartilage articulaire est principalement nourri par le liquide synovial qui lui permet également d'éliminer ses déchets métaboliques (Chevalier and Richette, 2005).

En combinaison avec le cartilage articulaire, le LS fournit à l'articulation synoviale des propriétés lubrifiantes exceptionnelles avec un frottement extrêmement faible, une usure minimale et une capacité de charge excellente (Blewis et al., 2007; Schmidt et al., 2007). Le LS possède une viscosité élevée et des propriétés lubrifiantes spécifiques, dues à des macromolécules sécrétées localement et concentrées dans la cavité synoviale grâce à la semi-perméabilité de la membrane synoviale : la

lubricine, les phospholipides tensio-actifs (SAPL) et l'acide hyaluronique (HA) (Blewis et al., 2007; Brannan and Jerrard, 2006; Fam et al., 2007; Schmidt et al., 2007; Waller et al., 2013).

La lubricine est une glycoprotéine, sécrétée principalement par les chondrocytes de la zone superficielle du cartilage, les synoviocytes et dans une moindre mesure les cellules méniscales dans le genou. Dans les articulations saines, une couche de lubricine recouvre la surface du cartilage et agit comme un lubrifiant antiadhésif pour éviter les dommages au cartilage dus à la rugosité des surfaces cartilagineuses en contact (Blewis et al., 2007; Noble et al., 2010; Waller et al., 2013).

Les SAPL, majoritairement sécrétés par les synoviocytes, s'organisent en multicouches planes, 3 à 7 bicouches lipidiques empilées sur la surface du cartilage ou en vésicules lipidiques, responsable de leurs propriétés lubrifiantes : la réponse frictionnelle est d'autant plus basse que le nombre de bicouches empilées augmentent. Néanmoins, cette organisation est très instable et va dépendre des propriétés physico-chimiques du LS (sels, pH, température, pression hydrostatique...) (Noble et al., 2010).

La viscosité du LS est principalement liée à la concentration et au degré de polymérisation de l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane (GAG) non-sulfaté présent en forte concentration, de 1 à 4 mg/ml (Blewis et al., 2007), sécrété principalement par les synoviocytes, cellules de la membrane synoviale, et conférant au LS sa viscosité si spécifique (Pascual and Jovaní, 2005).

Les GAG sont des chaînes polyosidiques linéaires formées d'unités disaccharidiques (2 sucres ou monomères glucidiques non hydrolysables cyclisés) répétées comprenant toujours i) une hexosamine (glucosamine, galactosamine, ...) ou leurs dérivés N-acétylés ; ii) un acide hexuronique (acide glucuronique, galactose, ...). Il existe quatre types principaux de GAG dans la cavité articulaire :

- ➔ chondroïtine sulfate : CS (hexosamine de base : galactosamine GalN) : la chondroïtine 6-sulfate (C6S) et la chondroïtine 4-sulfate (C4S) se différencient uniquement par la position du groupe ester sulfate sur la galactosamine.
- ➔ kératane sulfate : KS (hexosamine de base : glucosamine GlcN)
- ➔ dermatane sulfate : DS (hexosamine de base : galactosamine GalN)
- ➔ acide hyaluronique : HA (acide D-glucuronique et D-N-acétylglucosamine), non sulfaté

GAG	Poids moléculaire (kDa)	Source principale
Chondroïtine 4-sulfate (C4S)	20-50	Cartilage, ménisque , os, peau, aorte
Chondroïtine 6-sulfate (C6S)	20-50	Cartilage, ménisque , valves cardiaques
Kérotane sulfate (KS)	5-20	Cartilage, ménisque , cornée
Dermatane sulfate (DS)	20-50	Peau, vaisseaux sanguins, ménisque , ligaments
HA	10-50	Liquide synovial , humeur vitrée, cordon ombilical

Tableau 1.1 | Types de GAG et origine
(Chakrabarti and Park, 1980).

Comme détaillé dans les chapitres suivants, les CS, KS et DS entrent dans la composition du cartilage et du ménisque.

L'acide hyaluronique est lui présent dans le LS et le cartilage. Les polymères disaccharides de cette unité récurrente peuvent avoir une taille entre 102 et 104 kDa *in vivo*. L'acide hyaluronique est constituée d'environ 50 000 unités dissacharidiques. La proportion de glucides est de 95 % par rapport aux protéines. La molécule d'acide hyaluronique, très hydrophile, est capable de se lier directement à 4 molécules d'eau par unité disaccharide. La concentration et le poids moléculaire de l'acide hyaluronique confèrent au LS sont état de gel visqueux qui forme un film sur toute la surface interne de l'articulation. Ce revêtement a un rôle de protection viscoélastique sur le cartilage articulaire et la membrane synoviale, notamment vis-à-vis de lésions mécaniques.

L'acide hyaluronique apporte ainsi au LS des propriétés physiques bien particulières donnant à ce liquide un rôle important dans l'amortissement des chocs. Le LS agit comme un fluide visqueux lors de mouvements articulaires à basse fréquence (marche à 0,5-0,7 Hz) tandis qu'il se comporte comme un corps élastique lors de mouvements à haute fréquence (course à 2,5-3 Hz) (Balazs, 1974, 2009; Balazs and Denlinger, 1993; Bhuanantanondh et al., 2010; Mazzucco et al., 2002). De la même façon, le comportement du LS sera distinct selon le type de contraintes, cisaillement ou compression, appliquées (Figure 1.2). Ce comportement contribue à la protection du cartilage et de la membrane synoviale puisque le LS en se déformant élastiquement absorbe les chocs à leur place (Balazs, 1974).

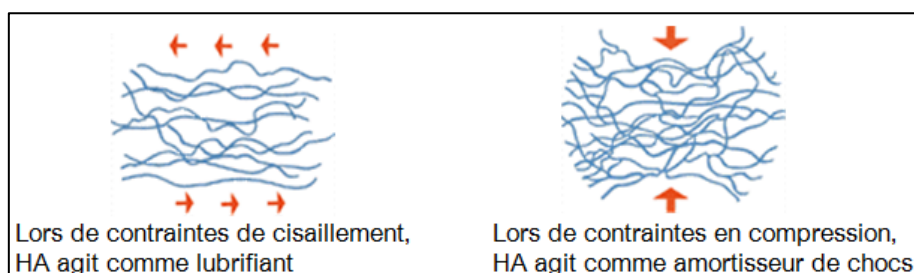


Figure 1.2 | Propriétés physiques de l'acide hyaluronique.

Finalement, la composition du LS sain est résumée dans le Tableau 1.2.

	Concentration	Poids moléculaire
Protéines sériques	10-30 mg/ml	60-90 kDa
Albumine	12 mg/ml	
Globuline ($\beta_1, \gamma, \alpha_1, \alpha_2$)	1-3 mg/ml	
Acide hyaluronique	1-4 mg/ml	6-7 MDa
Lubricine	0,05-0,35 mg/ml	220 kDa
Lipides	3 mg/ml	0.75 kDa
Phospholipides (SAPL)	0.1-0.2 mg/ml	
Cholestérol	0.07-0.08 mg/ml	

Tableau 1.2 | Composition du LS sain
(Blewis et al., 2007; Fam et al., 2007; Hui et al., 2012; Noble et al., 2010).

1.2 Membrane synoviale

1.2.1 Structure et composition

La membrane synoviale délimite la cavité articulaire et est bordée à l'extérieur par la capsule articulaire et les formations ligamentaires extra-capsulaires.

La membrane synoviale est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse constituée d'une couche bordante (intima) en contact avec la cavité articulaire et d'une couche profonde (subintima) (Figure 1.3).

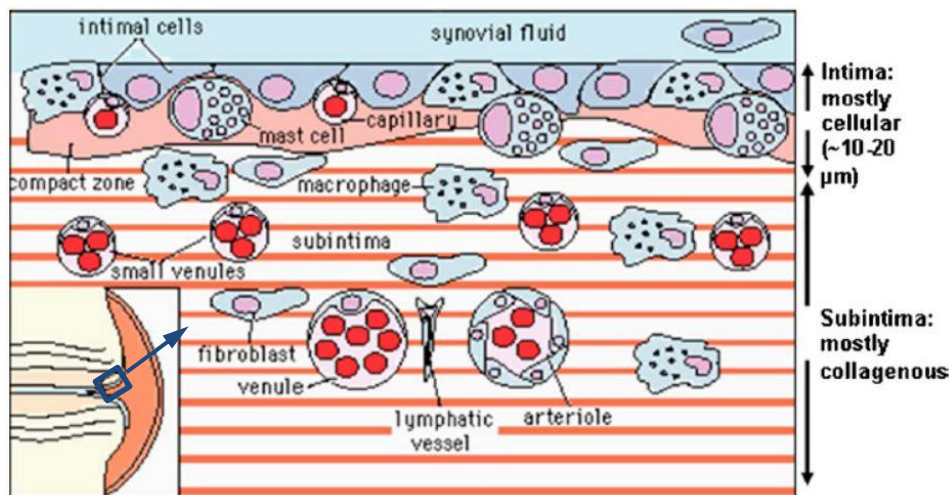


Figure 1.3 | Structure de la membrane synoviale (Tiwari et al., 2010).

L'intima est une fine couche d'épaisseur environ 20-50 μm chez l'humain (Blewis et al., 2007; Smith, 2011; Tiwari et al., 2010), densément peuplée de 1 à 3 couches superposées de cellules non jointives. Les cellules, les synoviocytes, sont de deux types: fibroblastique (type B) et macrophagique (type A). Les synoviocytes de type A, les plus nombreux ont une activité essentiellement phagocytaire et sont responsables de l'élimination des substances indésirables du LS tandis que les synoviocytes de type B

ont un rôle dans l'élaboration du liquide synovial et de l'acide hyaluronique. La subintima est un tissu conjonctif aréolaire et adipeux comprenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, riche en cellules (des fibroblastes pour moitié) dans une matrice extracellulaire (MEC) composée de fibres de collagènes et de glycosaminoglycanes, protéoglycanes et glycoprotéines et pouvant mesurer jusqu'à 5 mm d'épaisseur (Smith, 2011). La membrane synoviale est également fortement innervée, la douleur dans l'articulation prend donc en partie naissance dans ce tissu (Balazs, 2009).

1.2.2 Fonction barrière

Dans tous les tissus vivants, la micro-vascularisation délivre des molécules d'oxygène et des nutriments tout en éliminant simultanément le dioxyde de carbone et les autres déchets métaboliques. Dans le même temps, le contenu cellulaire du sang ainsi que la plupart de ses protéines sont retenus dans le flux de plasma. Ce double rôle est attribué aux "pores" de taille sélective de la paroi endothéliale vasculaire (Simkin and Bassett, 2011).

La membrane synoviale a ainsi une implication particulière dans la régulation de la composition du LS car elle assure un *turnover* permanent du LS (Levick and McDonald, 1995). De par sa composition en fines couches de cellules discontinues, en particulier les cellules de l'intima, elle fonctionne comme une double barrière, en série, formant un filtre dont la perméabilité sélective contrôle les échanges systémiques de molécules entre le sang et la cavité articulaire, sous l'effet des pressions hydrostatiques et osmotiques d'une part, et sous l'effet de barrières capillaires et interstitielles propres à la membrane synoviale d'autre part (Hui et al., 2012) (Figure 1.4).

Pour les petites molécules (l'oxygène, l'eau, l'urée) cet échange est une équilibration complète : les solutés traversent et retraversent librement l'endothélium vasculaire, à des taux inversement proportionnels à leur taille moléculaire. La membrane synoviale n'ayant pas de membrane basale pour entraver le transit moléculaire, le principal déterminant de leur entrée dans l'espace articulaire est leur taux de diffusion à travers la MEC de la membrane synoviale. Cette voie d'entrée étant dépendante des petits pores de l'endothélium capillaire et des espaces interstitiels étroits de la MEC, le transit par diffusion passive ne se produit que pour les petites molécules, généralement de poids moléculaire inférieur à 10 kDa. Ainsi la concentration de ces petites molécules dans le LS est très semblable à celles du plasma (ratio de concentration normal LS: sérum ~1).

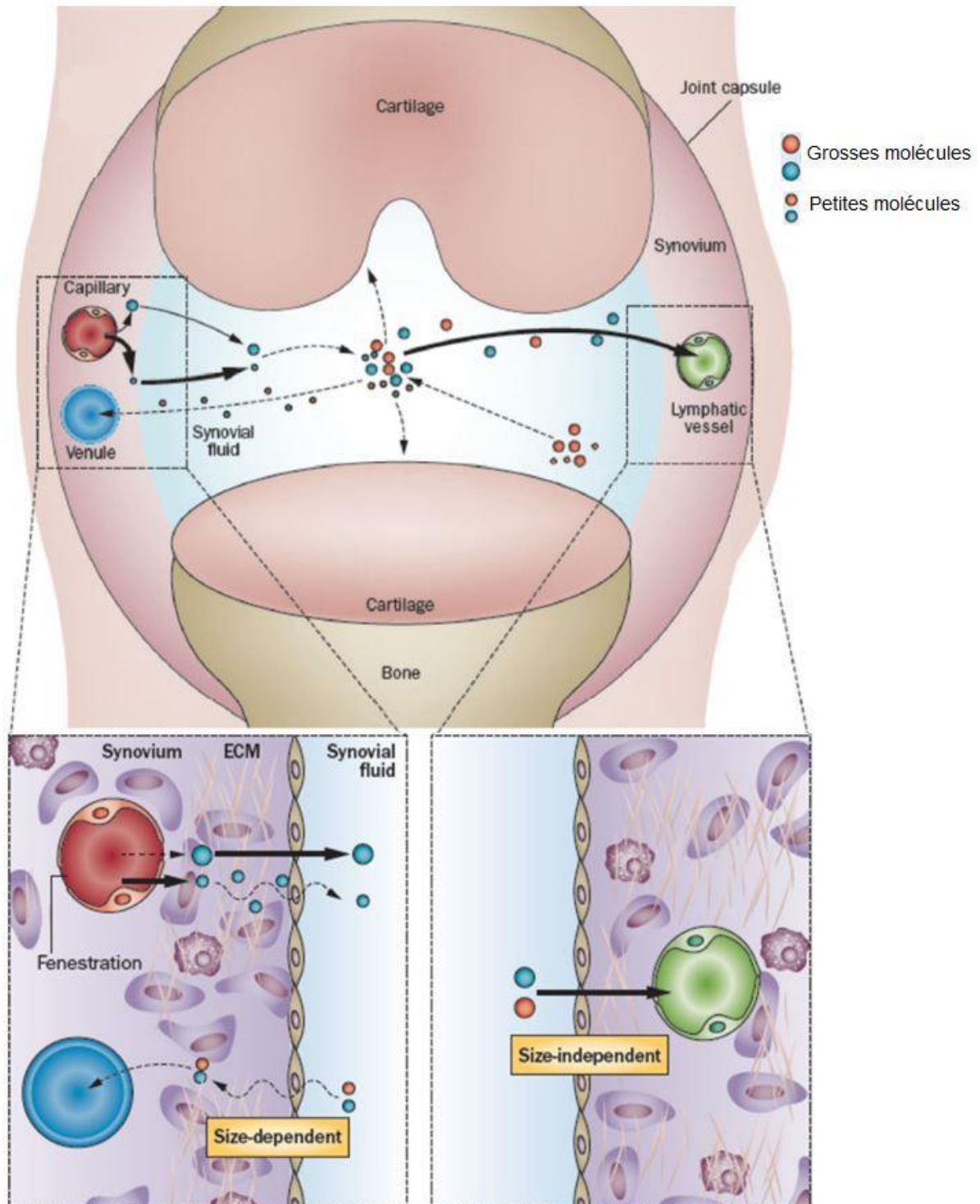


Figure 1.4 | Fonctionnement de la barrière synoviale

Les macromolécules entrent dans la cavité articulaire via les capillaires sanguins de la subintima et sont filtrés par les fenêtres de l'endothélium ; les petites molécules entrent également via les capillaires puis traversent la MEC ; les grosses et petites molécules sortent de la cavité articulaire respectivement via le système lymphatique et les petits vaisseaux sanguins (Evans et al., 2014).

Pour les plus grosses protéines du LS, la barrière endothéliale est beaucoup plus restrictive : l'endothélium est fenestré avec de surcroît des fenêtres orientées en direction de la cavité articulaire, imposant un tamisage taille-dépendant sur le taux de passage là aussi inversement proportionnels à leur taille moléculaire. Par exemple, le ratio de concentration normal LS: sérum pour l'albumine, de

Le poids moléculaire 67 kDa, est de $\sim 0,40$. Pour de plus grosses molécules, comme les macroglobulines, ce ratio peut chuter à 0,03-0,05 (Evans et al., 2014; Levick and McDonald, 1995; Simkin, 2015; Simkin and Bassett, 2011). Dans tous les cas, les molécules grandes (telles que les immunoglobulines de type M) et petites (comme l'albumine) retournent à la circulation par les vaisseaux lymphatiques qui ne font pas de discrimination selon leur taille.

Le flux est encore davantage restrictif que pour les macromolécules d'acide hyaluronique qui agissent comme un « imperméabilisant dynamique ». Lorsque la pression du fluide intra articulaire est élevée, lors d'une flexion de l'articulation par exemple, le LS commence à s'écouler hors de la cavité articulaire à travers les espaces interstitiels de la MEC de la membrane synoviale, mais cela est rapidement contré par la pression osmotique de l'acide hyaluronique, retenue à la surface de la membrane (Figure 1.5). Ce phénomène est physiologiquement important car il conserve un volume minimum de LS lors des phases de pression de fluide intra articulaire soutenue et, en conséquence, réduit le taux de biosynthèse d'acide hyaluronique nécessaire pour remplacer l'acide hyaluronique perdue (Levick and McDonald, 1995; Sabaratnam et al., 2005).

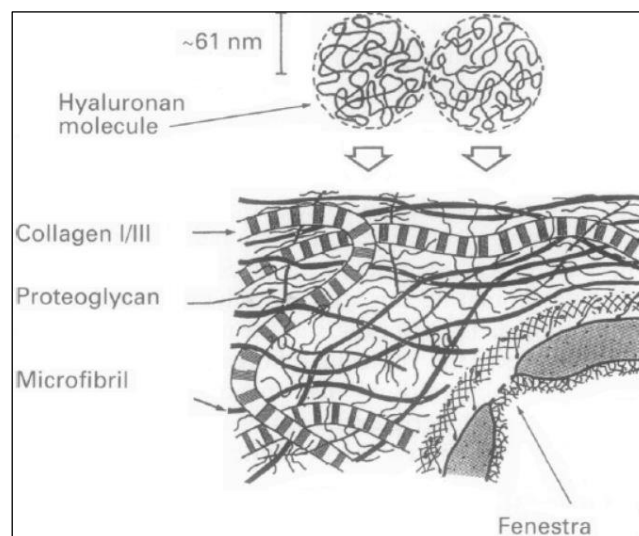


Figure 1.5 | Le phénomène « d'imperméabilisation dynamique »
Les macromolécules d'acide hyaluronique viennent s'accumuler à la surface de la membrane synoviale quand la pression intra articulaire augmente (Levick and McDonald, 1995).

1.2.3 Capsule articulaire

La partie externe de la membrane synoviale se confond avec la capsule articulaire (Sutton et al., 2009), elle-même bordée extérieurement par des ligaments collatéraux. Elle revêt une importance vitale pour la fonction articulaire. Elle est spécialisée pour résister à la compression et fournit une

stabilité passive en limitant les mouvements des articulations, et une stabilité active par ses terminaisons nerveuses proprioceptives. La capsule articulaire consiste en un tissu conjonctif fibreux dense dont la composition est proche de celle des ligaments : la cellularité est faible et elle comprend majoritairement du collagène, en particulier de type I, des protéoglycanes et de l'eau (plus de 70%). Elle est constituée de faisceaux de fibres de collagène dont l'orientation varie selon la localisation dans l'articulation et qui adhèrent fermement avec le périoste au niveau du cercle périchondral, zone de transition entre le périoste et le cartilage articulaire via des sites de fixation spécialisés dont la structure permet une meilleure distribution des forces de traction exercées sur l'insertion de la capsule. Les fibres les plus superficielles sont orientées dans le sens longitudinal et les plus profondes dans le sens transversal. Elle est également traversée de nerfs et de vaisseaux sanguins (Ralphs and Benjamin, 1994).

1.3 Cartilage articulaire

Le cartilage articulaire, de type hyalin, est un tissu conjonctif hautement spécialisé qui recouvre l'extrémité des os, là où les surfaces entrent en contact. Le cartilage sain a un aspect lisse, poli et brillant et son épaisseur oscille entre 2 et 5 mm selon le site articulaire (Sophia Fox et al., 2009). Il ne possède ni innervation ni vascularisation et est nourri par imprégnation essentiellement à partir des éléments nutritifs contenus dans le LS et l'os-sous-chondral pour les couches les plus profondes (Chevalier and Richette, 2005). Il se compose principalement d'une matrice extracellulaire (MEC) dense composée essentiellement d'eau (65-85%), de collagène, majoritairement de type II (15-20%), de protéoglycanes, (3-10%) et de cellules spécialisées, les chondrocytes (4%) (Lohmander, 1988; Oei et al., 2014; Sophia Fox et al., 2009).

1.3.1 Structure du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire se décompose en 5 zones distinctes (Figure 1.6) par leur composition, l'apparence des chondrocytes et l'orientation des fibres de collagènes, de la surface articulaire vers l'os sous-chondral (Chevalier and Richette, 2005; Noble et al., 2010; Sophia Fox et al., 2009) :

- ➔ A la surface, une fine couche protectrice acellulaire et fibreuse (4 à 5 μm), la *lamina splendens*, permet l'accrochage de macromolécules responsables du caractère glissant de la

surface articulaire présentes dans le LS (acide hyaluronique, lubricine, SAPL) (Balazs, 2009; Chevalier and Richette, 2005).

- ➔ La zone superficielle I (10-20% de l'épaisseur du cartilage) contient la densité cellulaire la plus élevée où les chondrocytes ont une forme allongée parallèlement à la surface. Les fibres de collagène sont tangentiels à la surface et confèrent une résistance aux forces de cisaillement.
- ➔ La zone II intermédiaire (40-60% de l'épaisseur du cartilage) contient des protéoglycanes, des fibres de collagène plus épaisses formant un réseau imbriqué (pas d'orientation préférentielle) et les chondrocytes, en densité moindre, sont arrondies. Cette zone concourt à la résistance à la compression.
- ➔ La zone III profonde (30% de l'épaisseur du cartilage) est celle qui offre la plus grande résistance à la compression grâce aux fibres de collagène orientées perpendiculairement à la surface. Cette zone est la plus riche en protéoglycanes et a la plus faible concentration en eau. Les chondrocytes sont disposées en colonies entre les fibres de collagène.
- ➔ La zone IV calcifiée est délimitée par la ligne de démarcation de minéralisation (« tide mark »), limite au-delà de laquelle la pénétration des vaisseaux de l'os sous-chondral n'est pas possible, les fibrilles de collagène toujours perpendiculaires à la surface s'ancrent dans l'os sous-chondral.

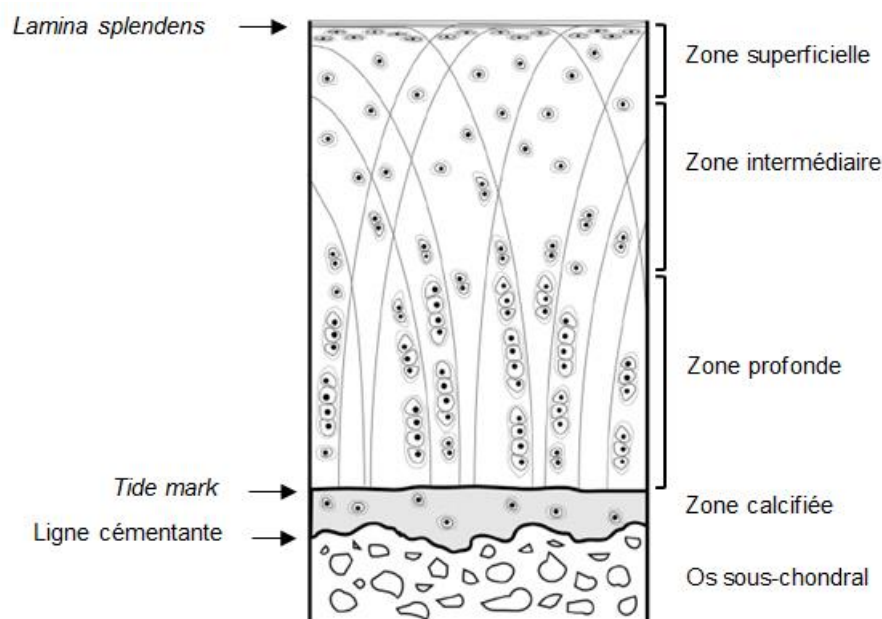


Figure 1.6 | Structure du cartilage, de la surface jusqu'à l'os sous-chondral (Männicke et al., 2014).

1.3.2 Composition du cartilage

Les cartilages hyalins se caractérisent par leur forte teneur en **protéoglycanes** (Roughley, 2006). Les protéoglycanes sont de lourdes protéines constituées d'une longue chaîne protéique de soutien (« *core protein* ») sur laquelle sont fixées perpendiculairement des glycosaminoglycanes (Figure 1.7a).

Un monomère de protéoglycane est ainsi constitué d'une centaine de chaînes de CS du côté carboxyle de la protéine et une trentaine de chaînes de KS du côté N-terminal, attachées de façon covalente perpendiculairement à la chaîne protéique, atteignant ainsi un poids moléculaire compris entre 1 à 3 MDa. Ces monomères de protéoglycane sont eux-mêmes fixés sur les chaînes d'acide hyaluronique de manière stable grâce à des protéines de liaison (« *link protein* ») pour former des agrécans de protéoglycanes. Plus de 300 agrécans peuvent se fixer sur une même molécule d'acide hyaluronique, formant une macromolécule de poids moléculaire compris entre 100 à 200 MDa (Chevalier and Richette, 2005; Lohmander, 1988). La formation d'agrécans limite le mouvement des protéoglycanes dans l'espace inter fibrillaire de la MEC, contribuant à maintenir sa concentration élevée (Lohmander, 1988) et procure au cartilage ses propriétés osmotiques (Sophia Fox et al., 2009) à savoir sa capacité à retenir l'eau : les glycosaminoglycanes étant chargés négativement tendent à se repousser et créent ainsi une pression osmotique positive qui attire l'eau.

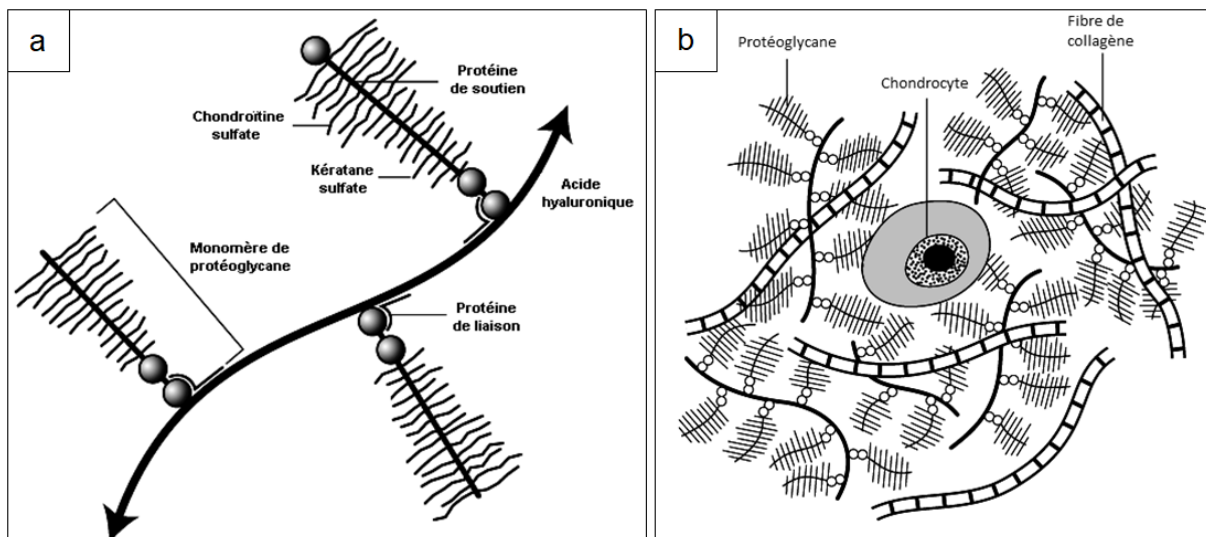


Figure 1.7 | Les agrécans de protéoglycanes
(a) Agrécane de protéoglycanes : sur la protéine de soutien (« *core protein* ») sont fixées des GAG (CS et KS) formant des monomères de PG, eux-mêmes fixés sur des chaînes d'acide hyaluronique via une protéine de liaison (« *link protein* »); (b) Fibres de collagène entremêlées avec de nombreux agrécans de protéoglycanes autour d'un chondrocyte.

Certains protéoglycanes restent à l'état non agrégé et sont de plus faibles poids moléculaires (décorine, biglycane, fibromoduline). Ils représentent 3% des protéoglycanes du cartilage et jouent principalement un rôle dans la fibrillogénèse du collagène.

Les **fibres de collagène**, principalement de type II, varient en diamètre de 20 nm dans la zone superficielle à 70-120 nm dans la zone profonde (Poole et al., 1994). Leur organisation macroscopique en réseau structuré, associée à la structure microscopique en triple hélice des chaînes

polypeptidiques confère à la matrice fibres / agrécanes une résistance mécanique à la déformation (Noble et al., 2010).

Les cellules du cartilage, les **chondrocytes**, mesurant entre 30 et 40 μm de diamètre, sont hautement spécialisées (Chevalier and Richette, 2005) et sont positionnées au sein de la matrice fibres / agrécanes (Figure 1.7b). Dans les zones non calcifiées, elles jouent un rôle fondamental dans le développement, la maintenance et la réparation du cartilage. Leur activité métabolique intense participe à l'homéostasie du cartilage en maintenant un équilibre entre synthèse et dégradation des protéines structurales de la MEC : collagène, protéoglycanes et glycosaminoglycanes (Chevalier and Richette, 2005; Noble et al., 2010; Sophia Fox et al., 2009). Les chondrocytes de la zone calcifiée, hypertrophiés, sont impliqués dans la minéralisation de la MEC en synthétisant du collagène de type X (collagène osseux) (Chevalier and Richette, 2005).

Trois régions distinctes composent la **MEC** (en plus de la structure zonale du cartilage), basées sur la proximité des chondrocytes d'une part et la composition, le diamètre et l'organisation des fibres de collagène d'autre part. La Figure 1.8 représente schématiquement la structure générale du cartilage articulaire, montrant notamment, les zones du cartilage et les régions de la MEC. Ces régions agissent en synergie pour former un système capable de résister à la compression (Chevalier and Richette, 2005; Huber et al., 2000; Sophia Fox et al., 2009) :

- ➔ La région péri-cellulaire : La matrice péri-cellulaire est une couche mince qui entoure le chondrocyte. Elle contient principalement des protéoglycanes, ainsi que de l'acide hyaluronique, des glycoprotéines, du collagène de type VI et des molécules non collagéniques. Le métabolisme des chondrocytes est régulé par les conditions physico-chimiques qui règnent dans cet espace péri-cellulaire. Cette zone, où le pH est plus acide, intègre des récepteurs, comme des intégrines, qui vont lui permettre de jouer un rôle fonctionnel dans la transduction du signal dans le cartilage fonction de la charge à supporter.

Les régions territoriales et interterritoriales, de pH physiologique, sont constituées principalement de collagènes et de protéoglycanes :

- ➔ La région territoriale entoure la matrice péri-cellulaire. Elle est principalement composée de fines fibres de collagène, formant un réseau en forme de panier autour des cellules et d'une forte concentration en protéoglycanes riches en chondroïtine sulfate. Cette région, plus épaisse que la matrice péri-cellulaire, protège les chondrocytes des contraintes mécaniques et

contribue à la résilience de la structure du cartilage articulaire et à sa capacité à supporter des charges importantes.

- La région interterritoriale est la plus grande. Elle se caractérise par des faisceaux de grandes fibres de collagène, disposées parallèlement à la surface dans la zone superficielle, obliquement dans la zone intermédiaire et perpendiculaires à la surface de l'articulation dans la zone profonde et d'une forte concentration en protéoglycanes particulièrement riches en kératane sulfate. Cette région assure l'intégrité du tissu et lui confère ses propriétés biomécaniques.

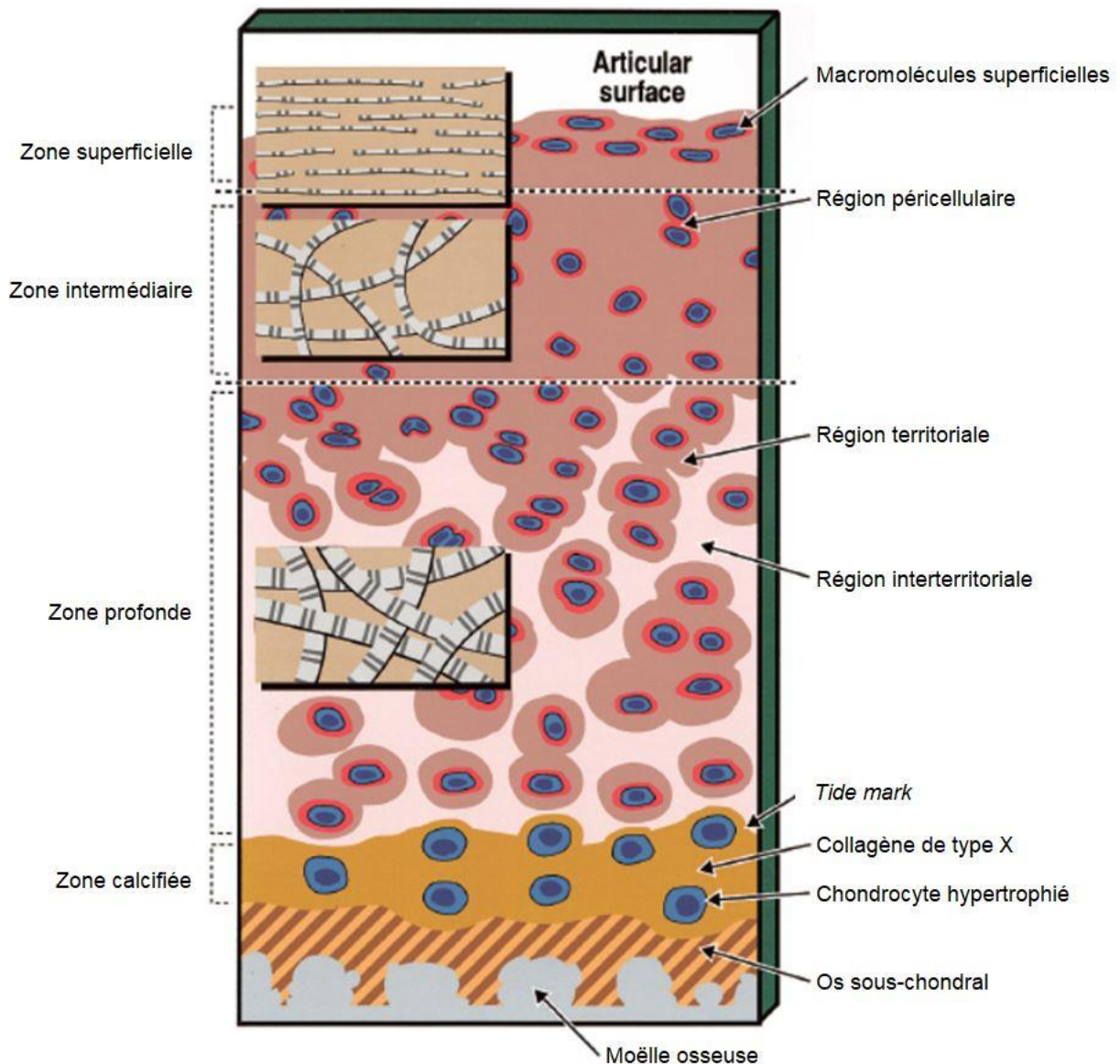


Figure 1.8 | Représentation schématique de la structure générale du cartilage articulaire détaillant les zones du cartilage et les régions de la MEC. Les encarts montrent les diamètres relatifs et les organisations des fibres de collagène dans les différentes zones. Certaines caractéristiques sont également indiquées (Poole et al., 2001).

1.3.3 Fonctions et propriétés du cartilage

Le comportement mécanique global du cartilage articulaire résulte des interactions entre les propriétés physico-chimiques, mécaniques et biologiques de l'ensemble agrécanes, fibres de collagène, cellule, eau. Le cartilage est un matériau résistant et viscoélastique : i) la rigidité est assurée par le réseau structuré des fibres de collagène, ii) l'élasticité est liée à l'hydrophilie des protéoglycanes qui fonctionne comme une éponge au cours des charges mécaniques cycliques. Cet « effet de pompe » entraînant expulsion de l'eau et des déchets et entrée d'eau et des nutriments lors des cycles de mise en contrainte permet par ailleurs la nutrition de la MEC et des chondrocytes participant ainsi à l'homéostasie globale (Chevalier and Richette, 2005). Cependant, les chondrocytes situés dans la zone profonde de la MEC du cartilage ne peuvent être atteints par le LS. Ils sont alors nourris grâce à la vascularisation de l'épiphyse de l'os sous-chondral (Henrotin et al., 2012).

Le renouvellement de la matrice dans un cartilage normal est assuré par le chondrocyte et donc extrêmement lent : demi-vie de 1000 jours pour les protéoglycanes et renouvellement quasi nul pour le collagène de type II.

Par ailleurs, le cartilage permet le glissement des surfaces osseuses grâce à des propriétés lubrifiantes, liées principalement à la lubricine (aussi dénommée *Superficial Zone Protein* SZP) synthétisée par les chondrocytes de la zone superficielle et aux SAPL (Blewis et al., 2007; Waller et al., 2013).

1.4 Os sous-chondral

L'os sous-chondral est la zone de l'épiphyse des os longs se situant immédiatement sous le cartilage calcifié. La ligne séparant ces deux tissus est la ligne cémentante. Il est composé de deux couches minéralisées (collagène de type I) distinctes, séparant le cartilage calcifié de la moelle osseuse :

- ➔ la plaque sous-chondrale, directement en contact avec le cartilage, est constituée d'os cortical non poreux et faiblement vascularisé (Goldring and Goldring, 2010). Des anfractuosités cartilagineuses pénètrent dans la plaque sous-chondrale, assurant un ancrage des fibres de collagène des zones profondes du cartilage dans l'os. Ces interpénétrations permettent une cohésion résistant aux efforts de glissement ou d'arrachement lors des sollicitations mécaniques.

- l'os sous-chondral trabéculaire, situé juste dessous est plus poreux et contient terminaisons nerveuses, vaisseaux sanguins et moelle osseuse.

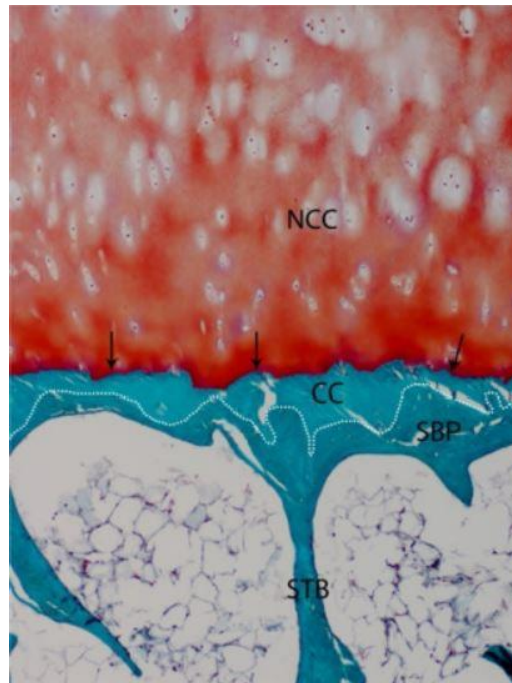


Figure 1.9 | Transition cartilage / os-sous chondral dans une articulation humaine saine. Coupe histologique montrant les différentes zones : NCC zone profonde du cartilage non calcifié ; CC cartilage calcifié ; SBP plaque sous chondrale ; STB os sous-chondral trabéculaire ; les flèches noires désignent la ligne de démarcation (« tide mark ») et les pointillés blancs la ligne cimentante (« cement line ») (Li et al., 2013).

Le remodelage osseux est conditionné par deux types cellulaires : les ostéoblastes qui produisent la matrice osseuse et les ostéoclastes qui sont responsables de la résorption osseuse (Pernelle et al., 2017; Raggatt and Partridge, 2010; Tanaka et al., 2005).

Sa fonction principale est de répartir les contraintes mécaniques et d'absorber les chocs, notamment grâce à la structure trabéculaire (Figure 1.9). Il contribue également à fournir des nutriments au cartilage et à faciliter l'élimination des déchets métaboliques via la vascularisation de la plaque sous-chondrale (Henrotin et al., 2012). L'os sous-chondral joue aussi un rôle dans le maintien de la géométrie articulaire et du jeu de congruence des surfaces articulaires (Castañeda et al., 2012; Goldring and Goldring, 2010; Li et al., 2013; Madry et al., 2010).

1.5 Particularités du genou

Le genou est une articulation complexe liant trois os, le tibia, le fémur et la patella (rotule) par le biais de trois articulations, l'articulation fémoro-patellaire et la double articulation fémoro-tibiale et une seule cavité synoviale. Elle est constituée de pièces complémentaires comme les ménisques et les ligaments

croisés détaillés ci-dessous et de structure anatomique spécifique comme le corps adipeux infrapatellaire (aussi appelé bourse de Hoffa), intracapsulaire mais extra-synovial, qui est une masse graisseuse, comblant l'intervalle entre rotule, condyles et plateaux tibiaux quand le genou est fléchi (Figure 1.10).

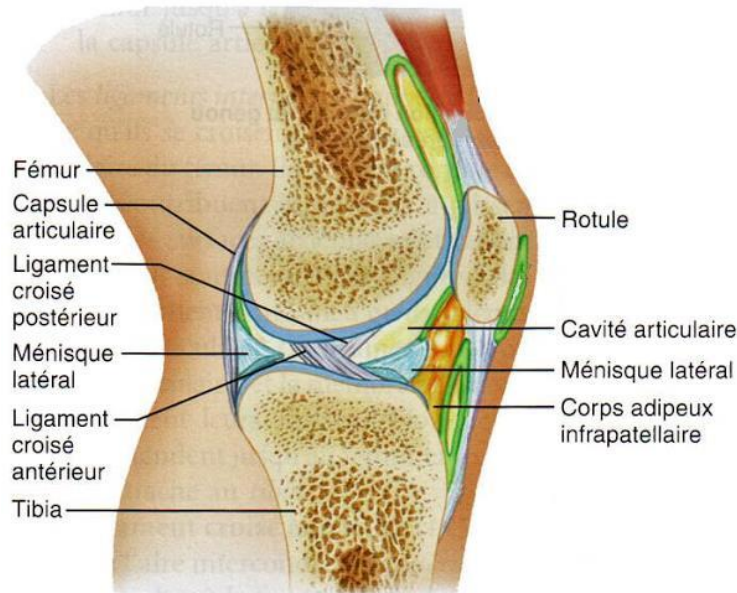


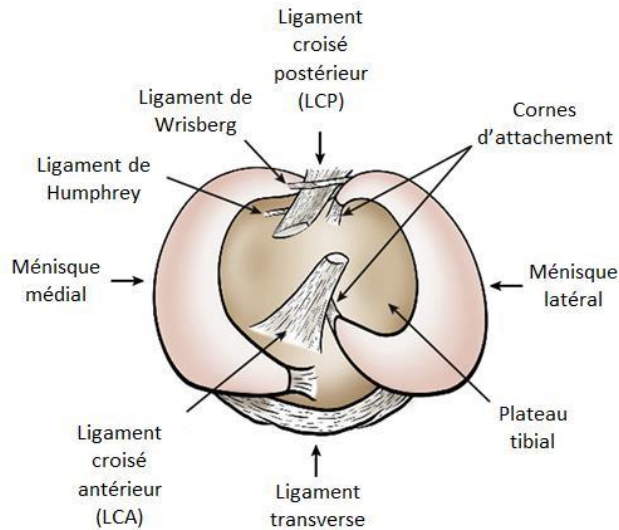
Figure 1.10 | Anatomie du genou
Coupe sagittale du genou droit
(<https://www.mon-arthrose.com/arthrose-du-genou/les-articulations/>)

1.5.1 Ménisques

Les ménisques s'interposent entre les surfaces cartilagineuses. Leur structure, leur composition et leurs fonctions ont été précisément décrits dans les travaux de thèse d'Aurélien Levillain portant sur la caractérisation multi-échelles des ménisques du genou (Levillain, 2016). Ces travaux ont mis en évidence le comportement mécanique complexe des ménisques. Ils sont notamment non linéaire, hétérogène, isotrope transverse et viscoélastique (Levillain et al., 2017a).

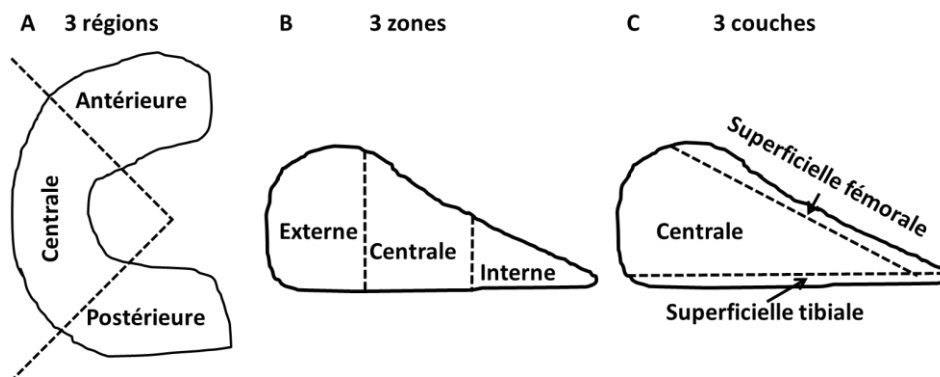
1.5.1.1 Structure et composition

Les ménisques du genou sont deux fibrocartilages en forme de croissant situés entre le tibia et le fémur (Figure 1.10) : le ménisque médial se situe à l'intérieur du genou, tandis que le ménisque latéral se situe à l'extérieur du genou (Figure 1.11). Sains, ils sont blancs, brillants et leur surface est lisse (Makris et al., 2011).



Les ménisques sont des tissus complexes et hétérogènes, puisque leur composition, leur structure, leur innervation et leur vascularisation, dépendent de la localisation décrite de trois façons différentes (Levillain, 2016) :

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



A l'âge adulte, les ménisques contiennent des vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses principalement dans la zone externe. A l'inverse, la zone interne et une partie de la zone centrale ne sont pas vascularisées et très peu innervée, et donc peu aptes à la cicatrisation, ce qui les rend plus exposées à des lésions permanentes post-traumatiques et dégénératives (Levillain, 2016; Makris et al., 2011).

La partie périphérique des ménisques est ainsi nourrie à partir du système vasculaire. La partie interne reçoit plus probablement sa nutrition par diffusion, via la cavité synoviale et comme dans le cartilage, grâce à l' « effet de pompe » lié au mouvement des articulations (Allen et al., 1995).

Le ménisque sain est un tissu très hydraté, constitué chez l'homme de 72% d'eau et de 28% de matière organique, principalement des cellules et la MEC (Herwig et al., 1984; Makris et al., 2011). La MEC est en partie fibrillaire, principalement des fibres de collagène, et en partie non fibrillaire, majoritairement des protéoglycanes selon des proportions qui dépendent des zones : 76% de fibres de collagène et 8% de protéoglycanes dans la zone interne ; 93% de fibres de collagène et 2% de protéoglycanes dans la zone externe (Nakano et al., 1997).

Plusieurs types de **collagènes** sont présents dans le ménisque, mais les types I et II sont prédominants et leurs proportions sont variables selon les localisations : la zone externe est essentiellement composée de collagène de type I, alors que le collagène de type II se trouve préférentiellement dans les zones interne et centrale. Contrairement au cartilage, les fibres de collagène du ménisque forment un réseau très organisé et sont orientées différemment selon les couches (Levillain, 2016; Petersen and Tillmann, 1998) (Figure 1.13) :

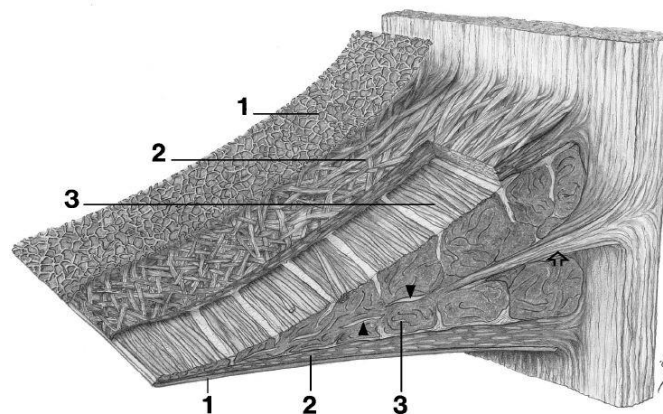


Figure 1.13 | Architecture des fibres de collagène dans le ménisque
 1 : Couche superficielle très fine
 2 : Couche superficielle lamellaire
 3 : Couche centrale (Petersen and Tillmann, 1998).

- ➔ Les couches superficielles fémorale et tibiale ont une épaisseur de 100 à 200 µm chez l'homme. Elles sont constituées d'une couche surfacique très fine (environ 10 µm), composée de fibres orientées aléatoirement, puis d'une couche lamellaire formée également de fibres orientées aléatoirement, sauf en périphérie où elles sont orientées radialement.
- ➔ La couche centrale est constituée de fibres circonférentielles, organisées en torons compacts, principalement impliquées dans la résistance en traction.

Bien que le ménisques contiennent beaucoup moins de **glycosaminoglycanes** (<1%) que dans le cartilage (Hellio Le Graverand et al., 2001), plusieurs familles sont présentes : C6S (60%), C4S (10-20%), KS (15%) ainsi que DS (20-30%) et acide hyaluronique (4-10%) (Adams and Muir, 1981; Makris et al., 2011; Nakano et al., 1997). Comme dans le cartilage, les glycosaminoglycanes et protéoglycanes se trouvent majoritairement sous forme d'agrécans mais on trouve également dans les ménisques certains protéoglycanes restant à l'état non agrégé, des protéines non collagéniques et des glycoprotéines, en faibles quantités. Ces proportions sont également variables selon les localisations : la proportion de protéoglycanes est plus importante dans la zone interne. Comme dans le cartilage, leur fonction principale est d'absorber l'eau indispensable à la résistance en compression du tissu (Makris et al., 2011)

Il existe deux familles principales de **cellules** dans le ménisque distinguées selon leur forme et leur lien avec la MEC. La zone externe vascularisée du ménisque, contient des cellules analogues aux fibroblastes. Ces cellules sont fusiformes et la MEC qui les entoure est principalement constituée de collagène de type I. Les fibrochondrocytes sont des cellules rondes ou ovales, similaires aux chondrocytes du cartilage, et se situent dans les zones interne et centrale du ménisque, non vascularisées. Elles sont incorporées dans une MEC constituée en grande partie de collagène de type II, entremêlé à une quantité plus faible de collagène de type I et une concentration plus élevée de glycosaminoglycanes (Hellio Le Graverand et al., 2001; Levillain, 2016; Makris et al., 2011).

Bien que les proportions des différents constituants du ménisque peuvent varier en fonction de l'âge, de l'espèce, de la localisation dans le tissu et des éventuelles maladies, le Tableau 1.3 résume les principales caractéristiques des zones du ménisque et montre que la zone interne a donc une structure plus proche de celle du cartilage articulaire alors que la zone externe est organisée comme un fibrocartilage (Hellio Le Graverand et al., 2000; Makris et al., 2011).

	Zone interne	Zone externe
Vascularisation	-	+
Innervations		
Collagène	-, surtout type II	+, surtout type I
GAG	+	-
Cellules	fibrochondrocytes	fibroblaste-like
→ Structure	→ cartilage hyalin	→ fibrocartilage

Tableau 1.3 | Résumé des principales caractéristiques des zones des ménisques.

1.5.1.2 Fonctions du ménisque

Cette organisation bipartite souligne la capacité du tissu à résister à la fois aux forces de compression dans sa partie interne et contraintes circonférentielles de traction en périphérie (Hellio Le Graverand et al., 2000). Ainsi, les ménisques remplissent quatre fonctions principales au sein de l'articulation grâce à leur forme, leurs attaches, leurs constituants et leur comportement mécanique complexe :

➔ Répartition des efforts

Les ménisques supportent cisaillement, tension et compression. Leur section triangulaire et leurs attaches antérieure et postérieure permettent de convertir ces efforts en contraintes circonférentielles de traction : la zone interne du ménisque sera alors principalement sollicitée en compression, et la zone externe en traction. Ils protègent ainsi le cartilage de contraintes excessives. Pour résister à ces contraintes de traction, les fibres de collagène s'étirent et glissent les unes par rapport aux autres (Allen et al., 1995; Levillain, 2016; Makris et al., 2011; Petersen and Tillmann, 1998).

➔ Stabilisation du genou

Les surfaces articulaires du genou sont formées des condyles fémoraux convexes et du plateau tibial qui lui est relativement plat. La surface fémorale concave du ménisque permet donc une adaptation à ces formes et améliore la congruence entre les deux surfaces articulaires participant ainsi à la stabilisation du genou (Allen et al., 1995).

➔ Absorption des chocs

L'absorption des chocs permet de réduire les forces et l'énergie transmises au système osseux. Le ménisque peut être vu comme un milieu biphasique, avec une phase fluide constituée d'eau et une phase solide constituée de la matière organique de la MEC. Les propriétés viscoélastiques résultantes permettent l'absorption des chocs au sein de l'articulation et la diminution des vibrations au niveau du fémur durant la marche d'environ 20% (Levillain, 2016).

➔ Limitation des frottements

Comme le cartilage permet le glissement des surfaces osseuses grâce à des propriétés lubrifiantes, liées principalement à la lubricine synthétisée par les fibrochondrocytes de la zone superficielle des ménisques (Blewis et al., 2007). Des études ont montré qu'après ménisectomie, le coefficient de

frottement augmente d'environ 20% entre les surfaces cartilagineuses du tibia et du fémur (Allen et al., 1995).

1.5.2 Ligaments croisés

Les ligaments croisés sont intra articulaires mais extra synoviaux. Ils participent, avec la capsule articulaire, à maintenir en place les deux surfaces articulaires (Sutton et al., 2009).

1.5.2.1 Structure et composition

Les ligaments sont composés de deux tiers d'eau, contribuant à la fonction cellulaire et au comportement viscoélastique du tissu, et à un tiers de MEC. La MEC est principalement constituée de collagène (environ 75% du poids sec) orientées de façon à offrir une résistance optimale dans des directions précises, de protéoglycanes (moins de 1%), d'élastine et enfin d'autres protéines et glycoprotéines telles que l'actine, la laminine et les intégrines (Frank, 2004). La majeure partie des ligaments croisés antérieur (LCA) et postérieur (LCP) est composée de faisceaux de fibres de collagène de type I, séparées par des fibrilles de collagène de type III. Le ligament est pauvre en cellule et le principal type cellulaire est le fibroblaste. De forme allongée, on le trouve de manière isolée entre les fibrilles de collagène. Bien que ces cellules puissent apparaître physiquement et fonctionnellement isolées, des études récentes ont montré que ces cellules du ligament peuvent communiquer au moyen d'extensions cytoplasmiques proéminentes qui s'étendent sur de longues distances et se connectent aux extensions cytoplasmiques des cellules adjacentes, formant ainsi une architecture tridimensionnelle élaborée (Frank, 2004). La structure histologique des ligaments croisés n'est pas homogène : il existe une zone où le tissu ressemble au fibrocartilage mais positionnée différemment selon les ligaments (à 5-10 mm de l'insertion proximale du ligament tibial dans le LCA, dans la partie centrale du tiers moyen dans le LCP) (Petersen and Tillmann, 1999). Les faisceaux de fibres de collagène se calcifient lorsqu'on se rapproche de la jonction avec l'os. Cette transition progressive de la structure près des insertions osseuses renforce le lien avec l'os et diminue le risque d'arrachement ligamentaire (Bray et al., 2005).

Bien que faiblement vascularisée, la surface des ligaments est recouverte d'une couche plus vascularisée (~2% du volume tissulaire) qu'en profondeur, se confondant dans le périoste de l'os

autour des sites de fixation du ligament. La majorité de ces vaisseaux situés à la surface, sans orientation précise, forme un motif ramifié typique en petits canaux vasculaires. En profondeur, le tissu est moins vascularisé mais aligné linéairement suivant le grand axe du ligament. Les vaisseaux sanguins dans le ligament sont souvent associés à des nerfs présentant une organisation similaire avec cependant plus de nerfs au niveau des insertions osseuses. L'innervation des ligaments provient principalement des troncs nerveux musculaires, cutanés et articulaires voisins. (Bray et al., 2005; Frank, 2004).

1.5.2.2 Fonctions des ligaments

Le ligament est une structure qui permet de solidariser deux os et d'autoriser leur mouvement l'un par rapport à l'autre. Bien qu'ils soient de structure passive, l'orientation des faisceaux et fibres de collagène les rend adaptés pour supporter ou pour imposer des contraintes en traction élevées, influençant ou résultant de la transmission des efforts dans le genou (Landreau et al., 2003).

L'une des principales fonctions des ligaments est mécanique car elles stabilisent passivement les articulations et contribuent à guider ces articulations dans leur gamme de mouvement normale et protègent les autres tissus articulaires des forces aberrantes (Bray et al., 2005; Frank, 2004). Les ligaments présentent un comportement viscoélastique anisotrope non linéaire. À faibles charges, les contraintes sont transmises par les fibrilles de collagène, légèrement ondulées au repos. Au fur et à mesure que le chargement augmente, les contraintes sont supportées plus directement par les fibrilles de collagène, entraînant une augmentation de la rigidité globale du ligament. Un glissement relatif entre les fibrilles de collagène se produit sur une grande partie de sa plage de chargement physiologique, jusqu'à ce que la structure fibrillaire soit endommagée (Biewener, 2008). Il a été observé que les ruptures ligamentaires se produisent au niveau de l'insertion osseuse pour les mises en charge à faible vitesse alors qu'ils auront tendance à se rompre au milieu dans le cas de mise en charge rapide (Landreau et al., 2003).

Une autre fonction de ligament se rapporte à son comportement viscoélastique en aidant à fournir une homéostasie articulaire. Lorsque le ligament est soumis à une élongation constante, la charge diminue progressivement jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre biomécanique soit atteint, ce qui suggère une adaptation structurelle du tissu. On parle alors de relaxation. Dans le cas où une charge constante,

proche de la charge à la rupture, ou cycliquement répétitive lui est appliquée, le ligament va s'allonger avec le temps, au-delà de sa déformation initiale. Ceci correspond au fluage, phénomène particulièrement important lorsque l'on considère les lésions articulaires ou la chirurgie reconstructive car un fluage excessif pourrait entraîner une laxité de l'articulation, ce qui l'endommagerait davantage (Bray et al., 2005; Frank, 2004; Landreau et al., 2003).

Pourtant, quelques études ont montré que globalement les ligaments sont exposés à de faibles charges, comparés à d'autres structures articulaires porteuses comme le tendon et le muscle. Un nombre croissant de preuves suggère ainsi une troisième fonction neurosensorielle dans la proprioception articulaire (perception consciente de la position des membres dans l'espace). Dans le genou, la proprioception est assurée principalement par des récepteurs articulaires, musculaires et cutanés. Lorsque les ligaments sont tendus, ils invoquent des signaux de retour neurologiques qui ont été identifiés comme jouant probablement un rôle dynamique dans la modulation de l'activité musculaire en réponse aux conditions de chargement (Bray et al., 2005; Frank, 2004).

2. L'arthrose et dégradations articulaires associées

2.1 L'arthrose

L'arthrose (OA) est la plus commune des maladies articulaires dans le monde et induit des charges physiques, psychologiques, sociétales et économiques majeures. Selon les Nations Unies, en 2050, 315 millions de personnes souffriront d'arthrose symptomatique et 105 millions d'entre elles seront fortement handicapées par la maladie. Il est estimé que 10 à 15% des adultes âgés de plus de 60 ans sont atteints à divers stades de l'arthrose dans le monde (WHO, 2013). Tous critères confondus, la prévalence de l'OA est en moyenne de 8 et 15 % pour les pays dits industrialisés, soit pour la France environ 10 millions de Français (SFR Société Française de Rhumatologie). Seconde cause d'invalidité en France, elle constitue le premier motif de consultation médicale après les maladies cardiovasculaires.

La prévalence de l'OA symptomatique du genou, appelée gonarthrose, représente environ 30% des cas d'arthrose en France et est deux fois plus élevée que celle de la hanche ; l'OA de la cheville, souvent post-traumatique, est beaucoup moins répandue ; environ 7% des personnes âgées ont une OA symptomatique de la main. Près de la moitié des patients ont une atteinte multifocale, on parle alors de polyarthrose (Buckwalter and Felson, 2015; Fautrel et al., 2005).

L'arthrose est une maladie articulaire invalidante, non réversible, d'étiologie complexe. Elle se caractérise par la dégradation progressive du cartilage articulaire mais touche également l'ensemble des tissus de l'articulation et des tissus périarticulaires. Les symptômes cliniques occasionnés par la maladie sont la douleur chronique, la raideur, la déformation des articulations et le bruit articulaire.

2.1.1 Facteurs de risque

L'OA est un processus dynamique résultant d'une combinaison de facteurs locaux (traumatisme et exercice), systémiques (obésité, alimentation), mécaniques, tissulaires, cellulaires et biochimiques. Certains peuvent être corrigés, d'autres sont incontournables (âge, genre, génétique) et conduisent à des prédispositions (Johnson and Hunter, 2014; Litwic et al., 2013b).

→ Vieillessement

Il est admis que l'âge est le plus grand facteur de risque pour le développement de l'OA, résultant de la perte de la capacité globale des cellules et des tissus à maintenir l'homéostasie. Certaines études montrent ainsi que 80% des personnes âgées de plus de 65 ans ont des signes radiologiques d'arthrose, bien que cela puisse être asymptomatique (Haq et al., 2003). Il existe notamment un lien étroit avec la sénescence du cartilage : les modifications structurelles des tissus articulaires et péri-articulaires altèrent les propriétés biomécaniques de l'organe diarthrosique. La sénescence du cartilage intervient principalement au niveau de la matrice extracellulaire et de la phase cellulaire (chondrocytes). Une dégradation enzymatique accrue des protéoglycanes et du collagène est à l'origine de la fragilisation de la matrice extracellulaire notamment dans sa couche superficielle. Le cartilage articulaire vieillissant est plus sensible aux contraintes physiologiques qu'il ne dissipe plus aussi bien et les chondrocytes subissent des contraintes anormalement élevées. Cet état peut favoriser l'apparition d'arthrose mais pour autant, le cartilage sénescé n'est pas synonyme de cartilage arthrosique (Chevalier and Richette, 2005; Lotz and Loeser, 2012; Shane Anderson and Loeser, 2010).

→ Traumatisme et exercice

L'arthrose post-traumatique (PTOA) est une conséquence directe ou indirecte de traumatismes articulaires (fracture articulaire, rupture de ligaments ou lésions méniscales). Elle représente environ 12% des cas d'arthrose (Buckwalter and Felson, 2015). Les personnes exerçant des métiers impliquant des stress mécaniques articulaires comme les athlètes de haut niveau présentent également davantage de risque d'être atteints d'OA (Haq et al., 2003). La PTOA est d'autant plus problématique qu'elle concerne des individus les plus souvent jeunes. Pour autant, c'est le type d'OA sur lequel il est possible d'agir précocement, le processus causal étant identifié.

→ Genre

Avant 50 ans, la prévalence de l'OA est plus élevée chez l'homme. Cependant, après 50 ans, la tendance s'inverse et la prévalence et la sévérité de l'OA sont supérieures chez les femmes par rapport à l'homme. Un déficit des œstrogènes lié à la ménopause pourrait être un déclencheur. Les disparités entre les sexes pourraient également être causées par des différences dans la résistance osseuse, l'alignement et le relâchement des ligaments, la grossesse et la force neuromusculaire. Les

femmes présentent aussi un volume de cartilage au niveau du genou plus faible que les hommes, sans qu'il soit avéré que cela puisse contribuer à la perte accélérée de cartilage (Haq et al., 2003; Johnson and Hunter, 2014).

➔ **Obésité**

Trois à six fois le poids est supporté par le genou au cours de la marche et chaque augmentation de poids engendre d'autant plus de fois de contrainte sur le genou. Etre en surpoids autour de 35 ans est un facteur de risque pour le développement d'OA après 70 ans. C'est également un facteur aggravant de développer une OA contralatérale quand un genou est déjà atteint (Haq et al., 2003). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'influence systémique de l'obésité qui est également un facteur de risque pour le développement d'OA dans les articulations non portantes, comme les doigts, mains, poignets (Visser et al., 2014; Yusuf and Kloppenburg, 2013).

➔ **Génétique**

L'OA sous toutes ses formes semble fortement déterminée avec des facteurs génétiques représentant au moins 60% de l'arthrose de la hanche et de la main et jusqu'à 40% de l'arthrose du genou. De nombreux gènes ont été identifiés pour jouer un rôle dans les voies physiopathologiques de l'OA contribuant à augmenter le risque d'OA (Johnson and Hunter, 2014).

➔ **Alimentation**

Les personnes ayant de faibles niveaux de vitamines C ou D dans le sang ont également trois fois plus de risque de développer de l'OA (Haq et al., 2003).

2.1.2 Impacts socioéconomiques

Une étude a été menée en 2010 sur le coût de l'OA de la hanche et du genou en France (Bertin et al., 2014). Près de 180 000 patients ont été hospitalisés en France pour arthrose, dont 51% pour une OA de la hanche (âge moyen 75 ans) et 49% pour une OA du genou (âge moyen 71 ans). Au total, le coût annuel de toutes ces hospitalisations a été estimé à 1,9 milliards d'euros. Le coût des soins dispensés pour chaque patient a été évalué, puis élargi aux 4,6 millions de patients souffrant d'arthrose symptomatique en France. Cela représente 3,5 milliards d'euros, dont 2 milliards d'euros à la charge de l'Assurance Maladie, et correspond au coût de la prise en charge du patient arthrosique et non au coût de celle de l'arthrose car sont également comptabilisés les médicaments prescrits pour les

comorbidités fréquentes liées à l'âge des patients qui ont majoritairement plus de 65 ans (hypertension artérielle, hypercholestérolémie...).

En 2005, une étude en France portant sur plus de 10 000 patients a mis en évidence que quatre patients sur cinq sont limités dans leurs activités quotidiennes (s'habiller, se déplacer, faire ses courses ou des activités ménagères). Parmi les patients arthrosiques encore en activité, 65% étaient impactés dans leur vie professionnelle et plus de 20% ont eu recours à des arrêts de travail, impactant ainsi leur productivité. L'arthrose induit ainsi des coûts financiers pour la société, pour les patients (dépenses liées aux transports et aux aides ménagères) liés aux handicaps, en particulier chez les personnes âgées qui ont plus de risque de devenir dépendantes et socialement isolées (Fautrel et al., 2005)

Actuellement, il n'existe pas de traitement pour guérir l'arthrose, qui est devenue un véritable problème de santé publique et il est nécessaire de comprendre sa pathogénie pour mieux la traiter.

2.1.3 Physiopathologie et phénotypes de l'arthrose

L'arthrose est un processus pathologique multifactoriel touchant tous les tissus de l'articulation conduisant à des défaillances structurelles et fonctionnelles de l'articulation (Hunter and Felson, 2006). Ces altérations sont liées à un déséquilibre entre la dégradation et la réparation des tissus (Litwic et al., 2013b). En 1994, l'OMS a rédigé la définition suivante de l'OA :

« L'arthrose est la résultante de 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 provoqué par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques ou traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondrale associée à la formation d'ostéophytes et de géodes. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale ».

Le processus de l'OA implique l'ensemble de l'organe articulaire incluant le cartilage, les ménisques, l'os sous-chondral, la membrane synoviale, les ligaments, les muscles péri-articulaires, la capsule articulaire et la membrane synoviale (Hunter and Felson, 2006) (Figure 1.14).

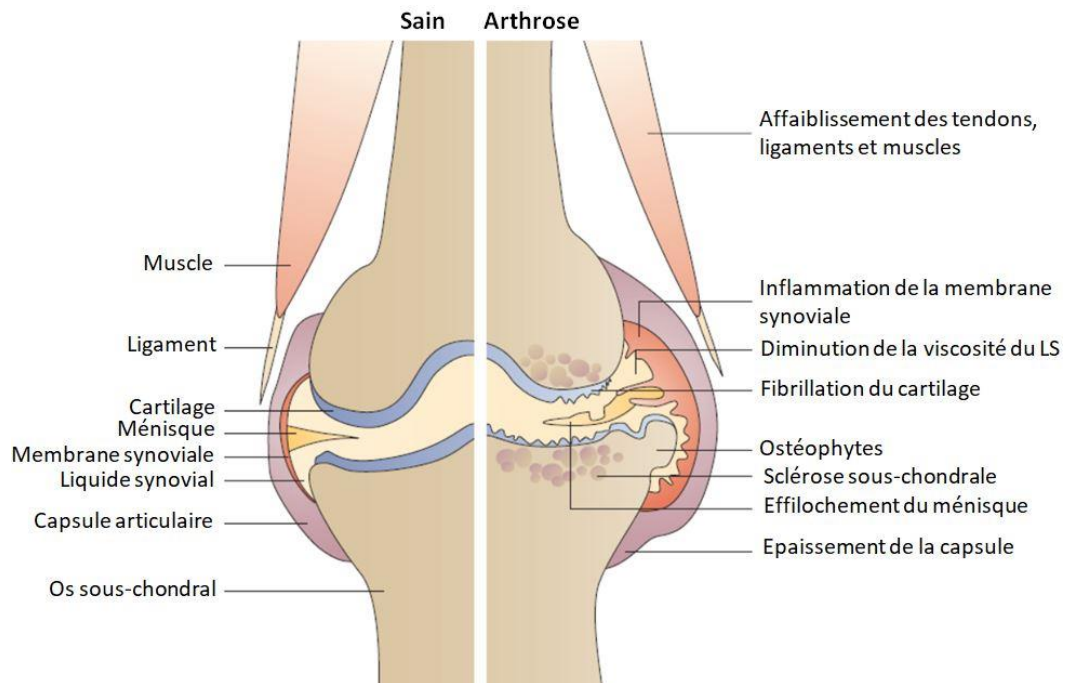


Figure 1.14 | Illustration des effets de l'arthrose sur l'articulation
 Dégradation des cartilage, ménisque et os sous-chondral, avec libération de débris dans le LS; développement d'excroissances osseuses (ostéophytes); inflammation de la membrane synoviale et du LS; affaiblissement des ligaments, des muscles et tendons (Wieland et al., 2005).

L'OA est un processus en cascade, un cercle vicieux entraînant une fibrillation de la surface du cartilage articulaire et la destruction de sa microarchitecture avec la formation de zones d'érosion (Haq et al., 2003). L'altération du cartilage impacte l'os sous-chondral avec une prolifération osseuse en périphérie de l'articulation (ostéophyte) et dans les stades avancés de la maladie, une densification osseuse (sclérose) (Wieland et al., 2005). La dégradation du cartilage se traduit également par : i) la libération de fragments dans la cavité articulaire, provoquant une inflammation de la membrane synoviale, entretenue par les chondrocytes et les synoviocytes ; ii) une augmentation de la production de liquide synovial et un épaissement de la capsule articulaire (Hunter and Felson, 2006; Kuyinu et al., 2016; Wieland et al., 2005). La dégradation du cartilage est visible à la radiographie par un pincement de l'interligne articulaire, c'est-à-dire une diminution de l'espacement entre le tibia et le fémur (Haq et al., 2003). Les ménisques subissent également de nombreuses modifications à l'échelle macroscopique, allant jusqu'à la formation de lésions.

L'arthrose est classée en deux groupes. L'arthrose primaire (ou encore idiopathique) peut être localisée ou généralisée et est plus fréquente chez les patientes ménopausées. Elle est généralement liée à l'âge et intervient naturellement due à un processus dégénératif de l'articulation. L'arthrose secondaire a une cause sous-jacente, comme un traumatisme, l'obésité ou des prédispositions génétiques (Altman et al., 1986; Haq et al., 2003; Kuyinu et al., 2016).

Il apparaît que la population des patients arthrosiques est hétérogène avec des variations liées à l'origine physiopathologique (vieillesse, génétique, surmenage mécanique, traumatisme...), à la progression de la maladie (arthrose commune, arthrose d'évolution rapide), à leur retentissement fonctionnel, à la présence ou non et au type de douleur (nociceptive, neuropathique ou mixte), à l'expression clinique, à la réponse au(x) traitement(s) ou encore à la présence de comorbidités (Cadet et al., 2015; Dell'Isola et al., 2016; Felson, 2010). Il n'y a donc pas « une arthrose » mais de multiples « arthroses » qui correspondent à autant de phénotypes arthrosiques, c'est-à-dire de sous-groupes homogènes de patients. Cette notion de pluralité des phénotypes constitue un défi pour l'identification d'interventions personnalisées et efficaces. Les traitements actuels ou futurs, préventifs ou curatifs, pourraient ainsi être adaptés à chaque sous-groupe.

2.1.4 Traitements de l'arthrose

Il n'existe pas de schéma précis pour la prise en charge thérapeutique de l'arthrose, qu'elle soit primaire (dégénérative) ou secondaire à un traumatisme articulaire (direct ou indirect). Le but de la thérapie est de réduire la douleur, d'améliorer la qualité de vie ainsi que la mobilité afin, si possible, de ralentir ou stabiliser la progression de la maladie (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006; Zhang et al., 2007). Les thérapies proposées consistent en traitements non médicamenteux, puis médicamenteux et enfin chirurgicaux si nécessaire (Figure 1.15) (Hunter and Felson, 2006).

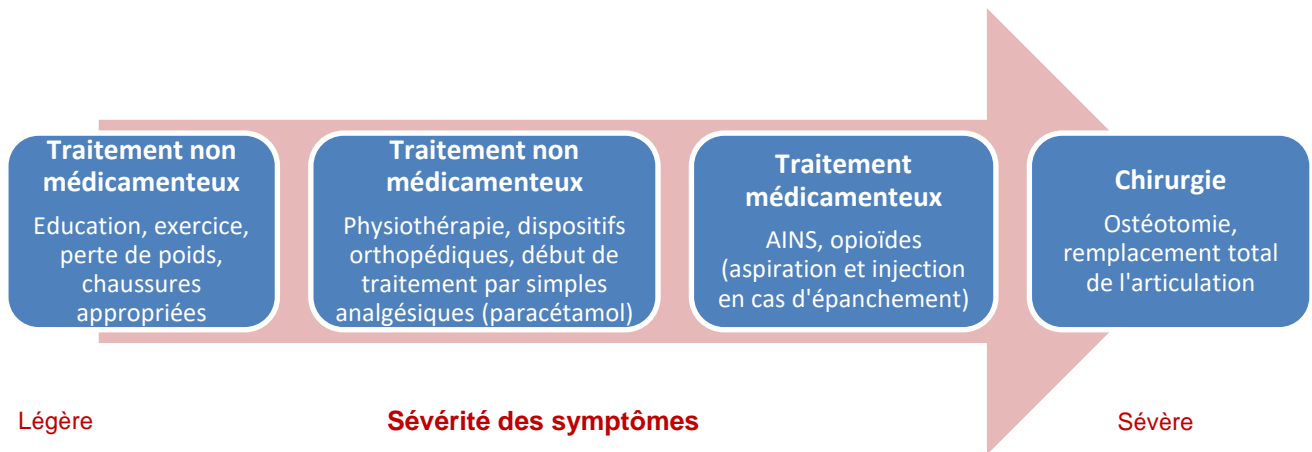


Figure 1.15 | Hiérarchie des traitements recommandés en fonction de la sévérité des symptômes pour la prise en charge des patients atteints d'arthrose, soulignant la nécessité d'envisager la gestion non médicamenteuse en première approche pour tous les patients; AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens (Hunter and Felson, 2006).

2.1.4.1 Les thérapies non médicamenteuses

Les thérapies non médicamenteuses commencent par l'éducation des patients (campagne d'information). L'exercice (à faible impact comme la marche, le cyclisme, la natation ou autre activité aquatique) et la perte de poids sont essentiels : ils permettent de limiter la perte de masse musculaire due à l'inactivité, de renforcer la puissance et l'endurance musculaire, d'améliorer la flexibilité et la mobilité articulaires, et de réduire l'invalidité et la douleur (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006; Zhang et al., 2007).

La physiothérapie est axée sur le traitement de la douleur et l'amélioration des déficits fonctionnels par des méthodes dites « douces » comme le renforcement et l'étirement musculaires, l'utilisation du froid (cryothérapie) ou de la chaleur, les massages ou encore l'hydrothérapie (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006).

Dans le cas de l'arthrose du genou, les chaussures absorbant les chocs réduisent l'impact de la charge sur le genou. Les attelles, genouillères et semelles orthopédiques sont conseillées aux patients présentant des désalignements importants, genu valgum (genoux cagneux) ou genu varum (jambes arquées). Ces dispositifs entraînent des rotations internes (supination) ou externes (pronation) du pied permettant de compenser la déformation du genou et soulager la surcharge du compartiment fémoro-tibial. Les talonnettes améliorent la proprioception et réduisent la douleur (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006).

2.1.4.2 Thérapies médicamenteuses

En l'absence d'efficacité de l'approche non médicamenteuse, des traitements thérapeutiques sont proposés sous forme de médicaments à visée antalgique sous forme orale (analgésiques, anti-inflammatoires ...) ou intra articulaire.

➔ Les thérapies orales

Le paracétamol (jusqu'à 4 g/jour) est l'analgésique oral proposé en cas de douleur légère à modérée dans l'arthrose (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006). Il peut être combiné à des opioïdes qui apporte une meilleure efficacité mais également des effets secondaires hétérogènes (nausées, constipation, vertiges, somnolence, ...) (Zhang et al., 2007). Des études plus récentes ont montré que les anti-inflammatoires anti-stéroïdiens (AINS) apportent une meilleure réponse à la douleur, principalement lorsqu'elle est sévère, avec une efficacité antalgique d'environ 30% et une amélioration de la fonctionnalité d'environ 15% (Haq et al., 2003; Zhang et al., 2007). Cependant, ils sont réputés pour leurs effets secondaires toxiques et morbides (problèmes rénaux et gastro-intestinaux), spécialement chez les personnes âgées (Hunter and Felson, 2006).

Les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL) sont des médicaments fréquemment utilisés contre l'OA, comprenant notamment la chondroïtine sulfate et la glucosamine. Ces médicaments, d'une efficacité modérée et controversée, doivent être pris au long cours. Ces traitements ne sont pas curatifs, mais permettent généralement de réduire les doses d'antalgiques et d'anti-inflammatoires (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006).

➔ Les injections intra articulaires

Les injections intra articulaires sont actuellement de trois types : corticoïdes, viscosuppléments et produits dérivés du sang.

Les corticoïdes ont des effets anti-inflammatoires permettant de réduire la douleur ainsi que la formation d'ostéophytes et de lésions cartilagineuses (Uthman et al., 2003) mais des études ont montré que le soulagement est de courte durée et que les doses ne doivent pas dépasser 3 à 4 injections par an (Ayhan et al., 2014; Haq et al., 2003).

La viscosupplémentation par injection d'acide hyaluronique est de plus en plus proposée dans les symptômes douloureux de l'arthrose, pour compenser la diminution d'acide hyaluronique naturel et ainsi améliorer la viscosité du LS et rétablir globalement un environnement rhéologique normal dans le LS, la membrane synoviale et la *lamina splendens* (Balazs and Denlinger, 1993). L'objectif de la viscosupplémentation est d'obtenir un effet anti-inflammatoire, analgésique et chondro-protecteur sur le cartilage articulaire. Il existe plusieurs formulations injectables d'acide hyaluronique, qui diffèrent notamment par leur plan de traitement (une injection tous les 6 mois à plusieurs injections par semaine), leur poids moléculaire (entre 500 et 6000 kDa) et leurs propriétés rhéologiques (Ayhan et al., 2014; Watterson and Esdaile, 2000). Cependant, malgré de nombreux tests cliniques, l'efficacité de la viscosupplémentation donne matière à débat (Ayhan et al., 2014) tout en restant plébiscitée par les rhumatologues car jugée moins risquée que les injections de corticoïdes (Maheu, 2015).

Le plasma enrichi en plaquettes (PRP) est un concentré autologue enrichi en plaquettes par centrifugation, et qui après injection va libérer de nombreux médiateurs et facteurs de croissance. Malgré la simplicité d'utilisation et son faible coût, de nombreuses études pointent la variabilité du PRP : en effet, selon la composition et le volume de sang prélevé, le processus d'élaboration utilisé, les teneurs en plaquettes peuvent varier du simple au quintuple (Ayhan et al., 2014; Ornetti et al., 2014).

2.1.4.3 La chirurgie

En dernier recours, lorsque la douleur n'a pu être soulagée par les thérapies médicamenteuses et que les patients sont handicapés dans leurs activités quotidiennes ou professionnelles, de nombreuses solutions chirurgicales peuvent être proposées pour améliorer la fonctionnalité du genou, réduire la douleur et ralentir la progression de la maladie : l'arthroscopie, la transplantation de cartilage autologue, l'ostéotomie, la ligamentoplastie ou la méniscectomie. Cependant, en dernier recours, l'arthroplastie peut s'avérer indispensable. La pose d'une prothèse est une intervention irréversible qui apporte un soulagement de la douleur et une amélioration nette de la fonctionnalité pour la plupart des patients arthrosiques pendant près de 20 ans. Des études ont montré que l'arthroplastie est par ailleurs rentable puisque son coût est inférieur aux coûts associés aux médicaments à long terme, aux soins de santé et à la diminution de la productivité au travail (Haq et al., 2003; Hunter and Felson, 2006; Shin and Lee, 2012).

Aujourd'hui, les progrès dans les thérapies se heurtent à l'étiologie multiple et à la complexité physiopathologique de l'OA qui nécessitent d'avoir des outils permettant d'appréhender l'ensemble des phénotypes sans multiplier les analyses et les prélèvements.

Afin de pouvoir proposer de nouvelles stratégies de prise en charge ou des outils d'aide à leur développement et à leur évaluation, il est nécessaire de comprendre comment le processus arthrosique se met en place, et quels sont les facteurs clés entrant en jeu.

2.2 Processus anaboliques et cataboliques

Les cellules clés de l'homéostasie articulaire sont les chondrocytes et les synoviocytes. Elles assurent à la fois la synthèse et le renouvellement (anabolisme) de la matrice cartilagineuse et du LS et possèdent aussi les mécanismes enzymatiques nécessaires pour dégrader leurs constituants (catabolisme).

2.2.1 Rôle des cytokines, protéases et leurs inhibiteurs

Les protéases sont des enzymes protéolytiques, synthétisées par les chondrocytes des cartilages, les fibrochondrocytes des ménisques et les synoviocytes de la membrane synoviale. Elles sont impliquées de manière combinée dans la dégradation du cartilage et du ménisque et l'érosion osseuse. Elles agissent par clivage enzymatique des liaisons peptidiques des protéines (Rengel et al., 2007). La dégradation du collagène est majoritairement liée à l'action des collagénases, de la famille des matrix métalloproteinases (MMPs) tandis que la dégradation des protéoglycanes est due à la fois aux MMPs et agrécanases de la famille des ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs), dont ADAMTS-4 et ADAMTS-5.

Les MMPs sont divisées en plusieurs groupes :

- ➔ Les stromélysines (MMP-3, MMP-10, MMP-11) jouent un rôle fondamental dans la cascade de MMP en raison de leur capacité à dégrader divers composants du cartilage tels que les agrécanes, les protéines de liaison et les collagènes de types III, IV, IX et X.
- ➔ Les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) sont capables de dégrader la triple hélice du collagène de type II, l'un des principaux composants du cartilage articulaire.
- ➔ Les gélatinases sont responsables de la dégradation du collagène dénaturé par les collagénases (MMP-2 et MMP-9) (Panula et al., 1998; Tchvetverikov, 2005).

Les MMPs sont strictement régulées par des inhibiteurs spécifiques des tissus endogènes des métalloprotéinases (TIMPs), qui consistent en quatre inhibiteurs de la protéase ayant des interactions et affinités spécifiques avec des MMPs. Ainsi, TIMP-1 inhibe MMP-1, MMP-3 et MMP-9. TIMP-2 est lié à MMP-2. TIMP-3 inhibe MMP-2 et MMP-9 alors que TIMP-4 est un bon inhibiteur pour toutes les classes de MMP sans préférence particulière (Heard et al., 2012; Hegemann et al., 2002; Panula et al., 1998).

Les cytokines représentent un groupe diversifié de molécules solubles à la base du système de communication intercellulaire au sein de l'organisme. Elles sont regroupées par famille, comme les interleukines (IL) qui agissent comme médiateurs entre leucocytes. Les cytokines, produites par les macrophages synoviaux et les chondrocytes, jouent également un rôle crucial dans la régulation et la réparation lors du renouvellement normal et pathologique de la MEC cartilagineuse (Marini et al., 2003). Elles peuvent être classées en trois catégories selon leurs effets (Hui et al., 2012) :

- ➔ les cytokines pro inflammatoires (ou cataboliques) : IL-1 α , IL-1 β , TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), IL-6, IL-8, IL-17 et IL-18 favorisent la dégradation de la MEC du cartilage.
- ➔ Les cytokines anti-inflammatoires : IL-4, IL-10, IL-13 inhibent la production des cytokines cataboliques.
- ➔ Les cytokines de régulation de la croissance telles que TGF- β (*Tumor Growth Factor- β*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein-2*), ont des effets anaboliques et contribuent à la préservation de l'intégrité de la MEC du cartilage en augmentant la synthèse de la MEC du cartilage, en stimulant la prolifération des chondrocytes et, dans certains cas, en inhibant la synthèse des MMPs et en augmentant la synthèse de leurs inhibiteurs.

IL1- β stimule la synthèse des enzymes de dégradation, à l'état latent dont les collagénases, stromélysines, gélatinases. Le passage de ces enzymes de l'état latent à actif dépend de leurs inhibiteurs, dont la production est régulée par TGF- β (Abramson and Attur, 2009).

2.2.2 Le cercle vicieux catabolique de l'arthrose

La fonction normale du cartilage dépend notamment de la forte teneur et de la grande taille des agrécans (Figure 1.7). La perte de l'intégrité du cartilage est associée à une altération des agrécans due soit au clivage protéolytique de la « *core protein* » impactant la charge d'agrécane, soit au clivage de l'acide hyaluronique impactant la taille de l'agrégat (Roughley, 2006). L'intégrité de la matrice du

cartilage est cruciale pour les propriétés biomécaniques et l'homéostasie du cartilage articulaire et donc pour la fonction de l'articulation dans son ensemble. Cette intégrité dépend d'une maintenance à la fois de la quantité et de la qualité des différents composants de la matrice. Une telle maintenance et l'adaptation à des exigences fonctionnelles variables sont le résultat d'un équilibre entre les activités anaboliques et cataboliques des chondrocytes et synoviocytes (Lohmander, 1988).

Les chondrocytes et synoviocytes sont des cellules mécano-sensibles qui modifient leur métabolisme en réaction aux changements physicochimiques ou mécaniques de leur environnement. Au cours du processus arthrosique, ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, en premier lieu IL1- β et TNF- α , qui vont, de manière paracrine (sur les cellules environnantes) et autocrine (sur les cellules qui les ont produites), jouer un rôle primordial dans la dégradation du cartilage par augmentation de production des enzymes de dégradation (collagénases et agrécanases) ainsi qu'une baisse de production de leurs inhibiteurs. IL1- β et TNF- α induisent également la production d'autres médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-8, l'oxyde nitrique (NO) et la prostaglandine E2 (PGE2), par les chondrocytes et les cellules synoviales, qui vont à leur tour contribuer à diminuer la synthèse de protéoglycanes et amplifier la dégradation du collagène de type II et des agrécanes (Abramson and Attur, 2009).

En parallèle, les chondrocytes tentent d'une part de limiter les lésions en augmentant leur production de médiateurs anabolisants tels que IGF-1 ou TGF- β , mais qui vont induire une synthèse de collagène de type I ou III, et d'autre part de limiter l'inflammation en produisant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 (Henrotin et al., 2005). Cependant, ces tentatives de réparation ne sont pas suffisantes pour contrebalancer le processus catabolique.

Dans les couches plus profondes du cartilage, la production du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) dans le cartilage et l'os stimule l'angiogenèse de la plaque sous-chondrale et du cartilage calcifié conduisant à la minéralisation du cartilage et donc au recul du cartilage calcifié et à l'amincissement global du cartilage articulaire. Des études ont également montré une modification du remodelage osseux lors de la progression de l'arthrose. Dans les premiers stades, une augmentation du remodelage est observée rendant la plaque sous-chondrale plus mince et plus poreuse. A un stade plus avancé de la maladie, le remodelage est déséquilibré et tend à une formation osseuse excessive.

Les facteurs de croissance TGF- β et BMP-2 produits dans la membrane synoviale, le cartilage et l'os stimulent la formation d'ostéophytes (Goldring and Goldring, 2010; Loeser et al., 2012) qui serviraient à corriger l'instabilité créée dans l'articulation (Kuyinu et al., 2016). A terme, ces mécanismes induisent la sclérose de l'os sous-chondral caractérisée par une densification osseuse de la plaque sous-chondrale (Burr and Gallant, 2012; Kuyinu et al., 2016).

Dans le même temps, le cartilage soumis à des contraintes mécaniques anormales en fréquence, intensité ou en répartition des forces va subir une rupture du réseau collagénique. Cette rupture provoque d'une part une pénétration d'eau dans la matrice (chondromalacie) et d'autre part un défaut de contention et donc une fuite des agrécanes (Huber et al., 2000).

Finalement l'action conjuguée des contraintes mécaniques, du clivage enzymatique des agrécanes et du collagène de type II, de la minéralisation du cartilage et de la sclérose osseuse altère les propriétés mécaniques du cartilage qui perd sa viscoélasticité et sa capacité à amortir les chocs qui se fissure et à terme se détruit (on parle alors d'ulcération du cartilage).

Une étude a montré que l'OA entraîne de façon précoce une usure des ménisques au niveau de la surface et une modification des propriétés viscoélastiques dans leur couche centrale liée à une diminution de la quantité de GAG. Le rôle des GAG dans la résistance aux efforts de compression et dans le glissement entre les fibres de collagène n'étant plus assuré efficacement, l'organisation des torons de collagène circonférentiels devient plus fibrillaire entraînant une diminution globale de la rigidité en compression des ménisques (Levillain et al., 2017a).

Les produits de dégradation du cartilage et du ménisque libérés dans le LS provoquent une inflammation de la membrane synoviale entretenue par les chondrocytes et les synoviocytes qui génèrent à leur tour IL1- β et TNF- α perpétuant ainsi un **cercle vicieux catabolique de l'arthrose** qui s'auto-entretient et s'auto-aggrave (Figure 1.16).

Bien que l'OA ait souvent été classée comme maladie non inflammatoire, il semble que l'inflammation de la membrane synoviale soit initiée dès le début du processus pathologique et contribue à entretenir les dégradations tissulaires (Sokolove and Lepus, 2013; Sutton et al., 2009).

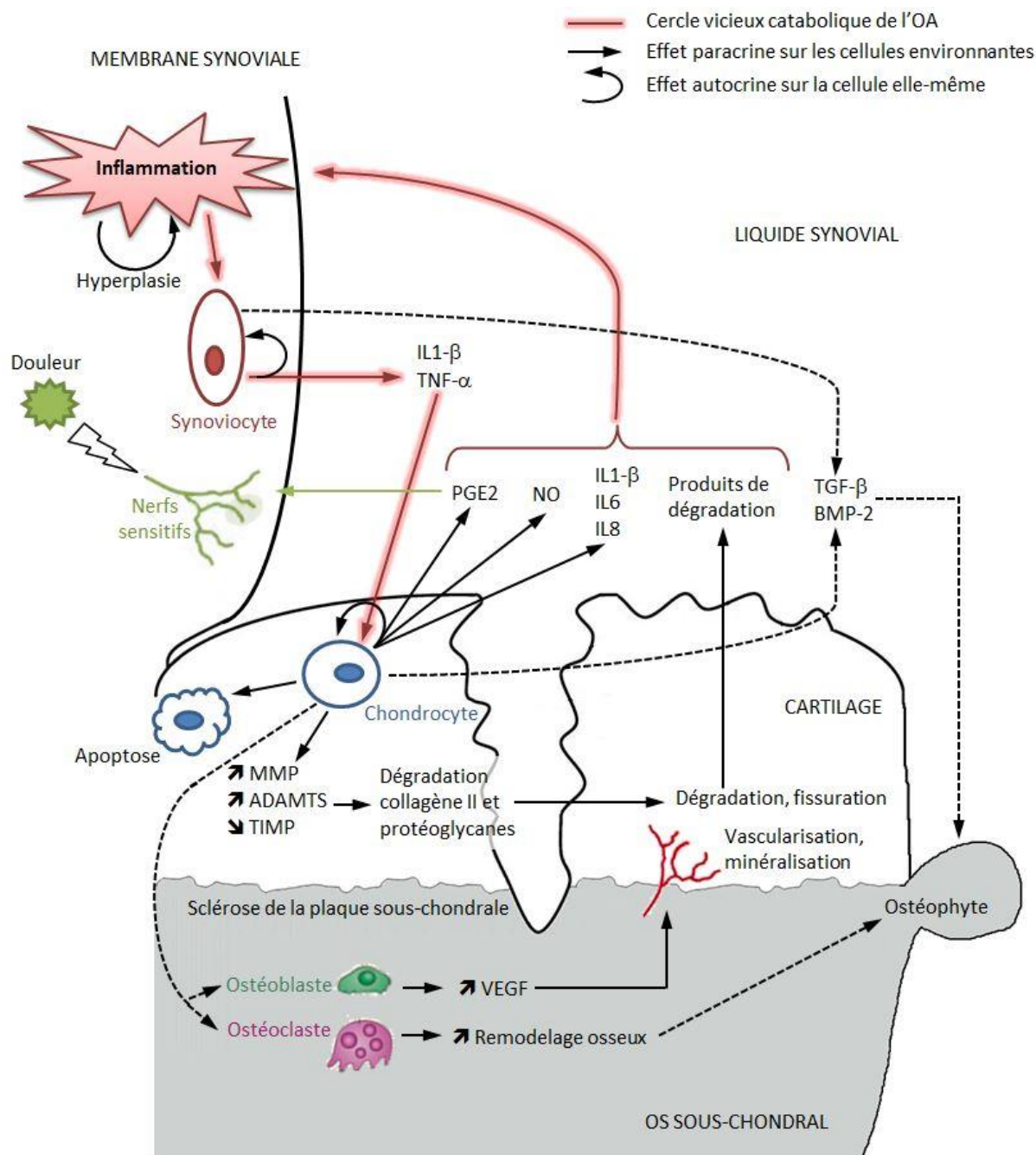


Figure 1.16 | Cercle vicieux du processus catabolique de l'OA d'après (Abramson and Attur, 2009; Henrotin et al., 2005, 2012; Kuyinu et al., 2016; Loeser et al., 2012; Sutton et al., 2009; Wieland et al., 2005).

Les fragments de cartilage, phagocytés par les macrophages de la membrane synoviale, entraînent également une hyperplasie vasculaire dans la membrane synoviale arthrosique (Abramson and Attur, 2009). Des coupes histologiques de la membrane synoviale enflammée montrent une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins ainsi qu'une prolifération cellulaire impactant le taux de diffusion des molécules dans l'espace interstitiel de la MEC de la membrane synoviale (Abramson and Attur, 2009; Hui et al., 2012; McCarty et al., 2012). Des études ont montré que les prostaglandines, synthétisées par les chondrocytes et les synoviocytes, en plus de contribuer à la dégradation du cartilage, ont

d'autres effets. La prostaglandine est un médiateur de la douleur car elle tend à augmenter (indirectement) la sensibilisation des nerfs sensitifs (Wieland et al., 2005). La prostaglandine est également un vasodilatateur et participe à l'inflammation de la membrane synoviale (Kushner, 1971; Panula et al., 1998; Simkin, 2015).

La douleur ressentie, liée à la stimulation des récepteurs nociceptifs a deux origines : i) le remodelage de l'os sous-chondral en raison de sa riche innervation ; ii) l'inflammation initiale de la membrane synoviale (synovite) (Balazs, 2009; Kuyinu et al., 2016).

2.2.3 Le liquide synovial arthrosique

Le LS est au cœur de l'articulation, et à ce titre les lésions des différents tissus articulaires sont responsables des modifications physico-chimiques du LS qui vont à leur tour se répercuter sur le fonctionnement de l'articulation. Réciproquement, un changement primaire du LS (lié par exemple à une inflammation systémique, au vieillissement) peut être responsable de la dégradation des autres tissus articulaires.

Lors du processus arthrosique, on observe plusieurs phénomènes complémentaires régulant la concentration et le poids moléculaire de l'acide hyaluronique (McCarty et al., 2012) et l'apport de protéines sériques de plus grands poids moléculaires :

- ➔ La dégradation enzymatique provoque la dépolymérisation des chaînes d'acide hyaluronique et diminue ainsi leur poids moléculaire.
- ➔ Les synoviocytes synthétisent des molécules de l'acide hyaluronique de plus petits poids moléculaires et en plus petite quantité.
- ➔ La dégradation de la MEC de la membrane synoviale diminue la résistance à la perte d'acide hyaluronique par le réseau lymphatique.
- ➔ L'augmentation de la perméabilité de la membrane synoviale, liée à son inflammation, conduit à des augmentations proportionnellement plus importantes de la perméabilité pour les protéines plus grandes.
- ➔ Les articulations pathologiques produisent généralement de plus grandes quantités de fluide (2-5 ml) que les articulations normales (0,3 à 1 ml) (Conrad, 2003) ce qui accentue la baisse de la concentration d'acide hyaluronique par une plus grande dilution.

Plus précisément, on peut distinguer l'importance de ces phénomènes selon l'état inflammatoire ou non inflammatoire de la pathologie (Tableau 1.4).

	Etat normal	Etat inflammatoire	Etat non inflammatoire
Production HA	+ haut poids moléculaire	- faible poids moléculaire	- faible poids moléculaire
Dégradation HA		+	++
Perte HA	-	++	+
Flux de protéines	- faible poids moléculaire	++ haut poids moléculaire	+ haut poids moléculaire
Volume LS	-	++	+

Tableau 1.4 | Evolution de la composition du LS selon l'état de l'articulation (Fam et al., 2007; Hui et al., 2012; McCarty et al., 2012).

Finalement, alors que le poids moléculaire de l'acide hyaluronique d'un LS sain est de l'ordre de 6 à 7 MDa, il chute aux environs de 1 à 4 MDa pour un LS OA (Dahl et al., 1985; Fam et al., 2007; Hui et al., 2012; Praest et al., 1997). La viscosité du LS étant principalement liée à la concentration et au degré de polymérisation de l'acide hyaluronique, ces modifications provoquent inévitablement une réduction de la viscosité du LS arthrosique (Brannan and Jerrard, 2006; Fam et al., 2007; Pascual and Jovaní, 2005). Par ailleurs, la réduction de la taille des chaînes d'acide hyaluronique diminue sa capacité d'« imperméabilisant dynamique » (Figure 1.5), aussi bien sur la surface de la membrane synoviale que du cartilage, ce qui a un impact majeur sur la lubrification des surfaces articulaires (Sabaratnam et al., 2005).

2.3 Moyens diagnostiques actuels et biomarqueurs potentiels

2.3.1 Moyens diagnostiques

La phase précoce de l'OA étant souvent silencieuse (Sandell, 2012), elle est impossible à détecter à ce jour : la douleur, symptôme le plus visible ne survient qu'à partir d'un certain stade de développement (Kuyinu et al., 2016). Actuellement, le diagnostic de l'arthrose est réalisé par examen clinique, puis confirmé par examen radiographique (Hunter and Felson, 2006).

➔ Score clinique

L'évaluation clinique la plus répandue de l'OA du genou et de la hanche est le score WOMAC (Western Ontario and McMaster Osteoarthritis index) (Bellamy, 2005; Bellamy et al., 1988). Cette

évaluation a été développée par Bellamy et se présente sous la forme d'un questionnaire portant sur 24 items, répartis en 3 domaines : la douleur, la raideur articulaire et la fonction physique.

➔ **Score radiographique**

L'examen radiographique reste le *gold standard* actuel pour diagnostiquer et évaluer la progression de l'OA.

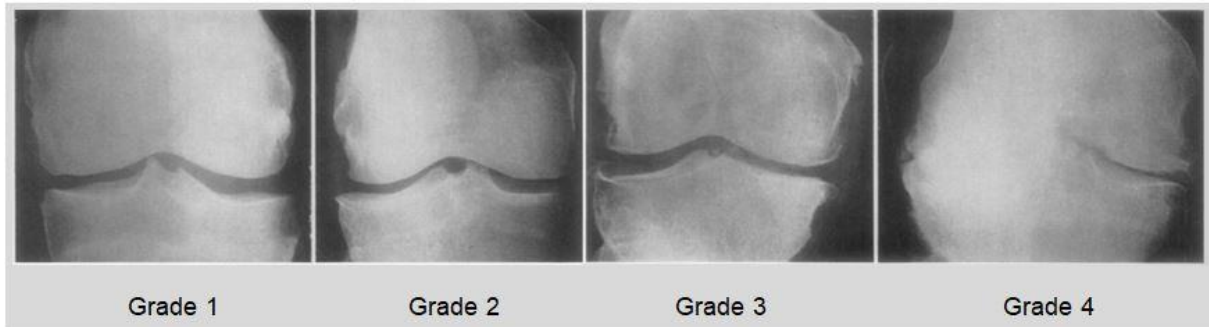


Figure 1.17 | Radiographies de face du genou montrant le système de score KL
Grade 1 : OA douteuse car petit ostéophyte de signification douteuse ;
Grade 2 : OA minimale avec ostéophytes nets sans pincement de l'interligne articulaire ;
Grade 3 : OA modérée avec ostéophytes nets et pincement de l'interligne articulaire modéré ;
Grade 4 : OA sévère avec ostéophytes multiples, pincement de l'interligne articulaire, sclérose sévère et déformation osseuse (Kellgren and Lawrence, 1957; Link et al., 2003).

Le score de Kellgren-Lawrence (KL) (Kellgren and Lawrence, 1957) est utilisé le plus souvent par les cliniciens et a également été adopté par l'Organisation Mondiale de la Santé comme norme de référence pour les études épidémiologiques transversales et longitudinales (Link et al., 2003). Le système de cotation est le suivant : Grade 0 : pas d'OA, radiographie normale ; les grades 1 à 4 sont illustrés sur la Figure 1.17 (Link et al., 2003).

L'OsteoArthritis Research Society International (OARSI) propose une nouvelle définition de l'arthrose dans laquelle l'OA ne serait plus « une maladie » mais un désordre cellulaire « pouvant aboutir à une maladie » par le biais de lésions anatomiques et/ou de dérèglements physiologiques :

« L'arthrose est une affection touchant les articulations mobiles, caractérisée par un stress cellulaire et une dégradation de la matrice extracellulaire, initiés par des micro et macro traumatismes qui activent des réponses réparatrices inadaptées impliquant les voies de l'inflammation de l'immunité innée. La maladie se manifeste initialement par des anomalies moléculaires (métabolisme anormal des tissus articulaires), qui sont suivies par des anomalies anatomiques et/ou physiologiques (dégradation du cartilage, remodelage osseux, formation d'ostéophytes, inflammation articulaire et perte de la fonction articulaire normale) pouvant aboutir à une maladie »

On comprend donc que cette technique n'est pas suffisante car elle ne permet ni de détecter l'apparition d'OA si l'os ou l'interligne articulaire ne sont pas encore affectés, ni de détecter les désordres cellulaires. 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 n'étant pas corrélée au grade radiographique (Link et al., 2003; Loeser et al., 2012).

➔ **Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)**

L'IRM est en général inutile pour poser le diagnostic d'OA (Berenbaum and Auger, 2016). Cependant, elle permet de visualiser l'ensemble des tissus articulaires, notamment les tissus mous (cartilage, ménisque, ligaments ...) qui ne sont pas visibles à la radiographie (Roemer et al., 2011). Ainsi, une étude américaine a montré qu'une proportion importante de personnes atteintes de gonarthrose (40%) présentaient à l'IRM une aggravation des lésions cartilagineuses importantes alors qu'aucune progression radiographique n'était apparente (Amin et al., 2005). Cette technique récente n'est donc pas utilisée de manière systématique mais peut être utile dans les cas précoces, chez des patients jeunes, ou lorsqu'on recherche des atteintes associées : sévérité de l'atteinte du cartilage, degré d'inflammation des éléments intra- et extra-articulaires, œdème osseux sous-chondral, lésions méniscales (Berenbaum and Auger, 2016).



Figure 1.18 | Comparaison radiographie / IRM
(a) Radiographie antéro-postérieure : pas de signe de pincement articulaire, présence d'un ostéophyte médial tibial (flèche noire)
(b) Coupe sagittale d'une IRM : une lésion du cartilage est visible sur le fémur medial postérieur (flèches blanches) (Roemer et al., 2011).

Ainsi, en dépit de progrès technologiques, ces techniques restent encore incapables de détecter précocement la maladie ou d'anticiper sa progression et sont insuffisantes pour suivre l'effet de traitements.

2.3.2 Analyses de routine du LS pathologique

L'analyse du LS fait partie de la démarche diagnostique en rhumatologie, permettant de distinguer arthrose, inflammation, infection articulaire ou arthropathie microcristalline (Damiano and Bardin, 2005). Ces tests de routine requièrent 2 à 3 ml de LS (Brannan and Jerrard, 2006) pour réaliser :

- ➔ L'examen macroscopique : couleur, opacité, estimation de la viscosité par « String test » avec une seringue ou « thumb test » entre le pouce et l'index (Figure 1.19).

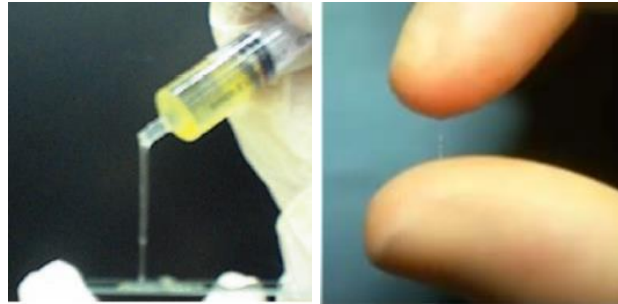


Figure 1.19 | Estimation de la viscosité du LS par « String test » et « Thumb test »
Pour un LS non inflammatoire, la longueur du filet avant rupture est de 5-6 cm (Larkin et al., 1984).

- ➔ L'analyse cytologique pour comptage cellulaire total et différentiel, globules blancs /mm³ et pourcentage de polynucléaires neutrophiles, permet d'orienter le diagnostic vers un rhumatisme inflammatoire (si supérieur à 2000/mm³) ou affectation mécanique (si inférieur à 1000/mm³).
- ➔ L'analyse bactériologie qui recherche la présence de germes par culture et par coloration de Gram permet de déterminer s'il y a une infection et d'effectuer un antibiogramme. De façon plus générale, bactéries, virus, champignons voire parasites sont recherchés.
- ➔ La recherche de micro-cristaux, essentiellement monosodium urate monohydrate (MSU) et calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD), réalisée par l'identification des formes et biréfringence des cristaux par microscopie optique à lumière polarisée permet de diagnostiquer les arthrites microcristallines.

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques des LS sains, non inflammatoires et inflammatoires.

Examens	LS sain	LS non inflammatoire	LS inflammatoire
Macroscopique			
Apparence	Transparent	Transparent	Opaque, turbide
Volume	Jaune paille	Jaune paille	Jaune
Viscosité	< 3.5 ml	> 3.5 ml	↗ ↘↘
Floculation (mucine clot)	Elevée	↘	
	Bonne	Bonne	Pauvre
Cytologique			
Leucocytes / mm ³	< 200	< 2000	2000-50000
% Polynucléaires Neutrophiles	< 25 %	< 30 %	> 50 %
Cristaux	Aucun	Aucun	Mutiple ou Aucun
Glucose (LS : sang)	95-100%	95-100%	80-100%

Tableau 1.5 | Caractéristiques du LS
(Brannan and Jerrard, 2006; Mundt and Shanahan, 2010).

2.3.3 Biomarqueurs

Aujourd'hui, des méthodes alternatives basées sur de nouveaux biomarqueurs moléculaires pouvant détecter quantitativement, de manière fiable et sensible, les changements liés à l'OA dans les articulations à un stade précoce de la maladie sont recherchées. De tels marqueurs moléculaires sont essentiels pour le diagnostic, le pronostic, le suivi de la progression de la maladie et l'efficacité de nouvelles thérapies. Un bon biomarqueur est spécifique à la maladie, reflète son activité réelle, est sensible à la thérapie et peut prévoir l'issue de la maladie. Très probablement, toutes ces exigences ne pourront être satisfaites qu'avec une combinaison de marqueurs (DeGroot et al., 2002).

La classification BIPED classe les biomarqueurs selon les paramètres clés pour l'évaluation et la qualification de l'utilité des biomarqueurs comme détaillé dans une revue de l'OARSI en 2015 : Fardeau de la maladie (B « Burden of disease »), Enquête (I « Investigative »), Pronostic (P « Prognostic »), Efficacité de l'intervention (E « Efficacy of intervention ») et Diagnostic (D « Diagnostic ») (Bay-Jensen et al., 2016).

Les biomarqueurs sont souvent dosés dans le LS mais cela peut nécessiter des prélèvements répétés lors d'études longitudinales, ce qui peut modifier le processus inflammatoire (Teeple et al., 2013). Les biomarqueurs peuvent également être détectés dans le sérum grâce aux échanges plasmatiques avec la membrane synoviale. D'autres sont transportés dans la circulation lymphatique, puis éliminés par le rein et excrétés dans les urines où ils peuvent être dosés. Néanmoins, les niveaux de biomarqueurs dans le sérum et l'urine sont influencés par les réponses systémiques des autres organes ou maladies et génèrent donc plus de variations intra- et inter-individus (Teeple et al., 2013; Wieland et al., 2005; Yoshida et al., 2013). Les techniques les plus classiques de dosage sont : les tests immunologiques (*enzyme-linked immunosorbent assay* ELISA), la chromatographie en phase liquide à haute performance (*high pressure liquid chromatography* HPLC), l'électrophorèse ...

Le Tableau 1.6 résume les principaux biomarqueurs ayant fait l'objet de recherche ces dernières années. Les biomarqueurs sont prélevés selon les études dans le LS, le sérum et/ou l'urine. Chaque biomarqueur a vocation à renseigner sur un processus particulier de la pathologie arthrosique. Les paragraphes ci-dessous apportent des informations complémentaires.

Biomarqueurs	Prélèvement	Processus	Références
HA Teneur, concentration, distribution du poids moléculaire	LS, sérum	Inflammation	Belcher et al., 1997; Cibere et al., 2009; Dahl et al., 1985; Darwish et al., 2012; McCarty et al., 2012; Pavelka et al., 2004; Praest et al., 1997; Schmidt-Rohlfing et al., 2002
C-Réactive Protein C-RP	Sérum	Inflammation	Kushner, 1971; Takahashi et al., 2004
Phospholipase PLA₂	Sérum	Inflammation	Panula et al., 1998
Protéines Concentration LS:sérum Profils protéomiques	LS, sérum	Inflammation Physiopathologie OA	Kushner, 1971 Gobezie et al., 2007
Protéoglycane Fragments, C6S/C4S, KS ou leurs épitopes	LS	Dégradation collagène	Belcher et al., 1997; Cibere et al., 2009; Dahlberg et al., 1992; Hegemann et al., 2002; Herrero-Beaumont et al., 2001; Lohmander et al., 1993; Poole et al., 1994; Uesaka et al., 2001; Yamada et al., 1999
Collagène Fragments et épitopes (C2C, CTX-II, Coll 2-1) Collagen II propeptides	LS, sérum, urine	Dégradation collagène Synthèse collagène	Cibere et al., 2009; Henrotin et al., 2007, 2016; Kumahashi et al., 2015
COMP	LS, sérum	Cartilage turnover	Darwish et al., 2012; Herrero-Beaumont et al., 2001; Williams and Spector, 2008
Cytokines IL-1, IL-6, TNF- α TGF- β	LS, sérum	Inflammation Cartilage turnover	Attur et al., 2013; Poole, 2003
MMP, TIMP dont Collagénase (MMP1), Stromélysine (MMP-3), TIMP-1	LS, sérum	Cartilage turnover	Heard et al., 2012; Hegemann et al., 2002; Herrero-Beaumont et al., 2001; Lohmander et al., 1993; Marini et al., 2003; Panula et al., 1998; Pavelka et al., 2004; Rengel et al., 2007; Schmidt-Rohlfing et al., 2002; Takahashi et al., 2004; Tchetverikov, 2005
CTX-I	Sérum, urine	Remodelage osseux	Schmidt-Rohlfing et al., 2002
Ostéocalcine	Sérum	Remodelage osseux	Herrero-Beaumont et al., 2001
Pyridinoline	LS, urine	Remodelage osseux	Schmidt-Rohlfing et al., 2002; Takahashi et al., 2004
Adipokines Leptine, adiponectine, resistine, visfatine, ...	LS, sérum	Inflammation Cartilage turnover	Calvet et al., 2016; Poonpet and Honsawek, 2014; Yusuf and Kloppenburg, 2013

Tableau 1.6 | Résumé des principaux biomarqueurs moléculaires
(Attur et al., 2013; DeGroot et al., 2002; Poole, 2003; Wieland et al., 2005)

C-RP, C-Reactive protein ; CS, Chondroïtine sulfate ; KS, Keratane sulfate ; CTX-II et C2C, Collagen type II marker et épitope ; COMP, Cartilage oligomeric matrix protein ; IL, Interleukine ; TNF- α , Tumor necrosis factor- α ; TGF- β , Tumor growth factor- β ; CTX-I, Collagen type I marker ; MMP, Matrix metalloproteinase ; TIMP, Tissue inhibitor of metalloproteinase.

➔ Le degré d'inflammation

L'inflammation de la membrane synoviale est mesurée de plusieurs façons, soit directement par l'analyse de la membrane soit indirectement par l'étude des causes ou conséquences de l'inflammation :

- ✓ La caractérisation de l'acide hyaluronique, c'est-à-dire sa masse totale, sa concentration et la distribution de son poids moléculaire dans le LS (Dahl et al., 1985; McCarty et al., 2012) renseigne sur le processus de sa dégradation et reflète l'activité des enzymes pro-inflammatoires.

- ✓ Le ratio de la concentration dans le LS sur la concentration sérique (LS: S) d'une protéine reflète la perméabilité relative de la membrane pour cette protéine et donc le degré d'inflammation (Kushner, 1971).
- ✓ La phospholipase A₂ (PLA₂) est une enzyme de la famille des prostaglandines, qui participe au processus inflammatoire (Panula et al., 1998).
- ✓ Il a été démontré une augmentation de la concentration sérique de protéine C-réactive (CRP) liée à par l'infiltration de cytokines pro-inflammatoires dans le sang (Poole, 2003).
- ✓ D'autres équipes utilisent l'échographie à ultrason pour visualiser l'hypertrophie de la membrane synoviale (Attur et al., 2010).

➔ Les protéoglycanes

La concentration en fragments de protéoglycane libérés dans le LS après dégradation enzymatique est influencée par la masse de la matrice de cartilage restant dans l'articulation, l'activité inflammatoire dans l'articulation et l'activité métabolique des cellules cartilagineuses (Dahlberg et al., 1992). Ils peuvent refléter à la fois la synthèse et la dégradation de l'agrécan dans le cartilage (Yamada et al., 1999). Des études ont mis en évidence la distribution zonale du C6S dans le cartilage normal : la concentration la plus élevée de C6S est située dans le quartile supérieur du tissu puis elle diminue de la surface vers les zones moyennes du tissu. Par conséquent, la quantité de C6S libérée est plus importante au début du processus arthrosique puis diminue nettement lorsque la surface articulaire est fortement détériorée, entraînant une diminution marquée de la concentration de C6S dans le LS (Uesaka et al., 2001). La teneur en protéoglycanes peut également être mesurée par coloration de coupes histologiques de cartilage ou ménisque mais donc uniquement *in vitro* (Levillain et al., 2015; Rizkalla et al., 1992). Les protéoglycanes peuvent également être dosés indirectement par la mesure de la concentration de leurs constituants (C6S, C4S, KS) ou de leurs épitopes (3B3, 7D4, 5D4, 846 ; un épitope est un marqueur situé à la surface d'une molécule et qui permet de la reconnaître).

➔ Le collagène

L'augmentation du clivage du collagène de type II par les collagénases sont tracées sous plusieurs formes. La dégradation du collagène est recherchée dans le sérum ou les urines par dosage de fragments ou d'épitopes de clivage de collagène de type II générés par la collagénase (*Type II Collagen crosslinking C-telopeptide* CTX-II, C1C/C2C, Coll2-1). Par exemple, la concentration en Coll2-1 dans les fluides biologiques cible le catabolisme de la matrice cartilagineuse alors que sa forme nitrée, Coll2-1 NO₂, reflète l'importance de l'oxydation de la matrice (Henrotin et al., 2007,

2016). Le turnover du collagène est lui dosé par la protéine *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP), synthétisée par les chondrocytes et les synoviocytes, sa teneur varie en fonction des cytokines pro-inflammatoires du processus arthrosique (Poole, 2003; Wieland et al., 2005).

➔ **Le remodelage osseux**

L'ostéocalcine est un marqueur de la synthèse osseuse synthétisée par les ostéoblastes (Herrero-Beaumont et al., 2001). La pyridinoline et *Type I Collagen crosslinking C-telopeptide* (CTX-I) sont des marqueurs de la résorption osseuse régulée par les ostéoclastes (Schmidt-Rohlfing et al., 2002; Takahashi et al., 2004).

➔ **Les cytokines, protéases et leurs inhibiteurs**

La plupart des cytokines, facteurs de croissance et enzymes se trouvent en faible concentration dans le LS sain (Hui et al., 2012). La concentration de ces enzymes et cytokines dans le LS est liée à la gravité des lésions observées sur le cartilage arthrosique et reflètent également pour certains le processus inflammatoire. Par exemple une augmentation de IL-1 β et TNF- α est mesuré dans le cartilage (Poole, 2003). Le dosage des MMPs et TIMPs renseignent sur la balance entre anabolisme et catabolisme articulaire en fonction du stade de la maladie, particulièrement sous forme de ratio molaire, par exemple MMP-3/TIMP-1 (Lohmander et al., 1993).

➔ **Les adipokines**

L'obésité, avec l'âge, est l'un des plus grands facteurs de risque associés à l'OA conduisant à une augmentation des forces mécaniques sur les articulations des membres inférieurs, pouvant conduire à une dégradation du cartilage. Plusieurs études ont montré une relation entre l'obésité et le développement de l'OA dans les articulations non portantes, comme les doigts, mains, poignets (Visser et al., 2014). Aussi, des études se sont focalisées sur les adipokines, protéines produites par les tissus adipeux, pour montrer leur influence systémique (plasma sanguin) et locale (LS) dans la dégradation du cartilage et à l'inflammation synoviale (Calvet et al., 2016; Poonpet and Honsawek, 2014; Yusuf and Kloppenburg, 2013).

3. Techniques expérimentales

Ce chapitre décrit les techniques expérimentales nécessaires à la mise en œuvre de la « Drop Deposition Raman Spectroscopy », méthodologie au cœur de cette étude : les modèles animaux d'arthrose, le dépôt de goutte et la spectroscopie Raman.

3.1 Modèles d'arthrose

L'utilisation des modèles animaux d'OA est liée à l'impossibilité de mimer le processus *in vitro* et permet de reproduire de façon contrôlée l'échelle et la progression des lésions articulaires. Ces modèles offrent la possibilité de détecter et de moduler les symptômes et l'évolution de la maladie pour aider au développement de nouvelles thérapies (Teeple et al., 2013). En pratique, l'utilisation de modèles animaux pour étudier l'OA présente des avantages et des inconvénients (Tableau 1.7).

	Avantages	Inconvénients
Homme	Finalité de l'étude : pathogénie de la maladie et l'efficacité de traitements	Temps d'étude long car progression lente de la maladie Multiples phénotypes (causes et facteurs de risque) Phase précoce asymptomatique Pas de corrélations entre la progression de la maladie et la sévérité des symptômes Multiples localisations possibles Difficulté d'obtenir des échantillons pour des raisons éthiques, excepté à des stades tardifs lors de chirurgie
Animal	Possibilité de connaître le temps initial de la maladie par induction de l'OA Possibilité de sélectionner des phénotypes Développement de modèles génétiques pour l'étude de gènes spécifiques ou mécanismes moléculaires Des échantillons peuvent être collectés à tous les stades de la maladie	Pas de modèle animal idéal Les lésions développées peuvent ressembler à celles trouvées sur l'homme à certains stades uniquement L'efficacité des traitements peut ne pas être identique à celle observée sur l'homme Difficulté à évaluer et à comparer différents modèles et études en raison des variations inter espèces, de l'âge, de la méthode d'induction de l'OA et de la voie et de la dose d'administration de traitement, du temps de l'étude.
Petit Animal Souris, rat, cochon d'inde, lapin	Peu coûteux Facilité d'hébergement et de manipulation L'articulation entière peut être vue sur une lame histologique	Différences dans l'anatomie, les dimensions et la biomécanique entre les articulations animales et humaines Prise en charge postopératoire difficile
Gros Animal Chien, brebis, cochon, cheval	Enclin à l'arthrose spontanée Arthroscopie et IRM praticables Chien : nombreux résultats validés	Coût important Chien, cheval : perception négative du public

Tableau 1.7 | Avantages et inconvénients des modèles humains et animaux pour l'étude de l'OA (Gregory et al., 2012; Lampropoulou-Adamidou et al., 2013).

3.1.1 Les modèles animaux

La pertinence translationnelle d'un modèle animal dépend i) des différences anatomiques, dimensionnelles (notamment épaisseur du cartilage), biomécaniques, du processus de réparation et de progression des lésions du cartilage ; ii) de la façon dont il mime la pathologie humaine étudiée de manière reproductible selon la technique d'induction utilisée ; iii) de la possibilité d'utiliser des outils d'évaluation semblables à ce qui se fait en clinique chez l'homme (examens cliniques et techniques d'imagerie) ; iv) de la possibilité d'étudier la douleur en fonction du stade d'arthrose (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013).

Globalement, de nombreux animaux peuvent être utilisés dans les modèles d'OA, et généralement, l'articulation étudiée est le genou. Les petits animaux, tels que la souris, le rat ou le lapin, sont peu coûteux, simples à manipuler et à héberger et permettent des études plus courtes. Par contre, leur faible taille rend l'imagerie et les analyses sur les tissus plus difficiles et les prélèvements de LS plus limités. A contrario, les grands animaux, tels que le chien, la brebis ou le cheval, ont une morphologie et un processus pathologique d'évolution plus proches de ceux de l'homme, une taille permettant l'arthroscopie et l'IRM et facilitant les analyses sur les tissus. Cependant, ils sont plus coûteux, plus difficiles à manipuler et la progression de l'arthrose est plus lente (Gregory et al., 2012; Kuyinu et al., 2016; Teeple et al., 2013).

Même s'il n'existe pas de modèle animal idéal, le **modèle canin** est probablement ce qui se rapproche le plus d'un *gold standard*. Le grasset (genou) canin est remarquablement similaire au genou humain, et, comme l'homme, le chien développe de l'OA spontanée liée à des changements dégénératifs conduisant à une rupture du ligament croisé antérieur (LCA) naturelle. Les chiens sont suffisamment grands pour subir une arthroscopie et une IRM et la taille de l'articulation autorise des prélèvements de LS même chez les chiens sains. Les chiens acceptent facilement de se prêter à des exercices, comme l'hydrothérapie. Par ailleurs, ce modèle étant très largement utilisé, de nombreux résultats sont disponibles permettant des comparaisons croisées. Le principal inconvénient de ce modèle est la perception du public et le coût lié à sa prise en charge (hébergement, marche quotidienne) (Buote et al., 2009; Gregory et al., 2012).

Le **modèle lagomorphe** se rapporte au lapin. Le genou du lapin est grossièrement semblable à celui du genou humain à deux exceptions près : i) les humains chargent généralement le côté médian du genou, alors que les lapins chargent plutôt le côté latéral ; ii) le genou de lapin est maintenu dans un degré de flexion plus élevé que chez l'humain et la démarche est très spécifique à ce modèle. Cependant, bien que la biomécanique de l'articulation soit très différente, ce modèle est également très utilisé, notamment pour évaluer l'efficacité de divers composés (Gregory et al., 2012; Kuyinu et al., 2016).

3.1.2 Les techniques d'induction de l'arthrose

Le choix du modèle d'OA résulte d'un compromis entre le type d'arthrose étudié (primaire ou secondaire) voire le phénotype et 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 (Bendele, 2001; Gregory et al., 2012; Kuyinu et al., 2016; Lampropoulou-Adamidou et al., 2013; Teeple et al., 2013).

L'arthrose primaire peut être étudiée en utilisant des modèles spontanés. Le modèle naturel permet d'étudier la pathogénie de l'arthrose dégénérative sans aucune intervention. Les principaux animaux utilisés sont le cobaye albinos, le hamster syrien et le chien. 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 articulaire. Il est principalement utilisé sur la souris transgénique. Cependant, les modèles spontanés nécessitent des temps d'étude plus longs pour être compatibles avec le processus dégénératif et donc un coût plus important (Bendele, 2001; Lampropoulou-Adamidou et al., 2013).

L'arthrose secondaire, ou PTOA, peut être étudiée en utilisant des modèles induits, invasifs ou non-invasifs (Kuyinu *et al.*, 2016). Les modèles invasifs sont de deux types. L'induction chirurgicale consiste à créer une instabilité dans le genou modifiant ainsi la répartition des efforts. La technique la plus couramment utilisée est la transection du ligament croisé antérieur (ACLT) qui entraîne une dégradation du cartilage semblable à une rupture naturelle du LCA. D'autres modèles sont utilisés : ménisectomie (totale ou partielle), lésion méniscale, section des ligaments collatéraux ou croisés et ovariectomie (OA consécutive à déficit d'œstrogènes). L'induction chimique, par injection intra

articulaire de toxique ou de composé inflammatoire, modifie l'environnement métabolique de l'articulation. Les modèles non invasifs visent eux à créer des lésions indirectes dans l'articulation par l'intermédiaire d'impacts mécaniques. Comparés aux modèles spontanés, ces modèles ont l'avantage de dater le début de l'arthrose, d'être reproductibles et de permettre un développement rapide de la pathologie mais sont *de facto* inappropriés pour l'étude de la pathogénie de l'arthrose dégénérative.

La Figure 1.20 recense les différentes catégories de modèles couramment utilisés dans la littérature, classés selon le type d'arthrose (Kuyinu et al., 2016; Lampropoulou-Adamidou et al., 2013).

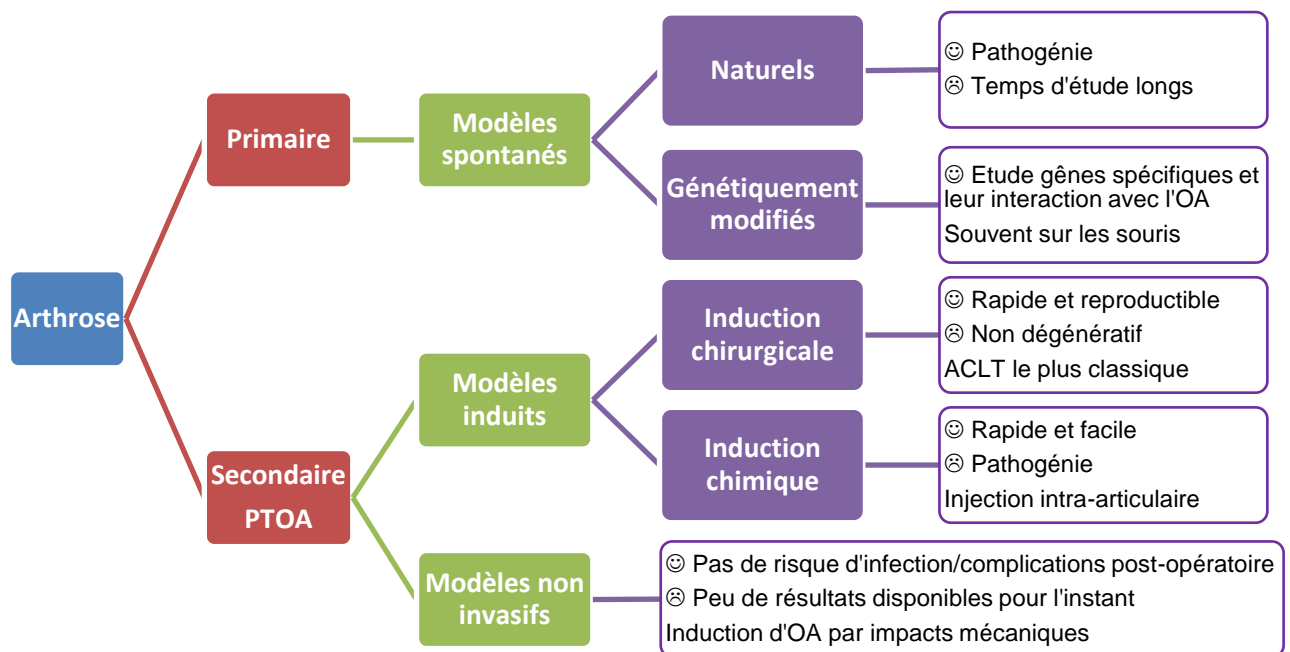


Figure 1.20 | Catégories des modèles d'OA existants et leurs principales caractéristiques, avantages et inconvénients (Kuyinu et al., 2016; Lampropoulou-Adamidou et al., 2013).

3.1.3 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 trois principes (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013) :

- ➔ Remplacement : utiliser des méthodes alternatives non animales si elles sont appropriées
- ➔ Réduction : minimiser le nombre d'animaux par optimisation du protocole expérimental, (notamment techniques non invasives pour le suivi longitudinal d'un animal), utilisation des outils statistiques, partage de données et de ressources
- ➔ Raffinement : minimiser la douleur, l'inconfort, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux par des conditions d'hébergement adaptées, l'accoutumance à la manipulation, administration

appropriée d'analgésiques (pas de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens car ils interfèrent avec la pathogenèse de l'OA).

En pratique, un quatrième principe est appliqué : la Responsabilité qui consiste à sensibiliser le personnel en charge des soins aux animaux et à fournir toute l'information nécessaire sur l'étude (consentement éclairé) aux propriétaires des animaux le cas échéant.

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 contralatérale, est souvent utilisée comme contrôle. Cependant, il est important de noter que les reports de charge pour soulager le membre opéré peuvent induire inflammation ou contraintes mécaniques supplémentaires dans le membre contralatéral, ce qui en fait un contrôle imparfait (Teeples et al., 2013).

3.1.4 Variabilités inter-espèces du LS

Le processus générique décrit au paragraphe 2.2.3 présente des variabilités propres à chaque espèce. Il n'existe pas d'étude comparant directement les concentrations et poids moléculaires de l'acide hyaluronique ou la teneur en protéines dans le LS de différentes espèces.

Plickert *et al.* ont mesuré la concentration en acide hyaluronique dans le LS de chiens non arthrosiques et arthrosiques qui passe respectivement en moyenne (plage de mesure) de ~1,9 mg/ml (1090-2820 µg/ml) à ~0,9 mg/ml (193-2001 µg/ml) (Plickert et al., 2013). Ces résultats sont compatibles d'une autre étude canine sur la base d'un modèle d'OA induit par ACLT dans laquelle la concentration avant intervention était de 2,3 mg/ml pour chuter à 1,1 mg/ml 5 semaines plus tard. Dans le même temps, le poids moléculaire passait de 2,5 MDa à 2 MDa (Smith et al., 2001).

Concernant les lapins, le poids moléculaire de l'acide hyaluronique dans un LS normal est estimé à 2,4-2,9 MDa (Coleman et al., 2000). Mc Carty *et al.* ont étudié sa concentration, dans un modèle de lapins ACLT : elle était de 2,5 mg/ml avant induction avant de chuter de -47%, soit ~1,3 mg/ml, à ACLT + 7 jours puis de passer à -26%, soit ~1,8 mg/ml, à ACLT + 28 jours (McCarty et al., 2012).

Pour les humains arthrosiques, plusieurs études ont été réalisées avec des résultats variables selon la technique utilisée. Praest *et al.* ont trouvé une bonne corrélation entre la viscosité du LS de patients atteints de maladies articulaires inflammatoires et non inflammatoires et la concentration en acide

hyaluronique. La concentration moyenne dans les groupes de LS non inflammatoires était de 0,72 mg/ml contre à 0,22 mg/ml dans les groupes inflammatoires à faible viscosité, avec des poids moléculaires respectifs de 1,9 MDa et 1,59 MDa (Praest et al., 1997). Des valeurs plus élevées ont été mesurées sur des patients arthrosiques à 0,9 mg/ml avec un poids moléculaire de 4 MDa (Dahl et al., 1985) ou à 1,9 mg/ml (Decker et al., 1959). Fam *at al.* ont rapporté des valeurs de plusieurs études avec une concentration variant entre 0,3 et 3,6 mg/ml ainsi que des poids moléculaires compris entre 1,1 et 3,5 MDa (Fam et al., 2007).

Ces valeurs relatives aux chiens et aux lapins sont finalement du même ordre de grandeur, tandis que les dispersions observées sur patients humains sont plus importantes, sans doute aussi lié au fait que l'on ne connaît pas toujours la date de début de l'OA. Le Tableau 1.8 permet de comparer ces résultats.

Etude	Espèce	Pathologie	Concentration HA (mg/ml)	Poids moléculaire HA (MDa)
Arican et al., 1994	Chien	OA spontanée	Non OA ~2,1 OA ~0,9	
Smith et al., 2001	Chien	OA induite (ACLT)	Non OA ~2,3 ACLT + 5 sem ~1,1	~2,5 ~2,0
Plickert et al., 2013	Chien	OA spontanée	Non OA ~1,9 OA moyenne ~1,1 OA sévère ~0,7	
Coleman et al., 2000	Lapin			Non OA 2,4-2,9
McCarty et al., 2012	Lapin	OA induite (ACLT)	Non OA ~2,5 ACLT + 7 jours ~1,3 ACLT + 28 jours ~1,8	
Decker et al., 1959	Humain	Comparaison de plusieurs affections	Non OA ~3,2 OA ~1,9	
Dahl et al., 1985	Humain	Comparaison de plusieurs affections	OA 0,9	Non OA ~7 OA 4,2
Praest et al., 1997	Humain	Comparaison de plusieurs affections	Non inflammatoire ~0,7 Inflammatoire ~0,2	~1,9 ~1,6
Fam et al., 2007	Humain	Review plusieurs affections	Non OA 1,5-4,0 OA 0,3-3,6	6,3- 7,6 1,1-3,5

Tableau 1.8 | Tableau comparatif des concentrations et poids moléculaire de l'HA selon les espèces.

Des études réalisées chez l'homme ont mesuré une augmentation de la teneur en protéines comprise entre 10-31 mg/ml à l'état normal et pouvant atteindre 57 mg/ml à l'état arthrosique (Fam et al., 2007), ou passant de 19 mg/ml à l'état normal à 50 mg/ml dans un fluide rhumatoïde (Levick, 1981). Pour les animaux, seule la teneur en protéines à l'état normal a pu être trouvée dans la littérature : 20-25 mg/ml chez le chien (Lipowitz et al., 1985), 23 mg/ml pour le genou du lapin (Knox et al., 1988), ce qui est peu différent de valeurs relevées chez l'homme.

3.2 Dépôt de gouttes (Drop Deposition)

Le dépôt de gouttes est aussi appelé « *coffee ring effect* » par analogie à la goutte de café tombée sur un substrat plat qui sèche en laissant une marque plus foncée en périphérie liée à l'accumulation de particules de café alors qu'initialement le café était uniformément réparti dans la gouttelette. Deegan et ses collègues ont été les premiers à expliquer le principe de l'évaporation d'un fluide sur un substrat plat produisant un dépôt annulaire contenant quasiment la totalité des analytes (Deegan, 2000; Deegan et al., 1997, 2000) et Larson a publié une revue très complète sur le sujet (Larson, 2014).

En général, l'évaporation des gouttes sessiles (goutte reposant sur une surface) présente deux types de régimes, liés à plusieurs paramètres tels que les propriétés physicochimiques du substrat, le comportement d'étalement, les conditions de séchage (température, humidité relative de l'environnement, vitesse de l'air), la présence d'agent tensioactif et le type de particules (taille, composition chimique) (Bin et al., 2016; Bou Zeid and Brutin, 2013) (Figure 1.21) :

- ➔ angle constant : la goutte s'évapore en gardant son angle de contact constant, la ligne de contact se déplace et la goutte conserve la forme d'une calotte sphérique. Ce type d'évaporation est principalement observé sur des surfaces inertes très lisses.
- ➔ rayon constant : la ligne de contact reste ancrée sur la surface pendant tout le processus d'évaporation tandis que l'angle de contact décroît. C'est le phénomène le plus couramment observé dans des conditions standards.

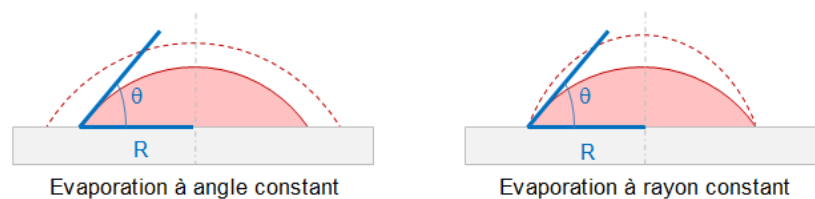


Figure 1.21 | Deux régimes d'évaporation.

Le mouillage caractérise la façon dont le liquide s'étale sur le substrat. Une goutte s'évaporera plus vite sur une surface hydrophile que sur une surface hydrophobe car la surface d'une goutte à l'interface liquide-solide sur une surface hydrophile est plus grande que sur une surface hydrophobe (Yakhno and Yakhno, 2009) (Figure 1.22).

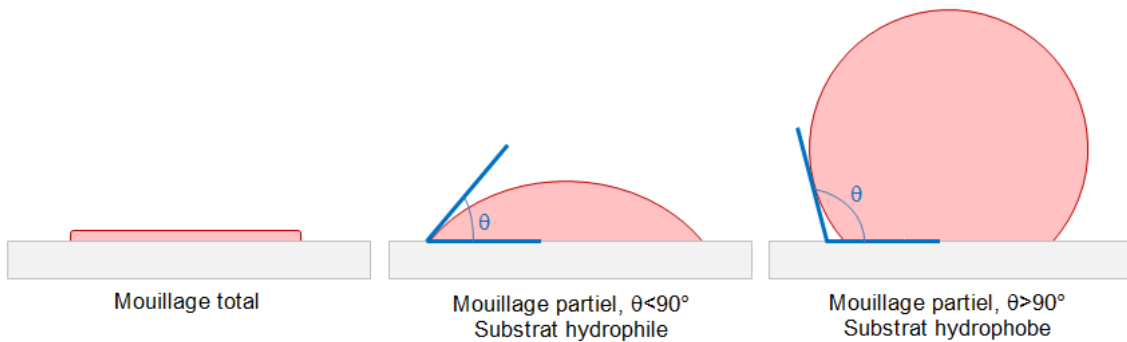


Figure 1.22 | La mouillabilité d'une goutte reposant sur un substrat solide
 Si le liquide s'étale complètement sur le substrat, le mouillage est total, s'il reste sous forme de goutte, le mouillage est partiel et la goutte forme un angle θ au niveau de la ligne de contact : si $\theta < 90^\circ$, le substrat est hydrophile ; si $\theta > 90^\circ$, le substrat est hydrophobe.

L'évaporation d'une goutte de liquide est basée sur des transferts de chaleur et de masse qui sont liés à des phénomènes de convection et conduction entre les trois éléments en présence, le substrat solide, la goutte liquide et l'air (Erbil, 2012) (Figure 1.23).

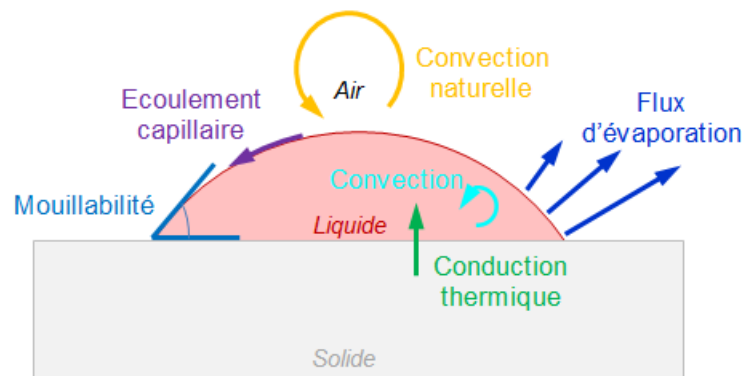


Figure 1.23 | L'évaporation d'une goutte de liquide basée sur des transferts de chaleur et de masse
 i) la conduction entre le substrat solide et le liquide ; ii) la convection naturelle entre l'air et la surface du liquide ; iii) la convection naturelle liée aux gradients de température à l'intérieur de la goutte liquide ; iv) la convection induite par les gradients de tension de surface ; v) les écoulements capillaires induits par les gradients de température le long de la surface; d'après (Erbil, 2012).

Remarque : la conduction est spécifique aux solides : transfert direct de la chaleur de proche en proche par contact physique sans transport de matière ; la convection est spécifique aux fluides : échange de chaleur par le mouvement des molécules.

Deegan et al. ont montré que le flux d'évaporation augmente en périphérie de la goutte, en raison d'une plus grande probabilité d'évasion d'une molécule par évaporation lorsqu'elle part du bord qu'en quittant le centre de la goutte (Figure 1.24a). Ils en ont conclu que le flux capillaire induit par l'évaporation entraîne par advection (transport d'une quantité d'un élément donné par le mouvement, et donc la vitesse, du milieu environnant) les particules en suspension en périphérie de la gouttelette où elles s'accumulent pour former un bourrelet (Figure 1.24b) (Deegan et al., 2000).

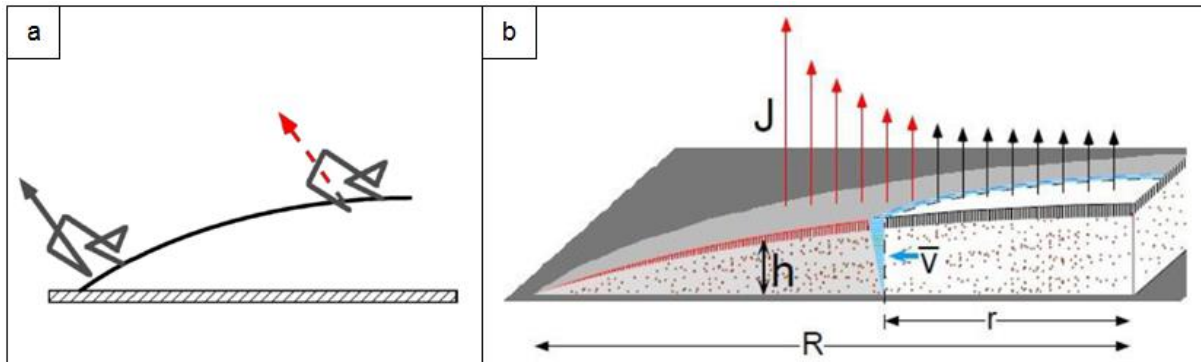


Figure 1.24 | Le flux d'évaporation n'est pas uniforme et augmente en périphérie de la goutte (a) Une molécule s'évaporant au centre de la goutte (pointillés rouges) a toutes les chances d'être réabsorbée alors qu'une molécule s'évaporant au bord de la goutte pourra s'échapper plus facilement (Deegan et al., 2000) (b) Une gouttelette sèche doucement sur un substrat solide : le flux d'évaporation $J(r)$ réduit la hauteur $h(r)$ à tout point r . Globalement, le volume représenté par les hachures verticales est le volume supprimé par évaporation J . Mais dans la région périphérique grisée, le flux d'évaporation est plus important et le volume hachuré en rouge est plus petit que le volume supprimé par évaporation J . Ce déficit de volume induit un flux compensatoire de liquide du centre vers la périphérie de vitesse moyenne \bar{v} (en bleu) qui va transporter par advection les solides dispersés dans la gouttelette (Deegan et al., 1997).

Hu et Larson ont mis en évidence « l'effet Marangoni ». Dans des conditions spécifiques, de gouttes déposées sur des surfaces très lisses (« *ultra clean* »), de changements locaux de concentration ou encore de gradients de température (de l'air ambiant ou du substrat), le gradient de tension superficielle est modifié et un flux inverse se produit. Ce flux Marangoni peut réduire voire éliminer le « *coffee ring effect* » (Hu and Larson, 2006) (Figure 1.25).

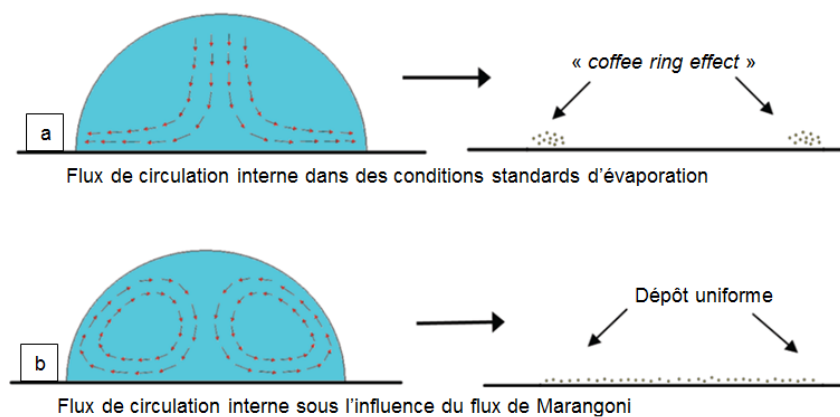


Figure 1.25 | Flux de circulation internes (a) Mouvement de particules dans une gouttelette dans des conditions standards d'évaporation entraînant les particules sur les bords, le « *coffee ring effect* » ; (b) Le mouvement des particules sous l'influence du flux de Marangoni : les particules se déplacent vers le bord, mais les forces de Marangoni génère un flux de recirculation qui finalement homogénéise la concentration des particules (Majumder et al., 2012).

De nombreuses études se focalisent sur la forme des gouttes séchées. Ces formes résultent du « *coffee ring effect* » mais aussi en fin de processus, de la libération de contraintes internes qui s'accumulent pendant l'évaporation produisant des fissures radiales à la surface de la goutte. Dans des conditions standards, les gouttes séchées présentent trois zones distinctes, comme on peut le voir sur les photos Figure 1.26 issues de plusieurs publications (Annarelli et al., 2001; Bou Zeid and Brutin,

2013; Brutin et al., 2011; Esmonde-White et al., 2014; Gorr et al., 2013; Sefiane, 2014; Sobac and Brutin, 2014) :

- ➔ Un anneau périphérique translucide où se sont accumulées les particules
- ➔ Une couronne présentant plus ou moins des cracks en fonction de l'humidité relative
- ➔ Une région centrale contenant les résidus salins qui cristallisent en fin du processus de séchage, souvent sous forme dendritique (on parle aussi de feuilles de fougères) ainsi que des cracks

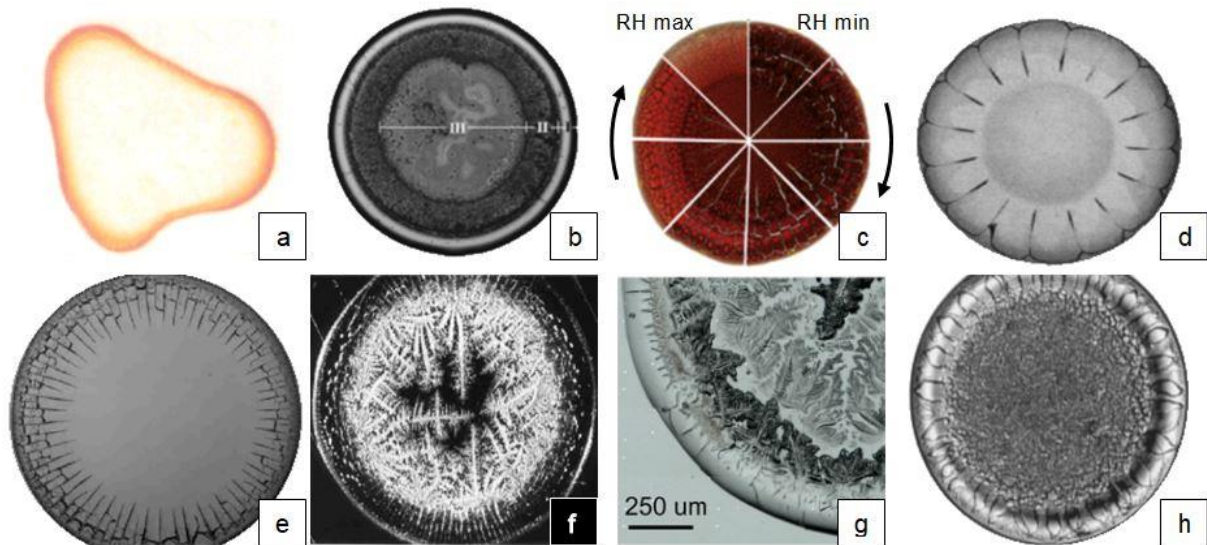


Figure 1.26 | Différents motifs de gouttes séchées

- (a) goutte de café illustrant le « coffee ring effect » (Deegan et al., 1997)
 (b) goutte d'une solution de lysozyme, protéine abondante dans les larmes, illustrant les 3 zones précédemment citées (Gorr et al., 2013)
 (c) photo montrant l'évolution des cracks d'une goutte de sang séchée à différents taux d'hygrométrie (Humidité Relative RH variant entre 13.5% et 78%) (Bou Zeid and Brutin, 2013)
 (d) goutte saline de suspension colloïdale avec des fissures radiales (Pauchard et al., 1999)
 (e, f) goutte d'albumine de sérum de boeuf avec cracks radiaux périphériques pendant le processus de séchage et cristallisations dendritiques au centre de la goutte à la fin du séchage (Annarelli et al., 2001)
 (g) goutte de liquide lacrymal (Filik and Stone, 2008)
 (h) goutte de LS typique (Esmonde-White et al., 2009).

Aujourd'hui, la technique de dépôt de goutte est utilisée dans des domaines très variés. Dans le domaine industriel, les fabricants de peinture utilisent des additifs pour garantir une répartition homogène des pigments pendant le séchage (Deegan et al., 2000) ; les fabricants de machines à jet d'encre pour garantir la qualité de l'impression (Breinlinger and Kraft, 2014). Dans le domaine biomédical, beaucoup d'études sont tournées sur l'exploitation et la reconnaissance des motifs des gouttes pour diagnostiquer une pathologie, par exemple le sang & l'anémie (Brutin et al., 2011), les larmes & les affections oculaires (Shabalin and Shatokhina, 2007), le sérum & la leucémie (Yakhno et al., 2015) ou pour des recherches sur des biofluides (Annarelli et al., 2001; Bou Zeid and Brutin, 2013; Esmonde-White et al., 2014; Gorr et al., 2014; Lamcharfi et al., 1997).

3.3 La spectroscopie Raman

3.3.1 Principe de la diffusion Raman

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse vibrationnelle, non destructive, basée sur la diffusion inélastique de photons générés par un laser de longueur d'onde λ_0 en nm (ou de fréquence $\nu_0=10^6/\lambda_0$ en cm^{-1}) interagissant avec les molécules présentes dans l'échantillon. La quantité d'énergie perdue ou obtenue par un photon est caractéristique de la nature et de la structure spatiale de chaque liaison. Ainsi, le changement de longueur d'onde (décalage ou shift Raman = $10^6/\lambda_0-10^6/\lambda$) du photon dispersé fournit des informations chimiques et structurales, appelées signatures spectrales. Ces décalages, exprimés en unités de nombre d'onde (cm^{-1}), correspondent à l'énergie vibratoire des molécules (Bazin et al., 2009; Bossier et al., 2016; Nyman et al., 2011a). La majorité des photons incidents sont transmis, réfléchis ou absorbés et seule une infime partie est diffusée (Figure 1.27) :

- ➔ Diffusion Rayleigh (élastique) pour les photons diffusés à la même fréquence ν_0 que les photons incidents
- ➔ Diffusion Raman (inélastique) pour les photons gagnants ou perdants de l'énergie (1 photon sur 10^8 photons incidents) : si les photons sont diffusés à une fréquence $\nu_0-\nu$ inférieure aux photons incidents, alors l'énergie vibrationnelle de la molécule augmente, ce sont les raies Stokes. Dans le cas contraire, il s'agit de raies anti-Stokes, mais selon la loi de Boltzmann, ces dernières sont moins intenses et ne sont pas prises en compte.

Les spectromètres Raman permettent d'enregistrer le signal Raman-Stokes après élimination par un filtre de la diffusion Rayleigh, beaucoup plus intense que la diffusion Raman et de même longueur d'onde que l'excitatrice et de la diffusion Raman anti-Stokes.

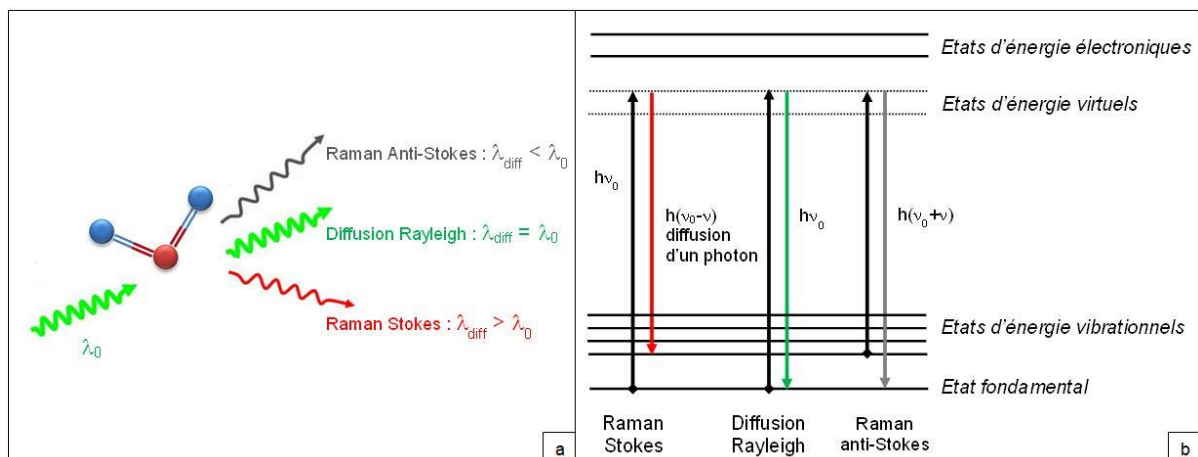


Figure 1.27 | Principe de la diffusion Raman (raies Stokes)
 (a) Diffusion de la lumière par une molécule ; (b) Diagramme énergétique de Jablonski.

Toutes les vibrations moléculaires ne sont pas visibles en spectroscopie Raman, selon la symétrie des molécules. Cependant, les résultats obtenus sont suffisants pour identifier les différentes molécules composant un échantillon et l'intensité des pics Raman peut être utilisée pour quantifier leur concentration relative (Bazin et al., 2009; Bosser et al., 2016; Nyman et al., 2011a). La Figure 1.28 illustre les informations que la spectroscopie Raman peut fournir :

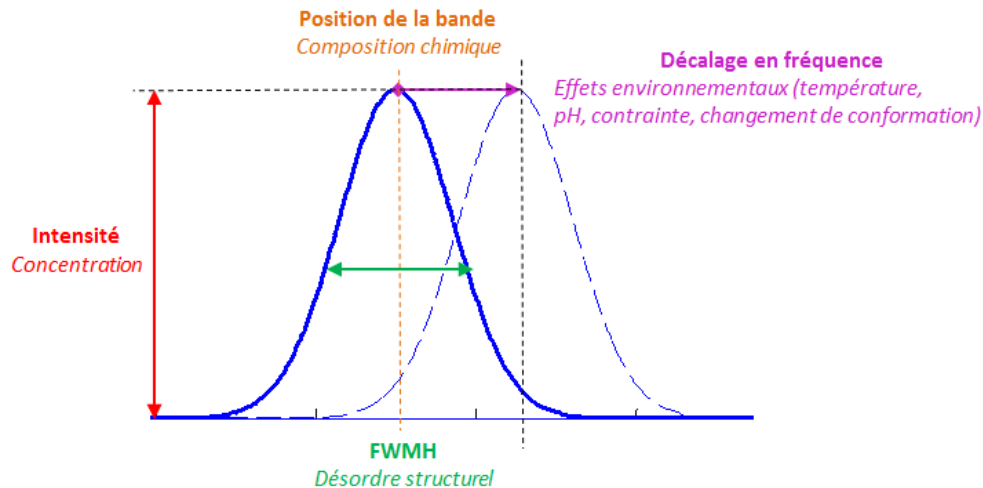


Figure 1.28 | Spectre Raman : signature des molécules et liaisons présentes dans l'échantillon
 i) Les positions des bandes sont caractéristiques de la composition chimique ;
 ii) Les décalages en fréquence sont liés à la structure des molécules et leur environnement.
 iii) L'intensité correspond principalement à la concentration des molécules.
 iv) La largeur à mi-hauteur (FWMH) reflète la structure cristalline des molécules.

La spectroscopie Raman présente de nombreux avantages par rapport à d'autres techniques de spectroscopie, notamment par rapport à la spectroscopie infra-rouge (Bossier et al., 2016; Buchwald et al., 2012; Kazanci et al., 2007) :

- ➔ Elle présente l'avantage d'analyser la composition globale d'un échantillon biologique sans avoir à cibler une espèce ou un composé chimique spécifique (Sikirzhytski et al., 2010).
- ➔ Elle ne nécessite pas de recourir à une étape de préparation d'échantillons souvent fastidieuse et source d'artéfacts.
- ➔ Elle est relativement insensible à l'eau ce qui permet des mesures sur des échantillons hydratés (échantillons biologiques en particulier).
- ➔ Elle est une méthode non destructive aussi le même échantillon peut être analysé successivement par différentes techniques.
- ➔ Elle offre une résolution spatiale à échelle du micron (0.6–1 μm).
- ➔ Implémentée dans un microscope confocal, elle permet des acquisitions en profondeur.

Cependant, la spectroscopie Raman présente également principalement deux inconvénients : i) dans les échantillons biologiques, la fluorescence liée aux composants organiques peut limiter voire même

complètement masquer le faible signal Raman (Yang et al., 2013) en fonction de la longueur d'onde utilisée ; ii) la technique Raman n'est pas quantitative, et l'intensité du signal dépend de l'efficacité de diffusion Raman, de la puissance laser, des composants optiques dans le système Raman, des caractéristiques de l'échantillon (irrégularités, granulométrie, degré de polissage, indice de réfraction de la surface) et des variations de distance entre l'objectif et l'échantillon (Mandair and Morris, 2015; Morris and Mandair, 2011). En conséquence, les ratios d'intensité de pics de Raman sont généralement utilisés plutôt que les intensités elles-mêmes pour exploiter les spectres (Nyman et al., 2011a).

3.3.2 Les modes vibrationnels des molécules

Dans une molécule, les atomes sont liés entre eux par l'intermédiaire des liaisons (covalente, ionique, Van der Waals...) (Petsko et al., 2008). L'état fondamental de la molécule (état de stabilité maximale) correspond à l'état d'équilibre. Quand un facteur extérieur (un photon par exemple) vient solliciter la molécule, les atomes vont vibrer périodiquement autour de cette position d'équilibre. Ces vibrations vont dépendre de la géométrie de la molécule, des atomes qui la composent et de la nature des liaisons entre eux. La spectroscopie vibrationnelle est ainsi basée sur la caractérisation de ces vibrations qui permet d'extraire des informations sur la composition atomique et la structure de la molécule.

Une molécule poly-atomique constituée de N atomes possède $3N-6$ combinaisons de modes de vibrations. Ces modes : i) sont indépendants c'est-à-dire que l'excitation de l'un quelconque de ces modes ne stimule pas le mouvement d'un autre mode ; ii) n'affectent ni le centre de gravité ni l'orientation de la molécule. Bien que les modes soient des mouvements collectifs de tous les atomes, entraînant des vibrations simultanées des différentes parties de la molécule, on identifie néanmoins, à l'échelle de la molécule, la vibration comme étant principalement une vibration d'élongation (*stretching*) ou une vibration de déformation (*bending*) (Shriver and Atkins, 2001) comme illustré Figure 1.29 :

- ➔ **Elongation (stretching)** : De symbole ν , ce mode concerne la vibration de la molécule le long de l'axe des liaisons. Ce mouvement implique une variation de la distance interatomique. Il peut être : i) symétrique (ν_s) : vibration avec conservation de la symétrie moléculaire ou ii)

asymétrique (ν_{as}) : vibration avec une perte d'un ou plusieurs éléments de symétrie de la molécule ce qui exige plus d'énergie : $\nu_{as} > \nu_s$

➔ **Déformation (bending)** : Lors de vibrations, l'angle des liaisons peut varier : il y a flexion ou déformation et est associé au symbole δ . Lors de ce mouvement, la distance interatomique reste constante. Ces déformations peuvent avoir lieu dans le plan des deux liaisons concernées ou hors du plan.

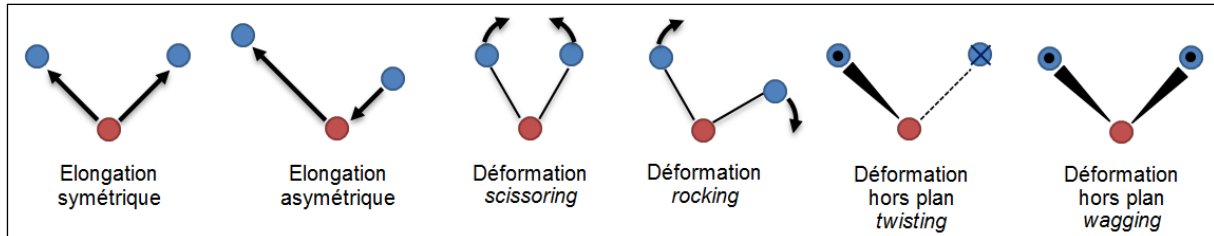


Figure 1.29 | Les différents modes de vibration moléculaires observables en Raman d'après (Shriver and Atkins, 2001).

Les vibrations de déformation sont d'intensité plus faible que les vibrations d'élongation et sont plus sensibles à l'environnement car elles ont besoin d'un espace plus important pour se produire et risquent donc d'être entravées par les atomes voisins.

3.3.3 Cas des protéines

Les protéines sont des macromolécules formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, constituées de l'enchaînement d'acides aminés (il en existe 22 sortes) liés entre eux par des liaisons peptidiques qui s'établissent entre le carboxyle $-\text{COOH}$ d'un premier acide aminé et l'amine primaire $-\text{NH}_2$ d'un second comme illustré Figure 1.30.

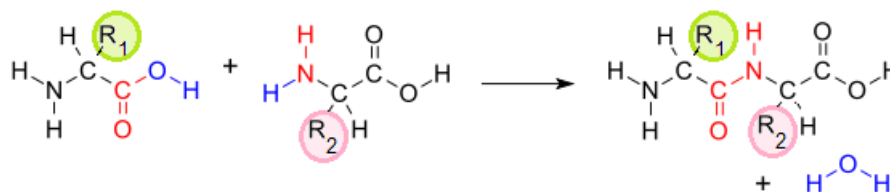


Figure 1.30 | Formation d'une liaison peptidique (en rouge) entre deux acides aminés, avec élimination d'une molécule d'eau (en bleu) par liaison des terminaisons carboxyle $-\text{COOH}$ et amine $-\text{NH}_2$. Les chaînes latérales sont représentées par les résidus R_n en vert et rose ; d'après (Petsko et al., 2008).

On parle de squelette des protéines pour représenter la partie répétée de façon régulière constituée du groupement amine $-\text{N}-\text{H}$, du carbone alpha $-\text{C}_\alpha-\text{H}$ et du groupement carboxyle $-\text{C}=\text{O}$. La chaîne latérale (identifiée résidu R_n) est la partie qui dépasse du squelette auquel elle est liée par le carbone alpha C_α . C'est la succession de ces différentes chaînes et la structure en trois dimensions résultante qui donnent à la protéine ses propriétés et fonctions propres (Petsko et al., 2008) (Figure 1.31).

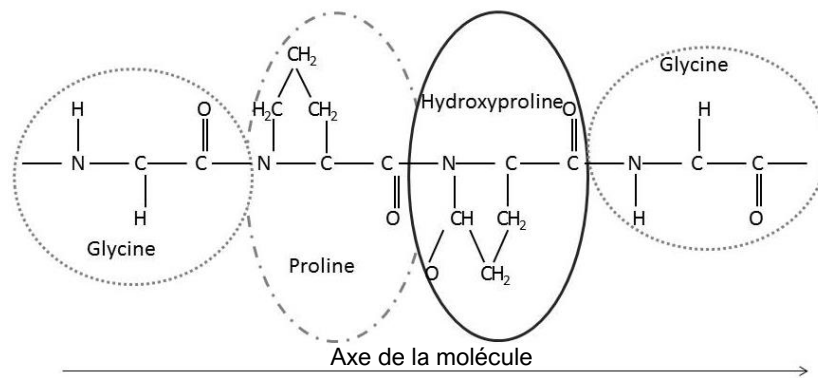


Figure 1.31 | Exemple de protéine, le collagène
 Structure du motif répété de la molécule de collagène : i) les liaisons C=O bonds sont perpendiculaires à l'axe de la molécule ; ii) les liaisons C-N bonds sont à la fois parallèles et perpendiculaires à l'axe de la molécule (Bossler et al., 2016).

Les conformations tridimensionnelles sont classées selon quatre niveaux, de l'échelle atomique à la macromolécule entière (Petsko et al., 2008) :

- ➔ La structure primaire correspond à la séquence en acides aminés.
- ➔ La structure secondaire décrit les conformations du squelette dont les formes les plus classiques sont les hélices α ou les feuilletts β .
- ➔ La structure tertiaire correspond à la forme générale dans l'espace de la protéine à l'échelle de la molécule toute entière. Elle décrit le repliement de la protéine lié aux interactions entre les différents éléments de la structure secondaire.
- ➔ La structure quaternaire décrit le complexe résultant de l'assemblage de plusieurs molécules de protéines. Cela ne concerne pas toutes les protéines.

Il existe de nombreuses études sur l'utilisation de la spectroscopie Raman pour l'analyse structurale des protéines (une recherche dans Scopus avec les mots clés « Raman protein structure » donne plus de 5000 résultats). Les signatures spectrales Raman renseignent en effet sur (Rygula et al., 2013) :

- ➔ La structure primaire par l'identification des acides aminés la composant : par exemple, le doublet de la tyrosine à $\sim 830 \text{ cm}^{-1}$ et 860 cm^{-1} .
- ➔ Le squelette des protéines par les liaisons Amide : amide I ($\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$), essentiellement liée à la vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$, amide II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) et amide III ($\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$), tous deux associés aux vibrations $\nu(\text{C}-\text{N})$ et $\delta(\text{N}-\text{H})$.

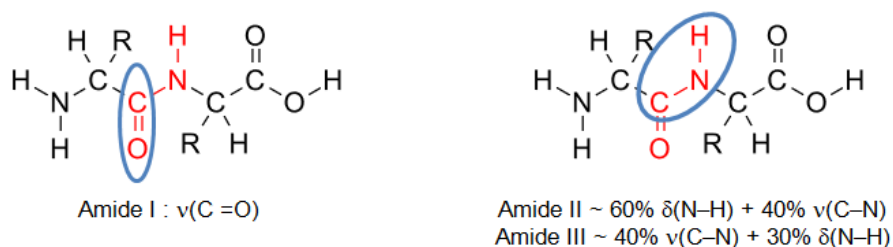


Figure 1.32 | Les liaisons Amide en spectroscopie Raman.

- ➔ La structure secondaire par les bandes hélices α ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ et 1270 cm^{-1}) et feuillets β ($\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ et 1240 cm^{-1}) des liaisons Amide I et III respectivement.
- ➔ Les terminaisons méthyles par les bandes Raman associées à CH_2 et CH_3 .

3.3.4 Drop Deposition Raman Spectroscopy (DDRS)

La méthode dite “*Drop Coating Deposition Raman spectroscopy*” (DDRS or DCDR) est une technique récente de spectroscopie Raman appliquée à des gouttes séchées, qui offre de nombreux avantages (Filik and Stone, 2008; Ortiz et al., 2006; Zhang et al., 2004) :

- ➔ Des spectres parfaitement reproductibles peuvent être obtenus à partir de différents volumes (voire faibles volumes jusqu'à $3 \mu\text{l}$), concentrations (voire de faibles concentrations jusqu'à $1 \mu\text{M}$) et substrats.
- ➔ La conformation est conservée au cours du processus de séchage : les spectres de protéines à l'état liquide ou sous forme de gouttes séchées ne présentent pas de variations significatives.
- ➔ Les gouttes séchées restent stables dans le temps, les spectres ne présentent donc pas de variations significatives même plusieurs semaines après le dépôt.
- ➔ Elle n'est pas sensible aux conditions et n'induit pas de dommages thermiques ou photochimiques aux protéines.
- ➔ Comme expliqué dans le § 3.1, le processus de séchage crée une ségrégation des protéines du reste de la solution par leur migration vers la périphérie offrant deux avantages : i) amélioration du signal Raman liée à la concentration en périphérie ; ii) réduction de la fluorescence spectrale des impuretés. A ce titre, cette méthode est qualifiée de Raman non exalté par opposition aux techniques de spectroscopie Raman Exaltée de Surface (ou « *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* » SERS) qui exploitent les propriétés optiques de nanostructures métalliques (en or, ou en argent par exemple) sur lesquelles sont déposés les échantillons, entraînant une très forte augmentation de l'intensité Raman. Cette technique nécessite des substrats très spécifiques, coûteux, le plus souvent à usage unique et périssables dans le temps (Zhang et al., 2004).

Dernièrement, la DDRS a été utilisée pour caractériser des biomolécules de protéines (Dingari et al., 2012; Filik and Stone, 2007; Ortiz et al., 2006; Peters et al., 2016), notamment l'albumine (Dingari et al., 2012; Kopecký and Baumruk, 2006), les glycosaminoglycanes, comme l'acide hyaluronique (Mainreck et al., 2011), les lipides (Kočiřová et al., 2012, 2013), qui sont les principaux constituants du LS, ainsi que d'autres biofluides comme le sang et le sérum (Esmonde-White et al., 2014; Taleb et al.,

2013; Virkler and Lednev, 2010), les larmes (Filik and Stone, 2008), les milieux de culture (Huang et al., 2013).

Conclusion du chapitre

Ce premier chapitre a permis de souligner le rôle essentiel du LS au sein de l'articulation et les fortes relations existant entre sa composition biochimique et l'état général de l'articulation. Ce chapitre a également montré la difficulté à diagnostiquer précocement l'arthrose et à la traiter, les thérapies actuelles consistant principalement à soulager les symptômes. 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. Aujourd'hui, l'intérêt majeur dans le domaine de la recherche biomédicale sur l'arthrose est l'identification de biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de la pathologie.

La spectroscopie Raman a déjà été utilisée de nombreuses fois pour l'étude de tissus articulaires comme le cartilage et l'os sous-chondral, sains et arthrosiques (Dehring et al., 2006a; Esmonde-White, 2014; Kumar et al., 2015a; Lim et al., 2011; Nyman et al., 2011a; de Souza et al., 2014; Vardaki, 2013), mais aussi pour l'étude de certains composants spécifiques comme les glycosaminoglycanes (Bansil et al., 1978; Ellis et al., 2009; Gamsjaeger et al., 2014; Mainreck et al., 2011; Pudlas et al., 2013), le collagène (Dehring et al., 2006b; Karampas et al., 2013) ou encore pour l'étude d'éléments cellulaires comme les chondrocytes (Kumar et al., 2015b; Pudlas et al., 2013).

La DDRS a été appliquée par Esmonde-White *et al.* pour corrélérer les modifications chimiques du LS aux grades radiographiques de patients arthrosiques (Esmonde-White et al., 2008a, 2009a, 2009b). Cette étude portait sur les LS du genou de patients arthrosiques classés en deux groupes : un groupe de faibles scores KL 0/1 et un groupe de forts scores KL 2/4. De faibles volumes de LS, 2 à 10 μ l, avaient été déposés sur des lames en verre. Des analyses des gouttes séchées s'étaient focalisées sur la recherche de différences morphologiques globales. Les analyses spectrales ont été réalisées par la comparaison des ratios d'intensité de bandes Raman, mettant en évidence des bandes Raman sensibles aux dommages causés par l'OA.

Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune référence de signature spectrale Raman de LS sain, ni d'étude sur le suivi longitudinal de la signature spectrale du LS dans le temps, ce qui limite la compréhension du processus pathologique.

Cette thèse présente pour la première fois une étude réalisée sur des LS sains et arthrosiques d'animaux et humains, portant à la fois sur l'examen structurel et morphologique de gouttes séchées puis sur leur caractérisation par DDRS, et attestant de la fiabilité et du potentiel discriminatoire de cette technique combinée pour surveiller la composition du LS et diagnostiquer l'arthrose, dans un but de phénotypage et de pronostic de la maladie. Ainsi, les chapitres suivants vont successivement détailler le protocole de caractérisation du LS que nous avons mis au point au cours de cette thèse puis son application à un modèle spontané canin, un modèle induit lagomorphe et une application à l'homme dans un cadre clinique.

Chapitre 2

PROTOCOLE DE CARACTERISATION DU LIQUIDE SYNOVIAL

Introduction du chapitre

Le chapitre bibliographique (Chapitre 1) nous a montré que l'arthrose provoque des dégradations articulaires globales liées à la modification physico-chimique et des propriétés mécaniques du liquide synovial. La recherche de biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de la pathologie nous a conduit à établir un protocole de caractérisation du liquide synovial permettant l'identification des changements occasionnés par le processus arthrosique.

Ce chapitre a pour objectif de présenter les matériels et méthodes d'acquisition, de post-traitement et d'analyses développés pour la caractérisation du liquide synovial. Le protocole détaillé ici a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet n°1661956 « Procédé de détection des maladies articulaires », le 05/12/16, dont les étapes sont les suivantes : i) dépôt de gouttes de faible volume de LS sur des lames de verre, ii) analyse tribologique consistant en la mesure de la surface de la goutte séchée par imagerie 2D et du profil périphérique, notamment de la hauteur du bourrelet par interférométrie 3D, iii) analyse physico-chimique par mesure au microscope confocal Raman de la signature spectrale de la périphérie de la goutte séchée. Ce protocole a ensuite été utilisé de manière identique sur les différents modèles d'arthrose qui seront explicités dans les chapitres suivants.

La finalité de cette étude est la mise au point d'une technique mini-invasive pour l'optimisation d'un biomarqueur spécifique de l'état arthrosique du liquide synovial pour le diagnostic clinique, le pronostic d'évolution de la maladie et le suivi des maladies articulaires. L'objectif, à terme, est de participer à la décision thérapeutique au chevet du patient, dans le cadre de la médecine personnalisée.

1. Protocole expérimental

Le protocole de caractérisation suivi dans cette étude a été standardisé de manière à ce que les résultats soient comparables quels que soient les échantillons testés.

Il consiste en cinq étapes successives détaillées ci-après (Figure 2.1) :

1. Prélèvement de LS.
2. Dépôt de gouttes de LS puis séchage à température ambiante.
3. Image optique 2D pour détermination des dimensions de la goutte séchée.
4. Image optique 3D par interférométrie pour caractérisation du profil topographique périphérique de l'épaisseur de la goutte séchée.
5. Spectroscopie Raman de la zone périphérique.

1.1 Le prélèvement de LS

Le prélèvement de LS peut-être réalisé par un rhumatologue ou un praticien hospitalier, clinique ou vétérinaire par une intervention conventionnelle d'arthrocentèse. L'arthrocentèse est une intervention mini invasive, pratiquée avec des aiguilles de 20G et des seringues de 5 ml. La ponction est pratiquée dans des conditions d'asepsie stricte, au travers de la capsule articulaire lors des interventions chirurgicales et au travers de la peau lors des visites de contrôle. Une attention particulière doit être portée lors du prélèvement pour éviter la contamination sanguine : un liquide hémorragique sera diffusément sanguin alors qu'un liquide clair avec des traînées sanguines indiquera une arthrocentèse traumatique (Brannan and Jerrard, 2006). Les prélèvements de LS sont ensuite conditionnés dans des tubes Eppendorf® (airtight), sans additifs, fermés hermétiquement et correctement étiquetés (date, site de ponction, identification patients ou animaux).

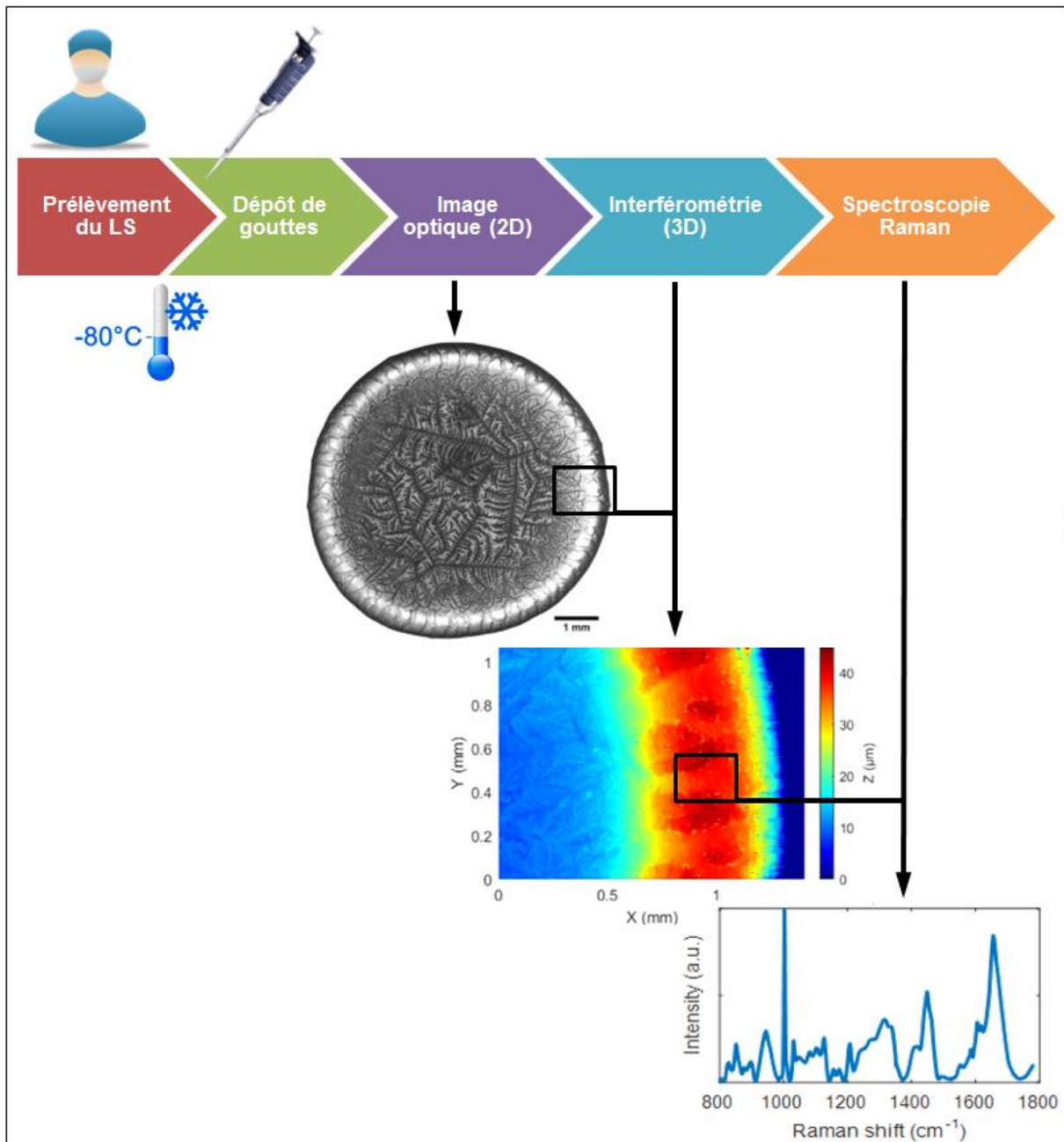


Figure 2.1 | Protocole de caractérisation tribologique et physico-chimique du LS.

1.2 Dépôt de goutte

La signature spectrale du LS et les modifications tribologiques et physico-chimiques du LS de patients ou animaux arthrosiques ont été réalisées à partir de la technique DDRS détaillée dans le Chapitre 1.

La préparation des échantillons en vue de la DDRS a été adaptée et optimisée à partir d'un protocole déjà utilisé pour du LS humain arthrosique (Esmonde-White et al., 2009a). Concrètement, après décongélation à température ambiante, l'aspect macroscopique (couleur, transparence, turbidité) du

LS est noté, notamment sur les cas arthrosiques, pour vérifier la présence de sang, puis les dépôts éventuels sont homogénéisés par un passage au vortex. Un volume de 150 μl (ou la totalité du LS s'il y en a peu) est prélevé et versé dans des Eppendorfs[®] 500 μl pour centrifugation à 4°C, à une vitesse rpm de 3000 tr/mn (soit 1000 g) pendant 10 mn. Des gouttes de 12 μl de surnageant sont ensuite déposées sur des lames de verre préalablement dégraissées à l'alcool 70°, puis laissées sécher à température ambiante semi-couvertes pendant une journée (Figure 2.2).

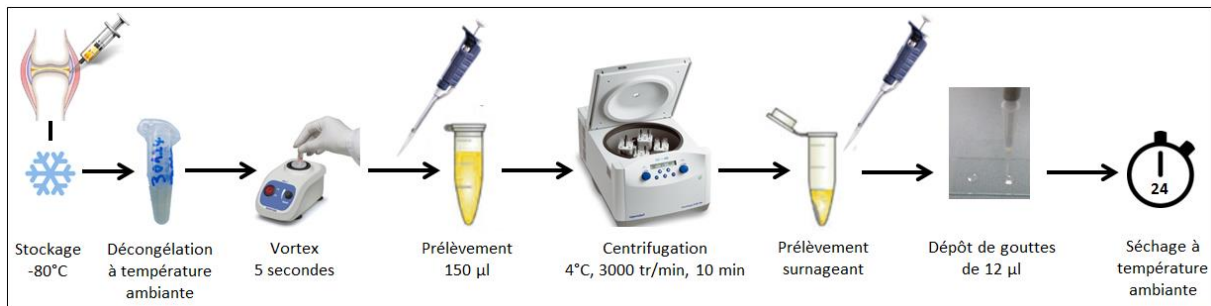


Figure 2.2 | Représentation schématique du protocole de dépôt de gouttes.

1.3 Analyses tribologiques

La tribologie est la science et la technologie du frottement, de l'usure et de la lubrification. Des techniques d'analyse tribologique sont déjà employées pour la caractérisation de fluides visqueux et lubrifiants (Chinas-Castillo and Spikes, 2000; Tadokoro and Nakano, 2012). Ces techniques ont ici été adaptées au LS, lui-même visqueux et lubrifiant, pour estimer les changements de viscosité et de contenu protéiques liés au processus arthrosique. Ces techniques n'avaient encore jamais été utilisées à notre connaissance dans un contexte de biofluide après dépôt de goutte.

1.3.1 Imagerie optique pour caractérisation bidimensionnelle (2D)

L'étalement de la goutte séchée se mesure simplement par les dimensions 2D de la goutte soit plus globalement de sa surface. Le LS étant déposé toujours selon le même protocole sur des substrats standards, l'étalement de la goutte est directement lié à la viscosité du LS elle-même dépendante de la concentration et du degré de polymérisation de l'acide hyaluronique. Comme détaillé au Chapitre 1, les modifications induites par le processus pathologique provoquent inévitablement une réduction de la viscosité du LS arthrosique (Brannan and Jerrard, 2006; Fam et al., 2007; Pascual and Jovaní,

2005). L'hypothèse formulée est donc que cette technique devrait permettre notamment de montrer que les gouttes de LS OA ont des dimensions plus grandes.

Pour cela, un microscope optique standard, équipé d'une caméra 2048 x 2048 pixels pilotée par le logiciel QCapture Pro (QImaging), a été utilisé pour photographier les gouttes séchées, avec un objectif 2,5X. Selon la taille des gouttes, plusieurs photos ont pu être nécessaires. Une lame micrométrique a permis d'étalonner les images.

ImageJ est un logiciel open source de traitement et d'analyse d'images développé par les National Institutes of Health. Il est écrit en Java et permet l'ajout de nouvelles fonctionnalités via des plugins et macros. ImageJ a ici été utilisé pour reconstruire des photos 2D grâce au plugin MosaicJ et une macro a été écrite pour traiter toutes les images : mise à l'échelle puis mesure de la surface de chaque goutte.

1.3.2 Interférométrie à lumière blanche pour la caractérisation du profil tridimensionnel (3D)

L'épaisseur périphérique de la goutte a été mesurée par interférométrie à lumière blanche, technique de topographie de surface couramment employée en tribologie. Le dépôt de goutte permettant la ségrégation des composants et leur concentration en périphérie, une plus grande quantité de molécules devraient donc induire une concentration en périphérie plus importante. L'OA modifie les propriétés de perméabilité sélective de la membrane synoviale, conduisant à l'entrée dans le LS arthrosique de protéines et autres composants sériques en plus grande quantité et de plus grands poids moléculaires. L'hypothèse émise ici est donc que cette technique devrait permettre de montrer que les gouttes de LS OA ont une hauteur périphérique plus importante.

L'interférométrie à lumière blanche (ou microscopie interférentielle) est une technique de topographie de surface non destructive, sans contact. Le principe est basé sur les différences de parcours de faisceaux lumineux, donc des déphasages de phase. En particulier, dans le cas de l'interféromètre de Michelson, un faisceau lumineux est divisé en deux par une lame semi-réfléchissante : un faisceau dirigé vers un miroir de référence (« *reference beam* ») dont le trajet optique est fonction de l'altitude Z monitorée précisément par un moteur piézoélectrique, et un faisceau dirigé vers l'échantillon à mesurer (« *probe beam* ») dont la longueur de trajet optique varie avec la modification de la hauteur

de surface de l'échantillon. Les faisceaux réfléchis par ces deux miroirs s'ajoutent grâce au miroir semi-réfléchissant et le faisceau résultant est mesuré par un photodétecteur (Figure 2.3a). Lorsque les deux demi-faisceaux arrivent en phase, l'intensité mesurée par le détecteur est maximale et lorsqu'ils sont en opposition de phase, elle est minimale (Charron, 2004). L'intensité mesurée présente donc une variation sinusoïdale qui est fonction des variations de la distance et de la longueur d'onde de la lumière (Figure 2.3b), ce qui se traduit par l'apparition de franges d'interférences lumineuses. Il existe deux modes de microscopie interférentielle (Stachowiak and Batchelor, 2004) :

- ➔ PSI pour Phase Shifting Interferometry : l'échantillon est placé au focus et le miroir de référence est ensuite positionné dans 3 positions successives (+/- 1 pas autour du focus). Cela engendre un décalage de phase entre les deux faisceaux. Les hauteurs de surface sont calculées à chaque point à partir des données de déphasage obtenues. Cette méthode est très rapide, offre une très grande résolution (inférieure à 1 nm) mais ne marche que si la surface est très lisse (rugosité $R_a < 1.5$ nm).
- ➔ VSI pour Vertical Scanning Interferometry : une méthode alternative pour déterminer la rugosité de surface implique l'utilisation de la lumière blanche et la localisation de l'amplitude maximale des intensités (contraste maximal de la frange) au lieu du déphasage. L'objectif de grossissement est déplacé verticalement à l'aide d'un actionneur piézoélectrique et les images sont enregistrées à différentes hauteurs au-dessus du point de focalisation sur la surface. L'intensité lumineuse maximale correspond à la hauteur relative de l'échantillon et à la longueur de l'optique équivalente pour les deux faisceaux (Figure 2.3c). Cette procédure est répétée pour chaque point sur une surface et une carte de surface 3D est ainsi obtenue. Cette méthode est rapide, offre une grande résolution (inférieure à 10 nm) et fonctionne sur les surfaces rugueuses avec de grandes pentes (rugosité $R_a < 400$ μ m).

Des topographies 3D ont ainsi été réalisées par interférométrie à lumière blanche (smartWLI-microscope, GBS mbH, Germany) en périphérie de chaque goutte (côté droit) en mode « vertical scanning interferometry » (VSI) avec un objectif de Michelson de grandissement 5X.

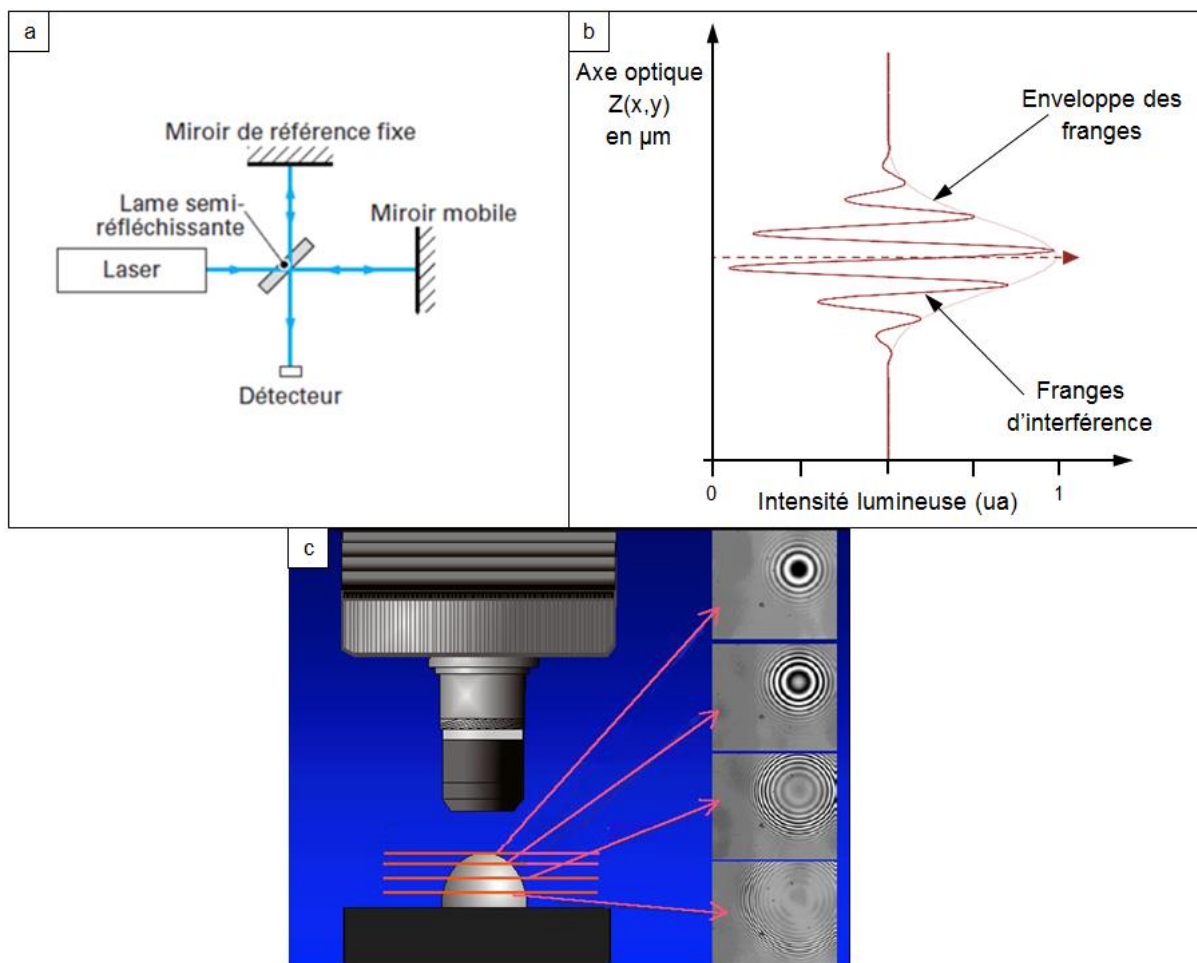


Figure 2.3 | Principe de l'interférométrie
 (a) Schéma de l'interféromètre de Michelson ;
 (b) Variations d'intensité lumineuses des franges d'interférence : au maximum d'intensité correspond le focus du pixel ;
 (c) Visualisation des franges d'interférence selon la position Z de l'échantillon ;
 (a) (Charron, 2004) ; (b), (c) d'après (Wyant, 2002).

Le logiciel d'analyse MountainsMap® (DigitalSurf, France) a permis la reconstruction des cartes topographiques de taille 1.4 mm x 1.07 mm et l'enregistrement des données associées (X, Y, Z). Des routines Matlab (The Mathworks, MA, USA, version R2016a) ont été développées pour calculer les profils d'épaisseur le long de chaque carte topographique.

1.4 DDRS

1.4.1 Acquisitions spectrales

Les acquisitions spectrales ont été réalisées sur le microscope confocal Raman de la plateforme IVTV (LabRAM HR800®, Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) (Figure 2.4)



Figure 2.4 | Microscope confocal Raman LabRam HR de la plateforme IVTV utilisé pour les acquisitions
Le microscope est équipé de trois sources laser 633 nm, 532 nm et 785 nm.

Quatre régions d'intérêt (ROI) ont été définies aux quatre points cardinaux (O, E, N, S) de chaque goutte avec un objectif 10X, de taille $20 \times 40 \mu\text{m}^2$, localisées dans la zone périphérique, là où la pré-concentration des solutés est maximum, (Figure 2.5). Dans chacune de ces ROI, six points ont été cartographiés, espacés chacun de $20 \mu\text{m}$. Chaque goutte est ainsi définie par 4×6 points, permettant de vérifier l'homogénéité intra et inter ROI.

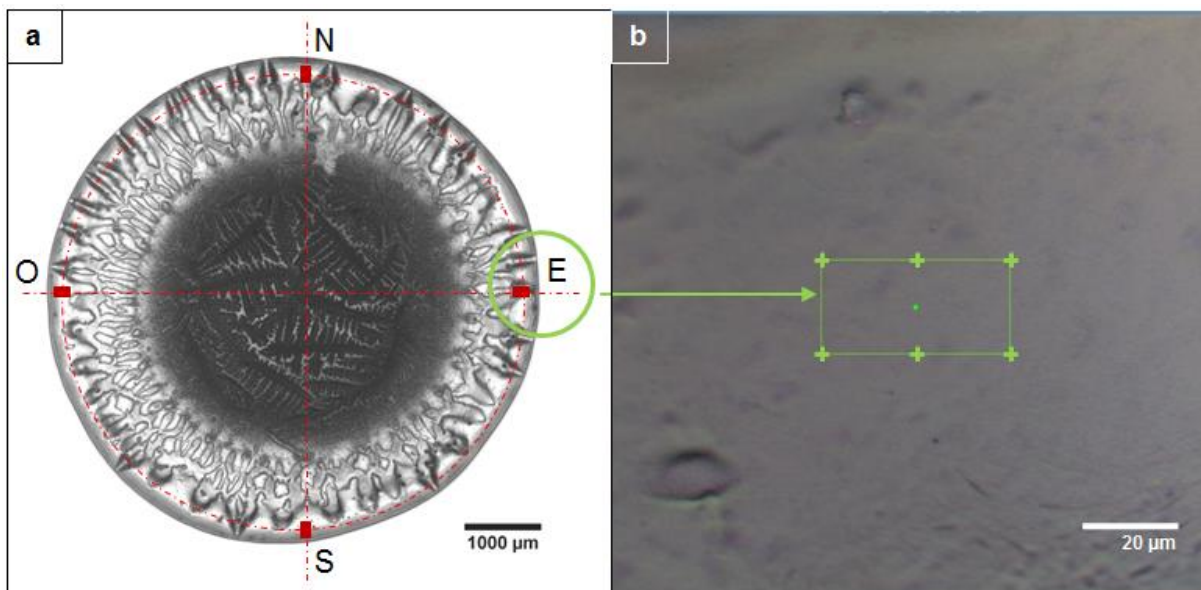


Figure 2.5 | Localisation des ROI
(a) Photographie optique d'une goutte de LS séchée : les rectangles rouges en périphérie correspondent aux quatre ROI (Région d'Intérêt). (b) Photographie prise au 50X montrant les 6 points composant la ROI (croix vertes) où les acquisitions ont été réalisées.

Les acquisitions spectrales ont été réalisées avec un objectif 50X, d'ouverture numérique 0.75. La diffusion Raman était mesurée par un détecteur CCD (1024x 256 pixels refroidi par effet Peltier à -70°C). La résolution spectrale est inférieure à 1 cm^{-1} grâce à l'utilisation d'un réseau 1800 traits/mm. La taille du trou confocal est ajustée à $200 \mu\text{m}$ pour une résolution axiale de $2 \mu\text{m}$. Les spectres ont été enregistrés avec le logiciel LabSpec6 (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France). Avant toute

acquisition, le système a été calibré en utilisant la raie à $520,7\text{ cm}^{-1}$ d'un échantillon de silicium de référence.

La longueur d'onde du laser à $632,8\text{ nm}$ (HeNe, puissance à l'échantillon de 12 mW) était celle qui donnait le meilleur compromis entre fluorescence (spectres difficilement exploitables avec une longueur d'onde de 532 nm) et temps d'acquisition (intensités mesurées faibles avec une longueur d'onde 785 nm) et donnant une taille de spot de $1\text{ }\mu\text{m}$.

Les acquisitions ont été réalisées sous forme de cartographies : acquisition de plusieurs points successivement. Avant l'acquisition des cartographies de chaque ROI, une cartographie axiale a été réalisée pour déterminer la position Z donnant le maximum d'intensité à 1002 cm^{-1} . Puis la cartographie des 6 points de chaque ROI a été mesurée dans la gamme spectrale de 800 à 1780 cm^{-1} , avec un temps d'acquisition de 30 s et 3 accumulations.

1.4.2 Assignements des bandes Raman

Un spectre type de LS est illustré Figure 2.6. Les bandes Raman qui le composent ont été identifiées et assignées à partir d'une étude bibliographique sur le LS, les protéines, les acides aminés, les glycosaminoglycanes, le sang et le sérum (Tableau 2.1).

Les bandes structurelles des protéines, comme les Amide III entre 1242 et 1275 cm^{-1} et les Amide I entre 1654 et 1670 cm^{-1} sont particulièrement reconnaissables, ainsi que les bandes des acides aminés comme la phénylalanine (mode « *breathing* » du cycle aromatique à 1002 cm^{-1}) et la tyrosine (doublet à 828 and 850 cm^{-1}). La teneur en protéine peut également être identifiée par les différents modes de CH_2 et CH_3 à 1317 cm^{-1} (mode « *twisting* »), 1339 cm^{-1} (mode « *wagging* ») et 1448 cm^{-1} (mode « *bending* »). La présence de l'acide hyaluronique (HA) est identifiable par la bande à 945 cm^{-1} et sa contribution dans la région 1020 - 1140 cm^{-1} (Esmonde-White et al., 2008a).

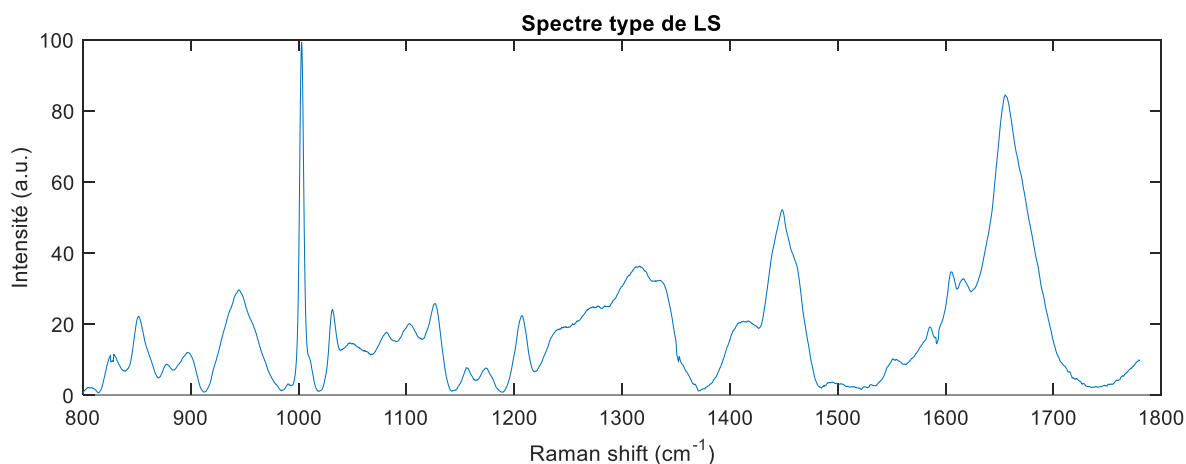


Figure 2.6 | Spectre Raman type obtenu sur du LS.

Raman shift ~ (cm ⁻¹)	Assignements	Acronyme
828	Tyrosine doublet	
852	Tyrosine doublet	Pr
880	δ (C-C) Tryptophane	
896	Acide hyaluronique	HA
945	Acide hyaluronique	HA
960	ν (PO ₄ ³⁻) du phosphate osseux	Ph
970	Fibrine du sang	Fi
1002	C-C cycle aromatique de la phénylalanine (« <i>breathing mode</i> »)	Pr
1031	δ (C-H) de la phénylalanine	Pr
1046	Acide hyaluronique	HA
1062	ν (OSO ₃) de la chondroïtine 6-sulfate	C6S
1081	ν (C-C) ou ν (C-O) ou ν (C-N) des protéines et lipides	Pr
1102	Acide hyaluronique	HA
1127	Acide hyaluronique	HA
1172	Tyrosine	Pr
1207	Tyrosine, phénylalanine	Pr
1242	ν (C-N), δ (N-H) de l'Amide III (« <i>β-sheet conformation</i> »)	Pr
1248	Fibrine du sang	
1275	ν (C-N), δ (N-H) of Amide III (« <i>α-helix conformation</i> »)	Pr
1317	CH ₂ CH ₃ « <i>twist mode</i> » des protéines	Pr
1339	Tryptophane, CH ₂ CH ₃ « <i>wag mode</i> » des protéines	Pr
1363	Hème du sang	
1448	δ CH ₂ , δ CH ₃ du collagène	Pr
1542	Hème du sang	
1550	ν (C-N), δ (N-H) de l'Amide II	
1554	Tryptophane	
1575	Fibrine du sang	
1586	Phénylalanine	
1605	Phénylalanine	
1615	Tyrosine	
1654	ν (C=O) de l' Amide I (« <i>α-helix conformation</i> »)	Pr
1670	ν (C=O) de l' Amide I (« <i>β-sheet conformation</i> »)	Pr

Tableau 2.1 | Bandes Raman des gouttes séchées de LS.

Les assignements ont été réalisés à partir de la bibliographie sur le LS, les protéines, les acides aminés, l'HA, le sang et le sérum (Alkrad et al., 2003; Bansil et al., 1978; Dingari et al., 2012; Ellis et al., 2009; Esmonde-White et al., 2008a; Mandair et al., 2006; Rygula et al., 2013; Tuma, 2005; Virkler and Lednev, 2010; Wei et al., 2008).

Les acronymes notés dans le Tableau 2.1 permettent d'identifier plus facilement dans la suite de ce document les catégories à laquelle appartiennent les bandes : Pr protéine, HA acide hyaluronique, C6S chondroïtine sulfate, Fi fibrine, Ph phosphate minéral osseux

Bansil et al. ont montré que la bande la plus forte de la chondroïtine sulfate est celle du C6S visible à 1062 cm^{-1} (Bansil et al., 1978) et peut être un témoin de la dégradation du cartilage et/ou du ménisque. On peut aussi reconnaître, dans les spectres de LS arthrosiques, des bandes relatives aux produits de dégradations des autres tissus articulaires. Par exemple, la bande Raman associée au phosphate minéral ($\nu_1\text{PO}_4^{3-}$) à 960 cm^{-1} pourrait être le témoin de la dégradation du tissu osseux (Figure 2.7).

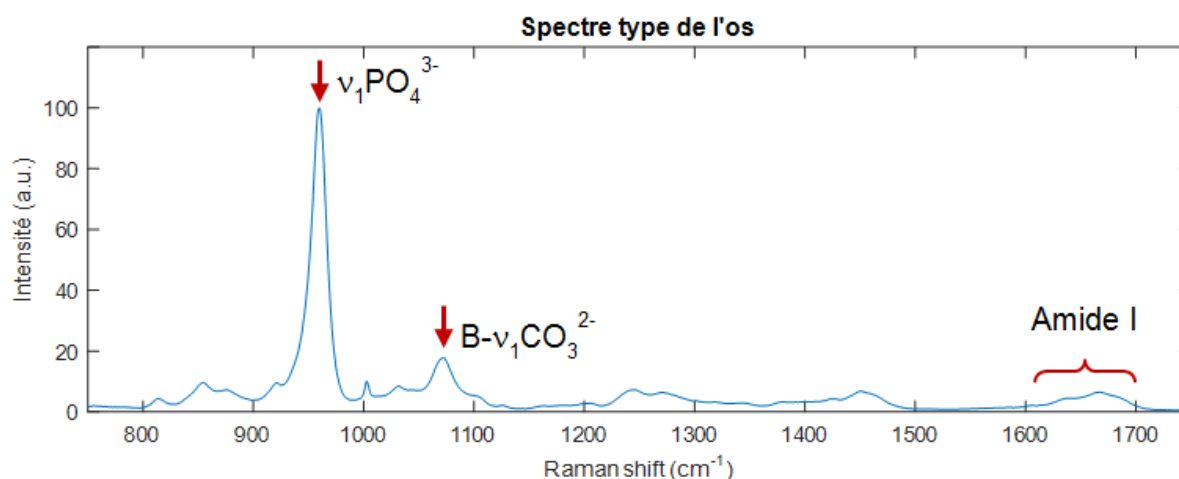


Figure 2.7 | Spectre Raman type de l'os
La bande associée au phosphate minéral à $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ est la plus forte.

1.4.3 Cas des glycosaminoglycanes

Pour vérifier la position des bandes Raman des glycosaminoglycanes, et plus particulièrement les bandes relatives à l'acide hyaluronique et à la chondroïtine sulfate, des produits commerciaux ont été testés.

L'acide hyaluronique

Deux viscosuppléments commerciaux avec HA de poids moléculaire et de structure différents ont été traités selon le même protocole que les échantillons de LS : de petites quantités de viscosuppléments HA ont été déposées de la même manière sur des lames de verre préalablement dégraissées à l'alcool 70° , puis laissées sécher à température ambiante semi-couvertes pendant une journée. Les caractéristiques des deux produits sélectionnés sont détaillées dans le Tableau 2.2.

Nom commercial	MW (MDa)	Source	Concentration (%)	Texture	Structure
Hyalgan®	0.7	Aviaire	1	Fluide	Linéaire
Synvisc-One®	6	Aviaire	2	Gel épais	Réticulé

Tableau 2.2 | Caractéristiques des deux viscopléments choisis.

Le poids moléculaire de l'acide hyaluronique d'un LS sain est de l'ordre de 6 à 7 MDa, ce qui est comparable au poids moléculaire du Synvisc-One, et chute aux environs de 1 à 4 MDa pour un LS OA (Fam et al., 2007; Praest et al., 1997), ce qui est du même ordre de grandeur que le poids moléculaire du Hyalgan.

Les spectres moyens normalisés de ces deux produits contenant des chaînes moléculaires de HA différentes ont permis de valider la signature spectrale de l'acide hyaluronique (Figure 2.8). Très peu de différences sont observables entre les spectres de HA bien que les poids moléculaires soient très différents. Ces tests ont également mis en évidence la difficulté de la spectroscopie Raman à détecter les changements moléculaires de l'acide hyaluronique.

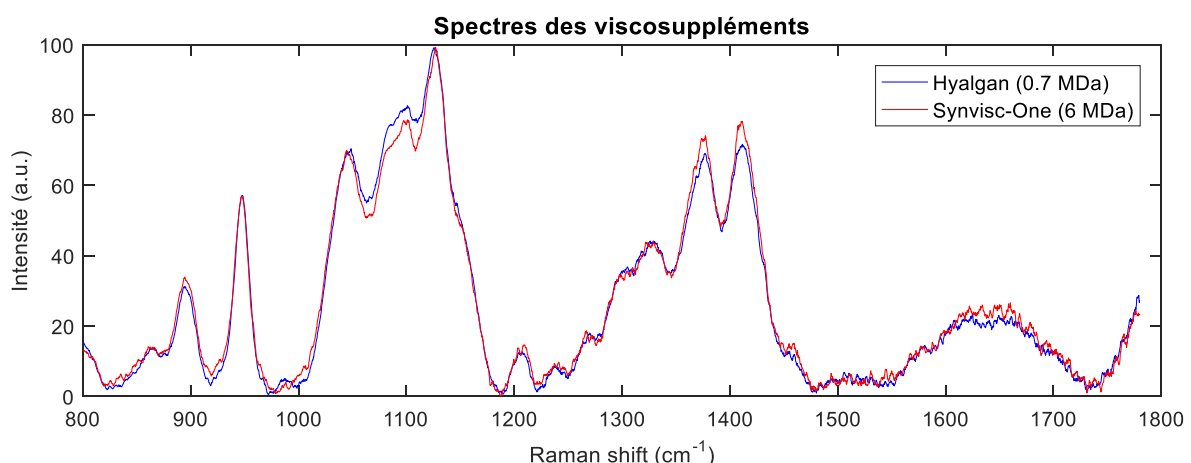


Figure 2.8 | Spectres moyens normalisés de gouttes séchées d'HA seul en bleu, Hyalgan® de poids moléculaire 0.7 MDa et en rouge, Synvisc-One® de poids moléculaire 6 MDa ; les différences observées sont très faibles et ne peuvent être distinguables dans les spectres de LS.

Les bandes Raman ont été identifiées et assignées à partir d'une étude bibliographique (Tableau 2.3).

Raman shift ~ (cm ⁻¹)	Assignments
896	$\nu(\text{C}_1\text{-H})$, β linkage
945	$\nu(\text{C-O-C})$
1047	$\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$
1100	$\delta(\text{C-OH})$
1126	$\delta(\text{C}_4\text{-OH})$, $\delta(\text{C}_4\text{-H})$
1379	$\delta(\text{C-H})$
1415	$\nu(\text{C-O-O})$

Tableau 2.3 | Principales bandes Raman de l'HA, assignées à partir de la littérature (Alkrad et al., 2003; Bansil et al., 1978; Mandair et al., 2006).

La chondroïtine sulfate

La chondroïtine sulfate a été achetée chez Sigma-Aldrich (référence produit C4384). Ce produit, sous forme de poudre, issu de cartilage de requin, contient de la chondroïtine sulfatée en position 4 et 6. 100 mg de poudre a été dilué dans 1 ml d'eau pure milli-Q puis vortexé et laisser reposer une heure. Comme pour le LS, de petites quantités de cette préparation ont été déposées sur des lames préalablement dégraissées à l'alcool 70°, puis laissées sécher à température ambiante semi-couvertes pendant une journée.

Le spectre moyen normalisé (Figure 2.9) est conforme à ce qui a déjà été publié (Bansil et al., 1978; Ellis et al., 2009; Mainreck et al., 2011) et confirme que la bande à $\sim 1062 \text{ cm}^{-1}$ est prédominante.

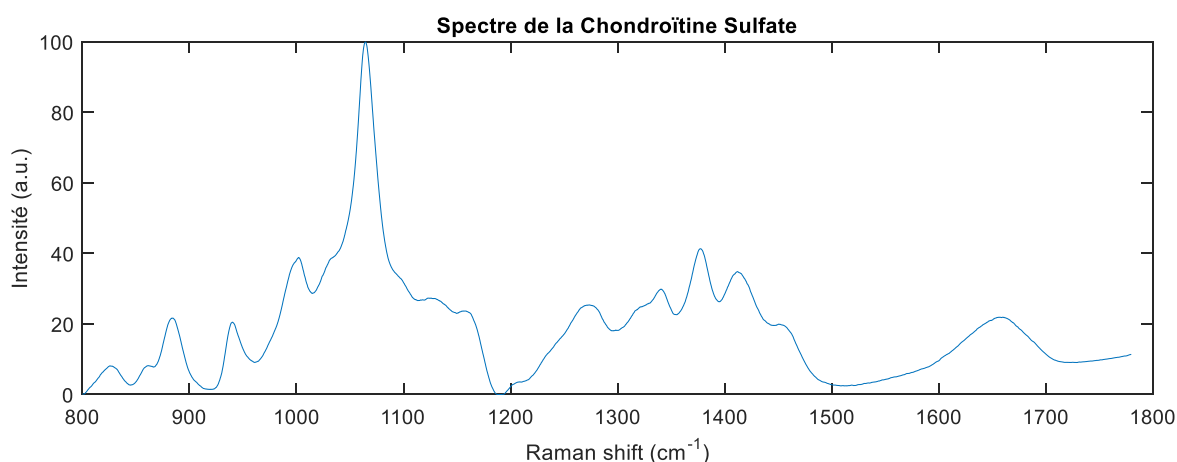


Figure 2.9 | Spectre moyen normalisé de gouttes séchées de chondroïtine sulfate.

Les bandes Raman ont été identifiées et assignées à partir d'une étude bibliographique (Tableau 2.4).

Raman shift ~ (cm ⁻¹)	Assignments
882	$\nu(\text{C}_1\text{-H})$
939	$\nu(\text{C-O-C})$
1064	$\nu(\text{OSO}_3^-)$
1341	$\delta(\text{CH}_2)$
1377	$\delta(\text{CH}_3)$
1412	$\nu(\text{C-O-O})$

Tableau 2.4 | Principales bandes Raman de la CS, assignées à partir de la littérature (Bansil et al., 1978; Ellis et al., 2009).

Il faut cependant noter que la concentration de la chondroïtine sulfate dans le LS, principalement liée à la dégradation des tissus articulaires, est de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/ml}$ (Brown et al., 2007; Uesaka et al., 2001; Yamada et al., 1999), très inférieure à la concentration testée ici 100 mg/ml. Cela explique que bien que la bande à 1062 cm^{-1} soit nettement visible ci-dessus, elle est juste perceptible sur les spectres de LS.

2. Protocole de traitement des données

2.1 Analyses spectrales

Tous les spectres présentaient un fort rapport signal sur bruit. Tous ont été traités dans Matlab (The Mathworks, MA, USA, version R2016a) selon un protocole identique. Au cours de cette thèse, des routines utilisateurs ont été développées. Les étapes successives sont :

- ➔ Le lissage des spectres en utilisant une méthode simple de moyenne glissante sur 9 points qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit sans induire de perte d'information spectrale.
- ➔ La suppression de la ligne de base liée à la fluorescence, la diffraction ou aberration chromatique par une fonction basée sur la méthode développée par Lieber et Mahadevan-Jansen consistant en une soustraction itérative d'un polynôme (Lieber and Mahadevan-Jansen, 2003).
- ➔ La normalisation des spectres pour s'affranchir, comme expliqué dans le chapitre 1, des différences d'intensité relatives liées aux variations de l'efficacité de diffusion Raman, de la puissance laser, des composants optiques dans le système Raman, des caractéristiques de l'échantillon (irrégularités, granulométrie, degré de polissage, indice de réfraction de la surface) et de la distance entre l'objectif et l'échantillon. Cette normalisation permet une comparaison des signatures spectrales et est réalisée de deux façons différentes :
 - ✓ Normalisation sur le maximum, en ramenant à une valeur arbitraire de 100 la bande Raman à 1002 cm^{-1} de la phénylalanine (dite respiration du cycle, ou *ring breathing band*), cette bande n'étant pas sensible au changement de conformation des protéines (Esmonde-White et al., 2009a).
 - ✓ Normalisation sur la somme, en ramenant l'aire sous la courbe à 1.
- ➔ Le spectre moyen de chaque goutte de LS est défini comme la moyenne des quatre spectres moyens des ROI, provenant des quatre points cardinaux de la goutte.
- ➔ La vérification de la répétabilité des mesures par comparaison des spectres normalisés sur la somme :

1. La répétabilité liée à la variabilité entre les six points de mesures au sein d'une même ROI est vérifiée par le calcul des écarts intra-zone. Un écart E_i est calculé, au sens des moindres carrés, le long du spectre de chaque point i par rapport au spectre moyen de la ROI auquel il appartient (Figure 2.10) :

$$E_i = \sqrt{\sum_{n \in v} (I_n - i_n)^2}$$

où v représente le nombre de points sur la courbe.

L'écart intra-zone est ensuite défini comme la moyenne de ces six écarts :

$$E_{intra-zone} = \frac{1}{6} \sum_{i=1 \rightarrow 6} E_i$$

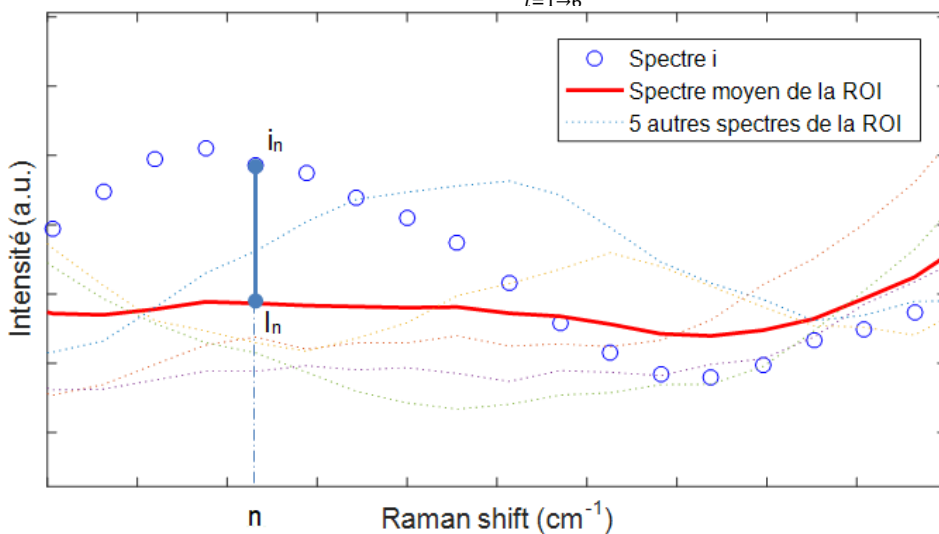


Figure 2.10 | Calcul des écarts intra- et inter-zones

Au point n , l'écart entre les intensités est calculé comme la racine carrée de la somme des écarts entre le spectre i et le spectre moyen de la zone à laquelle il appartient au carré.

2. La répétabilité liée à la variabilité entre les quatre points cardinaux au sein de la goutte est vérifiée par le calcul des écarts inter-zone. Comme précédemment, un écart E_i est calculé, au sens des moindres carrés, le long du spectre de chaque ROI i par rapport au spectre moyen de la goutte auquel il appartient :

$$E_i = \sqrt{\sum_{n \in v} (I_n - i_n)^2}$$

L'écart inter zone est ensuite défini comme la moyenne de ces quatre écarts :

$$E_{inter-zone} = \frac{1}{4} \sum_{i=1 \rightarrow 6} E_i$$

- ➔ La recherche des bandes, appelé « *fitting* », est réalisée par une routine Matlab basée sur les fonctions Gauss et Lorentz et permet de déterminer dans des bandes spécifiquement choisies :

- ✓ Les amplitudes des bandes
- ✓ Les positions des bandes (cm⁻¹)
- ✓ Les largeurs à mi-hauteur (cm⁻¹)

La recherche se fait automatiquement à partir de modèles de Gauss, Lorentz et Gauss-Lorentz, par optimisation du R² (méthode des moindres carrés), dont les fonctions sont :

$$\text{Gauss : } G(x) = \text{Amp} \cdot e^{-4 \ln 2 \left(\frac{x-p}{\omega} \right)^2},$$

$$\text{Lorentz : } L(x) = \frac{\text{Amp}}{1 + \left(\frac{x-p}{\omega/2} \right)^2}$$

$$\text{Gauss-Lorentz : } GL(x) = \alpha \cdot G(x) + (1-\alpha) \cdot L(x)$$

Où :

Amp est l'amplitude du pic
p est la position du pic (cm⁻¹)
 ω est la largeur à mi-hauteur du pic (FWHM) (cm⁻¹)
 α est la contribution gaussienne

La Figure 2.11 illustre les différences entre les fonctions :

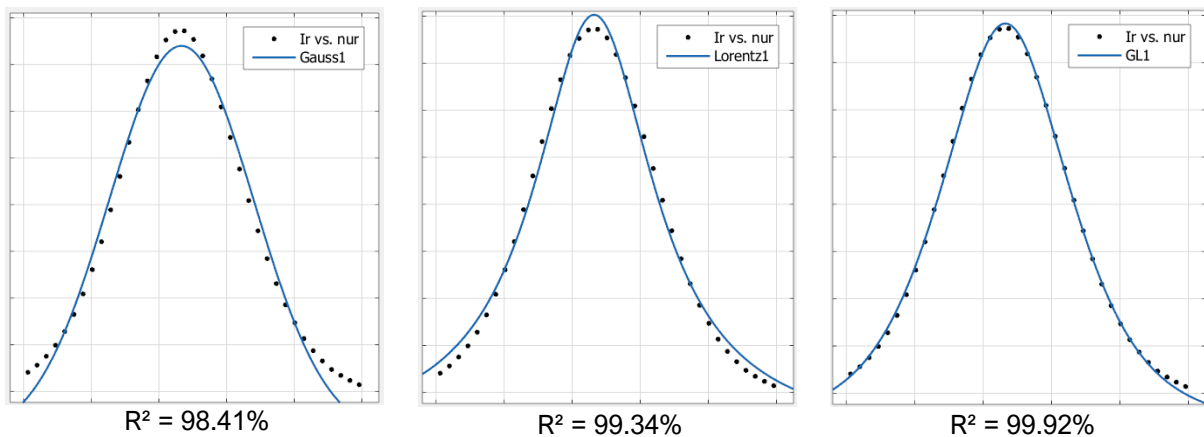


Figure 2.11 | Exemple de « fitting » d'une bande selon les trois fonctions
Dans ce cas, la meilleure optimisation est obtenue avec le modèle Gauss-Lorentz.

→ Classiquement en spectroscopie Raman, les ratios d'intensités (d'amplitude) de bandes sont utilisés plutôt que les intensités elles-mêmes pour détecter les différences entre échantillons (Nyman et al., 2011b), les ratios associés aux pics « *fittés* » ont donc été calculés pour chacun des quatre spectres moyens (Figure 2.12).

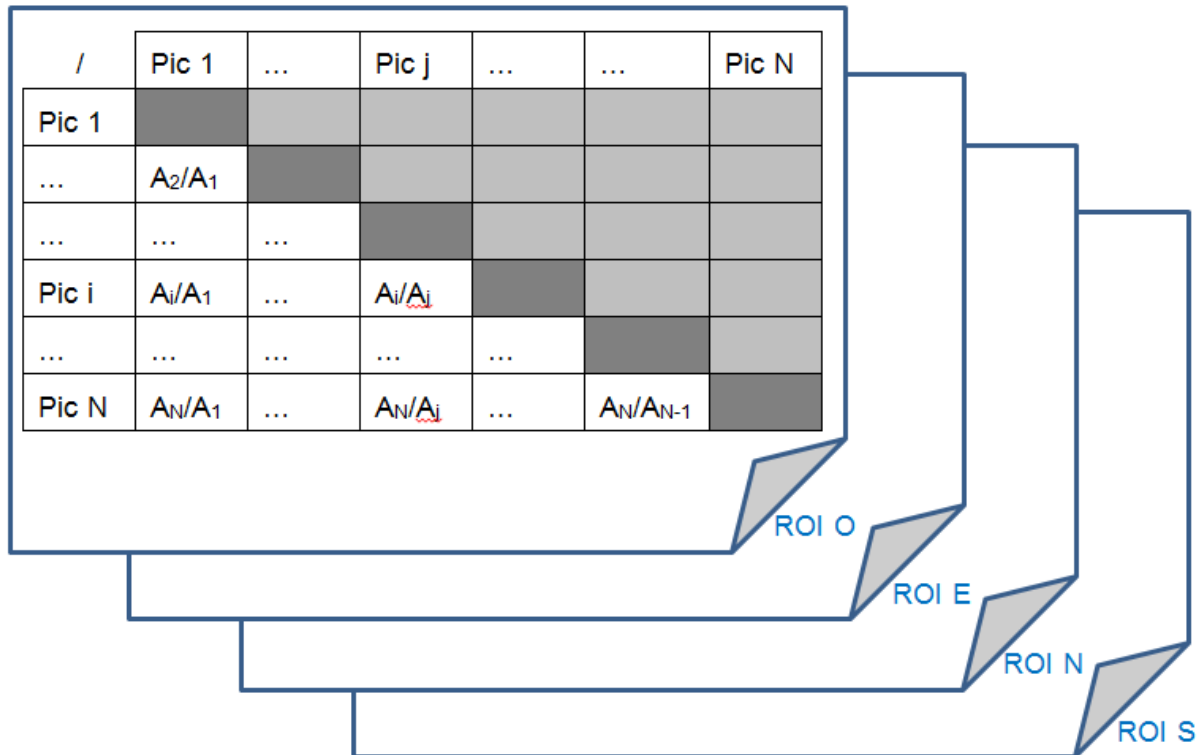


Figure 2.12 | Matrices des ratios d'amplitudes (A_i) des pics « *fittés* » sur les spectres moyens des quatre ROI.

Puis la matrice moyenne des quatre matrices des ratios calculées sur les spectres moyens des ROI a été pour représenter la goutte de LS.

Après avoir vérifié que les résultats étaient équivalents, seule la demi-matrice a été utilisée, considérant qu'il était inutile de calculer A_i/A_j et A_j/A_i . Ainsi, pour vingt-et-une bandes étudiées sur un spectre, il en résulte deux cent dix ratios exploités.

La Figure 2.13 récapitule sous la forme d'un organigramme les étapes successives du post-traitement réalisé dans Matlab pour chaque échantillon de LS ayant fait l'objet d'acquisition Raman.

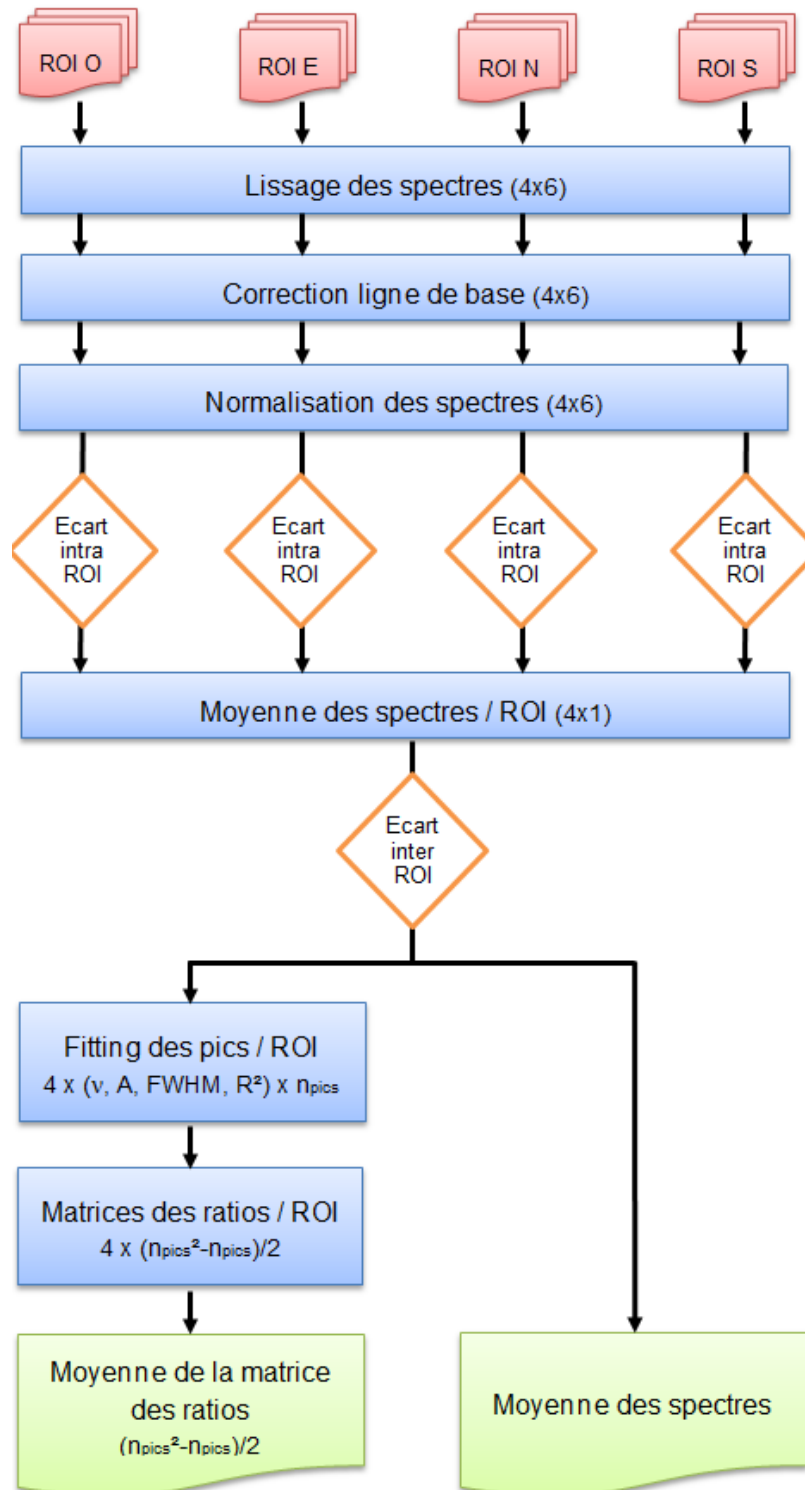


Figure 2.13 | Organigramme de post-traitement des spectres Raman pour chaque LS.

2.2 Analyse statistique des données

Tous les tests statistiques ont été réalisés dans Matlab avec les outils « Statistics and Machine Learning Toolbox ». Les analyses statistiques ont consisté en des tests uni- et multi-variés.

2.2.1 Analyses uni-variées

Les données quantitatives issues des analyses tribologiques et physico-chimiques Raman ont été exprimées en moyenne \pm écart-type. Compte-tenu du nombre parfois limité des échantillons et des hypothèses de normalité des distributions et d'égalité des variances non vérifiées, ces données ont été comparées entre elles en utilisant des tests non paramétriques de Mann Whitney et Kruskal-Wallis en fonction du nombre de groupes indépendants pris en compte (Grosjean et al., 2011). Le seuil de significativité standard de 0,05 a été utilisé ($p < 0.05$).

Des tests de corrélation de Pearson ont été réalisés sur ces données quantitatives pour étudier les corrélations entre les caractéristiques tribologiques et physico-chimiques des gouttes. La grille de classement suivante sera utilisée dans cette étude, basée sur le coefficient de corrélation R^2 exprimé en % : inférieur à 35%, entre 35% et 50%, entre 50% et 70%, entre 70% et 85% et supérieur à 85% la corrélation sera considérée respectivement comme inexistante, modérée, bonne, forte, excellente.

2.2.2 Analyses multi-variées (chimométrie)

La chimométrie est l'application des outils mathématiques, en particulier statistiques, utilisés afin d'extraire de l'information pertinente et utile à partir de données physico-chimiques mesurées brutes. La chimométrie recouvre aujourd'hui l'ensemble des applications de la chimie, de la physique, de la biologie, de l'économie, de la sociologie, des méthodes statistiques et de l'informatique. Cela comprend notamment les méthodes multivariées d'analyse de données.

En spectroscopie, la quantité d'informations contenues dans les ensembles de données est énorme — on parle alors de données hyperspectrales — en particulier dans le cas des échantillons chimiquement complexes tels que les tissus biologiques. Plusieurs groupes ont montré que les techniques chimométriques peuvent être appliquées avec succès aux données hyperspectrales pour extraire des informations pertinentes (Bonifacio et al., 2015; Muehlethaler et al., 2011; Rodrigues

Júnior et al., 2016; Taleb et al., 2013). Ces techniques permettent de différencier les données utiles et les variables aléatoires. Cette méthode est ainsi utilisée pour séparer le bruit de fond du signal généré par l'échantillon (Lasch, 2012).

Parmi ces méthodes, l'Analyse en Composante Principale (ACP) est une méthode statistique multivariée classiquement utilisée sur les données hyperspectrales pour réduire le grand nombre de variables contenu dans les spectres (Bispo et al., 2013). Cette technique est dite non supervisée, c'est-à-dire qu'elle fonctionne sans *a priori* sur l'appartenance de classes (Krafft et al., 2009). Elle s'applique à des données organisées en tableaux croisés, les lignes du tableau représentant les individus (les échantillons), les colonnes représentant les variables (les données quantitatives mesurées) (Figure 2.14).

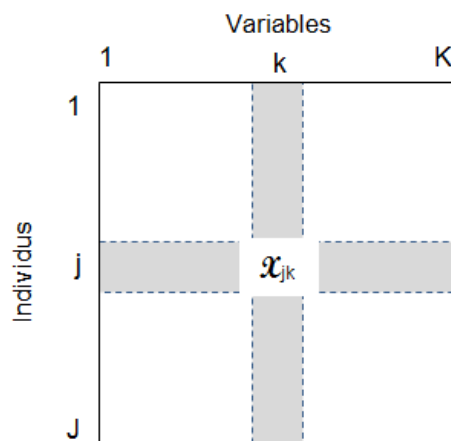


Figure 2.14 | Analyse en Composante Principale : Organisation des données
les données sont organisées en tableaux de valeurs : en ligne les J individus, en colonne les K variables.

Cette méthode a pour objectif d'analyser un grand jeu de données, sans *a priori*, et en particulier de rechercher (Escofier and Pagès, 2008) :

- ➔ les ressemblances (ou différences) entre les individus évaluées à partir de la distance qui les sépare, sachant que la distance d entre deux individus j et l est définie par :

$$d^2(j, l) = \sum_{1 \leq k \leq K} (x_{jk} - x_{lk})^2$$

- ➔ les liaisons (ou opposition) entre les variables évaluées à partir des coefficients de corrélation, sachant que le coefficient de corrélation r entre deux variables k et h est défini par :

$$r(k, h) = \frac{\text{covariance}(k, h)}{\sqrt{\text{variance}(k) \times \text{variance}(h)}} = \frac{1}{J} \sum_{1 \leq j \leq J} \left(\frac{x_{jk} - \bar{x}_k}{\sigma_k} \right) \left(\frac{x_{jh} - \bar{x}_h}{\sigma_h} \right)$$

Classiquement, en ACP, les données sont centrées réduites pour s'affranchir de l'arbitraires des unités de mesure, ce qui revient à remplacer chaque valeur x_{jk} par $\left(\frac{x_{jk}-\bar{x}_k}{\sigma_k}\right)$.

Un individu est caractérisé par K variables, aussi pour représenter le nuage des individus, il faudrait pouvoir tracer les points en K dimensions, ce qui n'est pas imaginable. L'intérêt de cette méthode est de réduire la dimension des données en créant un système de coordonnées alternatif. Les Composantes Principales (CPs) sont calculées comme étant un nouvel ensemble de variables décorrélées, combinaisons linéaires des variables initiales corrélées, orthogonales les unes aux autres et expliquant le maximum de variance possible entre les données (Figure 2.15a). Les diagrammes dits « scatter plots », permettent une visualisation aisée des résultats de l'ACP, chaque spectre étant représenté par un point dans le système d'axe des CPs et révèlent les relations existant entre les individus, comme le regroupement de données naturelles ou les valeurs aberrantes (Figure 2.15b) (Bispo et al., 2013; Pichardo-Molina et al., 2007).

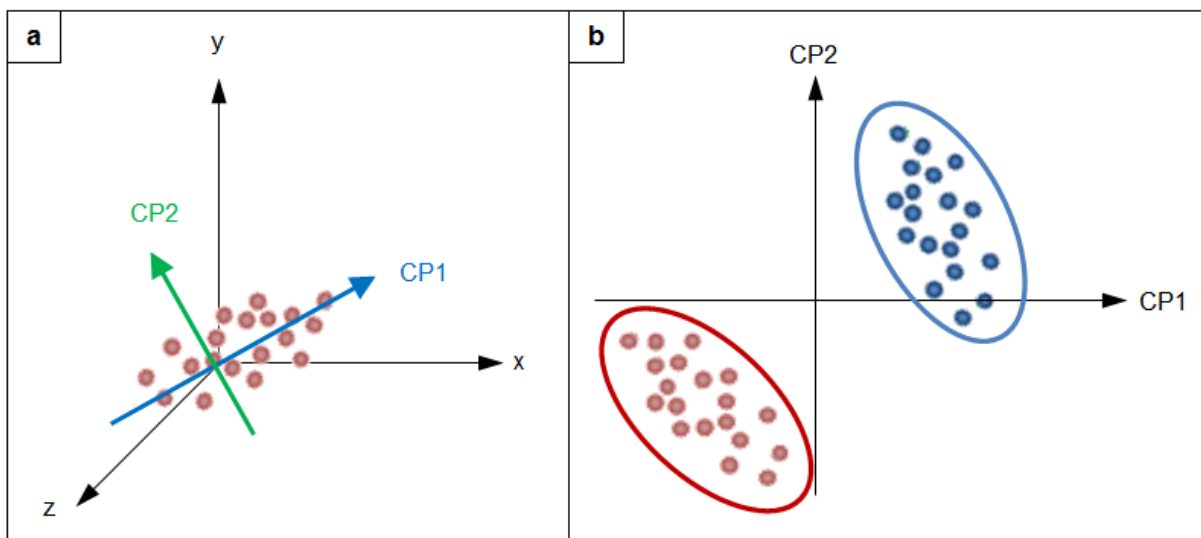


Figure 2.15 | Analyse en Composante Principale : Représentation des résultats
 (a) Nuage des individus avec représentation des deux premières Composantes Principales ;
 le centrage des données implique que le centre de gravité est confondu avec l'origine des axes ;
 (b) Visualisation des résultats sous forme graphique : dans l'exemple choisi, 2 populations d'individus sont
 clairement distinctes dans le système d'axe (CP1, CP2) représentant la plus grande variance des résultats.

Dans cette étude, l'ACP a été appliquée sur les ratios calculés à partir des spectres Raman pour visualiser les différentes populations d'échantillons.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre a permis de détailler l'ensemble du protocole mis en place au cours de cette thèse pour les caractérisations du LS. Ces caractérisations complémentaires sont de deux sortes. La première caractérisation est dite tribologique car elle fait appel à des techniques d'analyse tribologique. Elle consiste : i) à mesurer la surface de la goutte séchée pour estimer la viscosité du LS lié à son étalement sur son substrat ; ii) à mesurer la hauteur du bourrelet périphérique de la goutte pour évaluer l'accumulation de protéines en périphérie. La deuxième caractérisation est dite physico-chimique car la signature spectrale obtenue par spectroscopie Raman renseigne sur le contenu chimique et structurel des molécules du LS. Ces caractérisations permettent donc, pour chaque échantillon de LS, le suivi des biomarqueurs suivants : surface des gouttes, hauteur du bourrelet périphérique et deux cent dix ratios Raman. Ces biomarqueurs sont ainsi nommé physico-tribologiques dans la suite de l'étude.

Le chapitre suivant est consacré à l'étude d'un modèle spontané canin sur lequel a été validé ce protocole.

Chapitre 3

MODELE SPONTANE CANIN

Introduction du chapitre

Le protocole de caractérisation du liquide synovial détaillé dans le Chapitre 2 vise à identifier les modifications induites par le processus arthrosique afin d'identifier des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de la pathologie et de suivre son évolution dans le temps. Pour valider le potentiel de ce protocole à discriminer la pathologie arthrosique, une étude a été conduite pour comparer des liquides synoviaux sains et arthrosiques.

Ethiquement il est difficile de collecter du LS sur des articulations humaines saines hors étude clinique. Par ailleurs, les changements biochimiques intervenant post-mortem étant significatifs (Binette and Schmid, 1965), utiliser des modèles animaux s'avère indispensable. La pertinence translationnelle d'un modèle animal dépend de la façon dont il mime la pathologie humaine étudiée. Les modèles spontanés sont plus susceptibles d'imiter le cours de l'arthrose primaire chez les humains, en particulier les maladies naturelles chez le chien et le cheval (McCoy, 2015).

Aussi, pour être au plus proche de la physio-pathogénie de l'arthrose chez l'homme, notre étude s'est intéressée au modèle canin. L'arthrose canine est une maladie à progression lente et dégénérative qui affecte 20% des chiens dans le monde, résultant en un large éventail d'animaux appartenant à des clients potentiellement intégrables à des essais cliniques (de Bakker et al., 2017; McCoy, 2015). Elle est souvent liée à des troubles musculo-squelettiques comme une rupture de ligament croisé antérieur, des fractures articulaires ou encore des entorses graves peuvent entraîner une instabilité articulaire et à terme induire de l'arthrose (Henrotin et al., 2005). La pertinence translationnelle de ce modèle tient également aux outils d'évaluation semblables à ce qui se fait en clinique chez l'homme. En effet, le chien est une espèce qui permet de réaliser des examens cliniques et d'imagerie similaires à ceux réalisés chez l'homme et présente un compromis optimum proposant une taille d'articulation permettant le prélèvement d'un volume suffisant de LS sain sans provoquer d'hémolyse (Gregory et al., 2012).

Ce chapitre présente les résultats de cette étude obtenus en appliquant les méthodes de caractérisation et de traitement des données décrites dans le chapitre précédent.

1. Matériel et méthodes

1.1 Les échantillons de LS

Dans cette étude, les échantillons de LS ont été prélevés *in vivo* sur des genoux (grassets) de chiens sains (n=6) et arthrosiques (n=6) (Figure 3.1). Le protocole de prélèvement, en accord avec la législation de la Communauté Européenne, a été validé par le Comité d'éthique (Vetagro Sup, saisine n°1187 pour les LS sains, n°1408 pour les LS pathologiques). Les échantillons de LS ont été placés dans des tubes Eppendorf© non stériles hermétiques et correctement identifiés et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

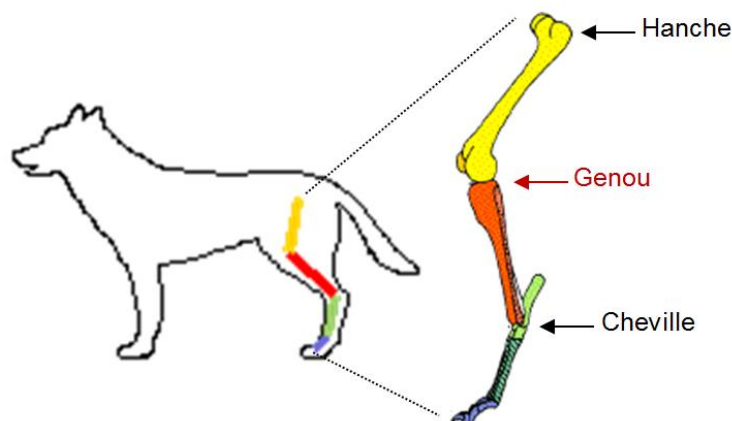


Figure 3.1 | Localisation de la zone de prélèvement de LS : les genoux.

1.1.1 Les chiens sains

Les échantillons de LS sains ont été prélevés sur six chiens adultes mâles de race Beagle, âgés de 1 à 3 ans, issus du troupeau pédagogique de VetAgro Sup, de poids moyen (*écart-type*) 10,8 kg ($\pm 1,3$ kg). Tous les chiens étaient cliniquement et radiologiquement sains et sont nommés H1 à H6. Les LS ont été obtenus par arthrocentèse (aiguille 20G, seringue 5ml) après sédation intramusculaire et préparation chirurgicale des articulations. Tous les échantillons étaient exempts de contamination sanguine et d'apparence (transparence, turbidité, viscosité, couleur) et de volume normaux.

1.1.2 Les chiens arthrosiques

Les LS pathologiques ont été prélevés stérilement en bloc opératoire sur six chiens présentant une rupture de LCA au genou nécessitant une intervention chirurgicale sous anesthésie générale, de la clientèle du CHEV (Centre Hospitalier de l'Ecole Vétérinaire VetAgro Sup, à Marcy l'Etoile). Les chiens étaient âgés de 2 à 7 ans et de poids moyen (*écart-type*) 44,3 kg ($\pm 12,2$ kg) (Tableau 3.1). Les articulations opérées présentaient des signes de lésions du cartilage et divers degrés d'inflammation évalués par les chirurgiens et notés sur chaque compte-rendu opératoire.

n° LS	Race	Age (mois)	Poids (kg)	Genre	Diagnostic clinique
OA1	Bouvier Bernois	91	56.2	Femelle	Rupture LCA
OA2	Beauceron	56	52.7	Mâle	Rupture LCA
OA3	Cane Corso	29	40.5	Femelle	Rupture LCA
OA4	Labrador	60	28	Femelle	Rupture LCA
OA5	Epagneul français	45	30	Mâle	Rupture LCA
OA6	Mâtin de Naples	29	58.5	Femelle	Rupture LCA

Tableau 3.1 | Liste des échantillons de LS prélevés sur les chiens arthrosiques tous atteints de rupture de LCA, avec indication de leur race, âge, poids et genre.

1.2 Les techniques expérimentales

Les LS de chiens sains et arthrosiques ont tous été caractérisés selon le protocole détaillé dans le Chapitre 2, à savoir une analyse tribologique des gouttes de LS séchées pour déterminer la surface des gouttes et la hauteur des bourrelets suivie d'une analyse physico-chimique par spectroscopie Raman pour identifier la composition des LS.

2. Résultats

2.1 Analyse tribologique des gouttes

Les gouttes ont été déposées sur des lames en verre standard et des images 2D des gouttes séchées ont été capturées (Figure 3.2a). Toutes les images des gouttes des échantillons de LS sains (n=6) et OA (n=6) sont visibles en Annexe 1. Le traitement par ImageJ a permis de calculer la surface de toutes les gouttes. Il est apparu que la surface des gouttes était significativement plus grande ($p=0,026$) dans le groupe OA (n=6) avec une surface moyenne (*écart-type*) de 38,37 mm² ($\pm 4,80$ mm²) que dans le groupe sain (n=6) avec une moyenne (*écart-type*) de 31,30 mm² ($\pm 2,85$ mm²) (Figure 3.2b).

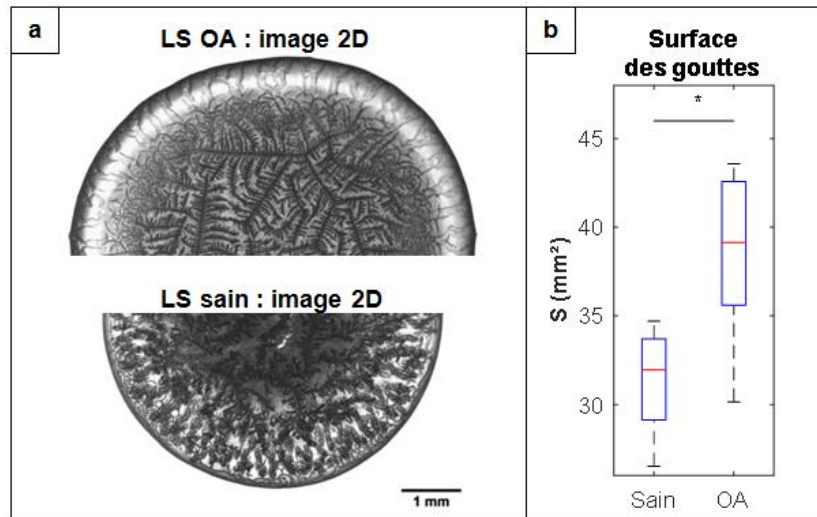


Figure 3.2 | Images 2D des gouttes de LS de chiens sains et OA
 (a) En haut, demi-image d'une goutte de LS OA ; en bas, demi-image d'une goutte de LS sain
 (b) Boîtes à moustache (ie. « box plot ») (représentant médianes, quartiles et valeurs minimales et maximales) des surfaces des gouttes de LS Sain et OA ; * ($p < 0,05$).

Ces images prises au microscope ont révélé également des différences morphologiques entre les gouttes du groupe sain et du groupe OA, notamment par la présence d'un bourrelet périphérique distinctement visible sur les gouttes du groupe OA.

Pour confirmer la présence du bourrelet en périphérie, une goutte de LS sain et une goutte de LS OA ont été mesurées en entier par interférométrie grâce à la fonction « *stitching* » qui permet de reconstruire des images entières à partir de mosaïques. Compte-tenu de la taille des gouttes, la goutte de LS sain a nécessité une mosaïque de 5x6 images et la goutte de LS OA une mosaïque de 5x7 images. Les temps d'acquisition et de récupération des données dans cette configuration sont beaucoup plus longs (de l'ordre de 1h30) et les fichiers de données sont volumineux (de l'ordre du Go). Les images reconstituées permettent de mettre en évidence que, dans les deux cas, l'altitude en périphérie est plus importante, confirmant l'existence d'un bourrelet périphérique et qu'il est plus haut dans le cas de la goutte de LS OA (Figure 3.3).

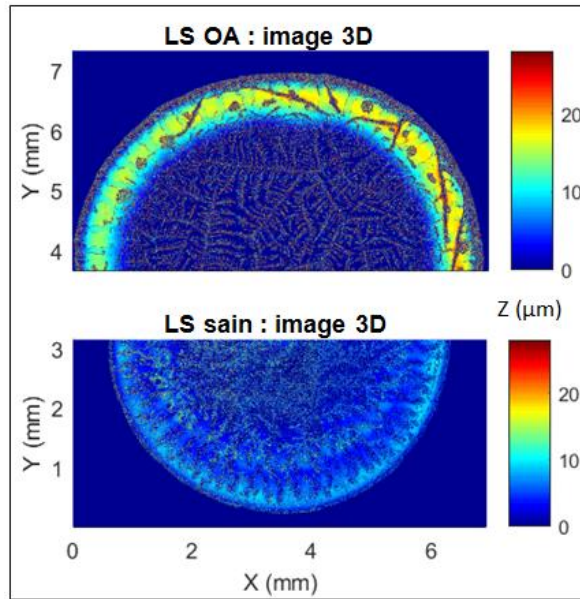


Figure 3.3 | Images 3D entières de gouttes de LS de chiens sains et OA
 Les hauteurs sont représentées par une échelle couleur identique entre les deux demi-images ,
 le bourrelet périphérique est clairement visible dans les deux cas et la hauteur du bourrelet de la goutte de LS OA
 est supérieure à la hauteur du bourrelet de la goutte de LS sain.

L'interférométrie a ensuite été utilisée pour mesurer les zones périphériques de tous les échantillons de LS sains (n=6) et OA (n=6). Les cartes topographiques étant de taille 1,4 mm x 1,07 mm permettent de visualiser et de caractériser entièrement les bourrelets périphériques (Figure 3.4). Toutes les images des gouttes des échantillons de LS sains (n=6) et OA (n=6) sont visibles en Annexe 2.

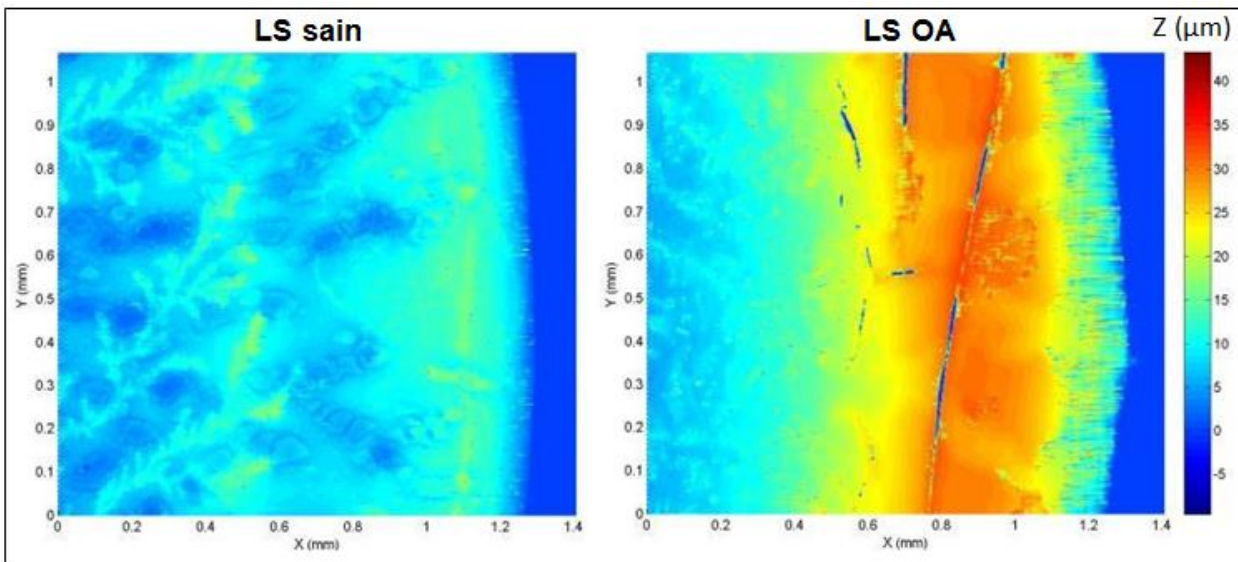


Figure 3.4 | Images 3D périphériques des gouttes de LS de chiens sains et OA
 Les hauteurs sont représentées par une échelle couleur identiques entre les deux images.

Les profils moyens de hauteur ont été calculés dans Matlab pour chaque échantillon de LS sains et OA à partir des données brutes des cartes topographiques. Ces profils ont confirmé que la hauteur du bourrelet en périphérie est significativement plus importante ($p=0,002$) dans le groupe OA ($n=6$) avec une hauteur moyenne (*écart-type*) de $30,1 \mu\text{m}$ ($\pm 5,8 \mu\text{m}$), soit presque trois fois supérieure à celle du groupe sain ($n=6$) avec une hauteur moyenne (*écart-type*) de $11,8 \mu\text{m}$ ($\pm 1,7 \mu\text{m}$) (Figure 3.5a et b).

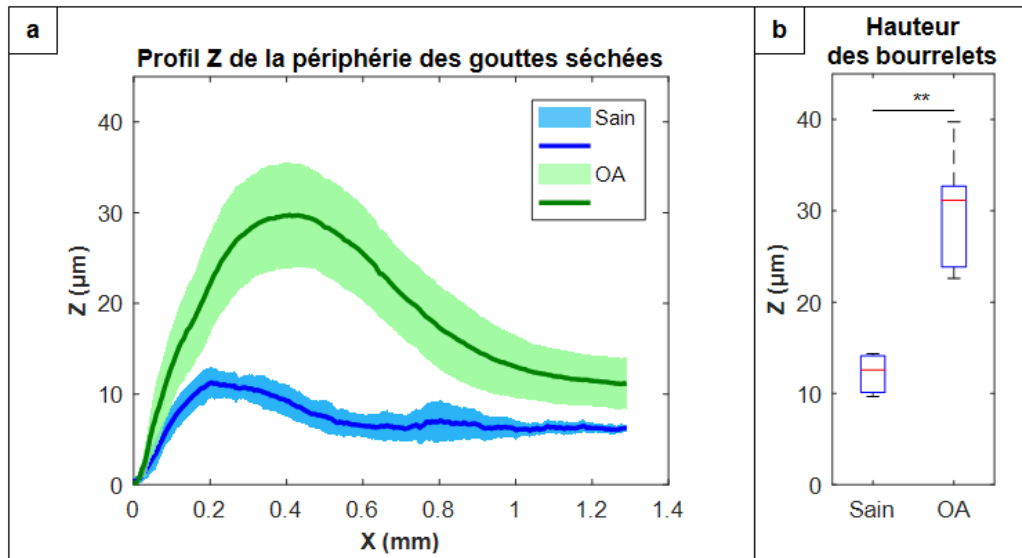


Figure 3.5 | Profils périphériques des gouttes de LS de chiens sains et OA
 (a) Les profils Z périphériques le long d'un rayon des gouttes de LS sains et OA : les lignes en gras et les zones ombrées représentent respectivement les moyennes et les écarts-types de la hauteur du bourrelet; (b) Boîtes à moustache des hauteurs des bourrelets des gouttes de LS Sain et OA ; ** ($p<0.01$).

2.2 Analyse physico-chimique

2.2.1 Répétabilité des mesures

Les écarts intra- et inter-zones ont été calculés et attestent de la répétabilité des mesures. Ainsi, pour les douze échantillons, la moyenne (*écart-type*) des écarts intra-zone est de $0,11$ ($\pm 0,036$) et de $0,06$ ($\pm 0,025$) pour les écarts inter-zone. A titre d'exemple, la Figure 3.6 illustre les écarts inter-zone de l'échantillon H1, qui est représentatif de l'ensemble des échantillons.

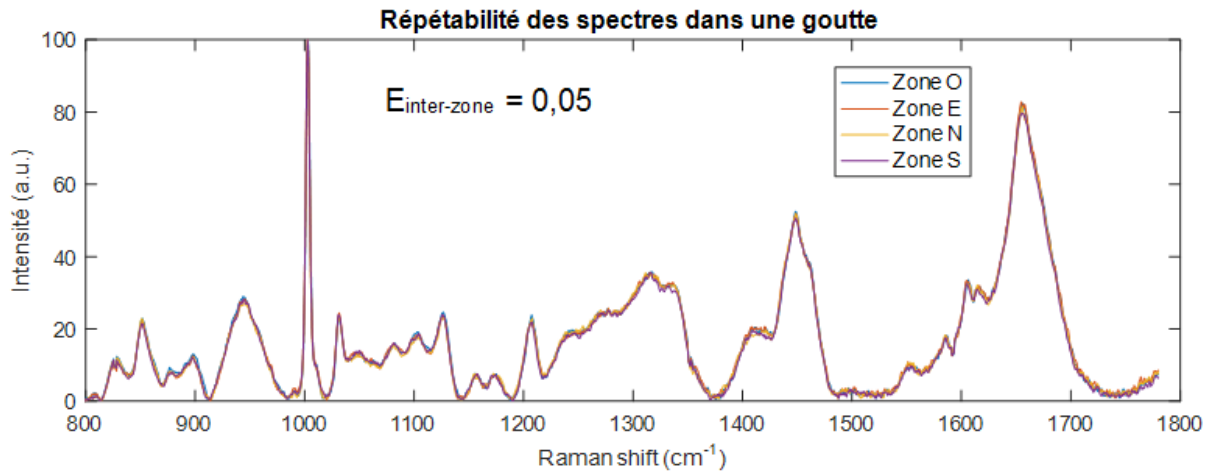


Figure 3.6 | Répétabilité des mesures spectrales
Exemple de l'échantillon LS sain H1 : Ecart inter-zone.

2.2.2 Reproductibilité du modèle sain

Aucune différence significative n'a été observée entre les spectres des LS sains (Figure 3.7) comme en atteste les écarts calculés entre chacun des spectres des LS sains ($n=6$) et la moyenne de ces spectres : la moyenne (*écart-type*) de ces écarts est de $0,08 (\pm 0,027)$, ce qui est du même ordre de grandeur que les écarts liés à la répétabilité des mesures.

La moyenne des 6 spectres des LS sains a ainsi été utilisée par la suite pour modéliser la signature spectrale des LS sains.

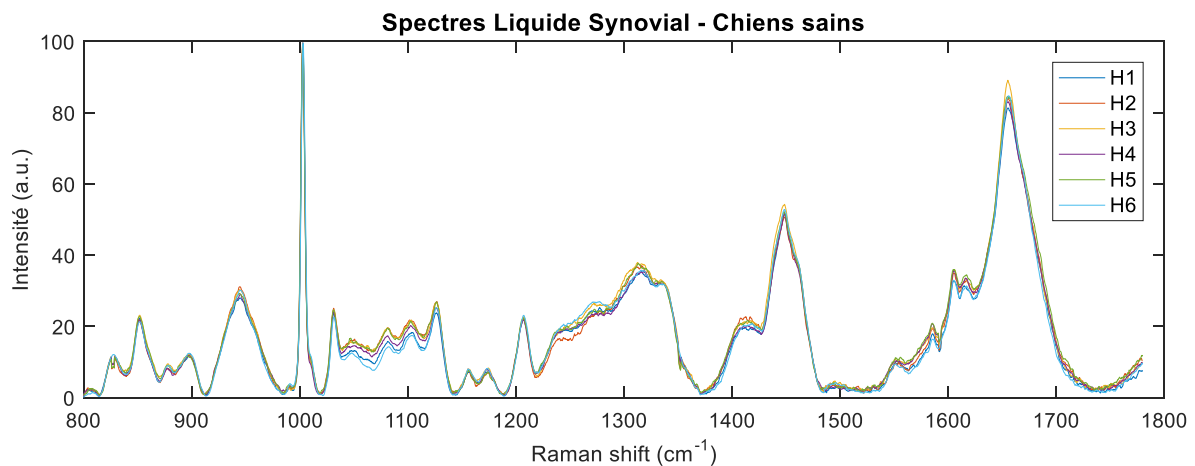


Figure 3.7 | Reproductibilité des spectres moyens normalisés des LS de chiens sains.

Comme explicité dans le Chapitre 2, la plupart des bandes Raman sont reconnaissables dans les spectres des LS sains et permettent de distinguer :

- ➔ les protéines et leurs structures : i) bande de la structure primaire (squelette) à 1081 cm^{-1} ; ii) bandes de la structure secondaire, les Amides III entre 1242 et 1275 cm^{-1} et les Amide I entre 1654 and 1670 cm^{-1} ; iii) bandes des acides aminés comme la phénylalanine (mode « *breathing* » du cycle aromatique à 1002 cm^{-1}) et la tyrosine (doublet à 828 and 850 cm^{-1}) ; iv) bandes des terminaisons méthyles CH_2 et CH_3 à 1317 cm^{-1} (mode « *twisting* »), 1339 cm^{-1} (mode « *wagging* ») et 1448 cm^{-1} (mode « *bending* »).
- ➔ l'acide hyaluronique, identifiable par les bandes à 896 cm^{-1} et 945 cm^{-1} et sa contribution dans la région 1020 - 1140 cm^{-1} (Esmonde-White et al., 2008a).
- ➔ la chondroïtine sulfate, identifiable par la bande de la C6S à 1062 cm^{-1} (Bansil et al., 1978).

2.2.3 Discrimination sain versus OA

De la même façon que pour les chiens sains, les écarts ont été calculés entre chacun des spectres des LS OA (n=6) et le spectre moyen OA : la moyenne (*écart-type*) de ces écarts est de $0,14 (\pm 0,057)$, ce qui est significativement plus grand que la répétabilité des mesures et les écarts relevés entre les spectres des LS sains et le modèle sain ($p=0,043$). Par ailleurs, les écarts entre chacun des spectres des LS OA (n=6) et le spectre modèle sain sont plus importants : la moyenne (*écart-type*) de ces écarts est de $0,44 (\pm 0,077)$, démontrant que ces spectres sont différents du modèle sain ($p=0,005$) (Figure 3.8).

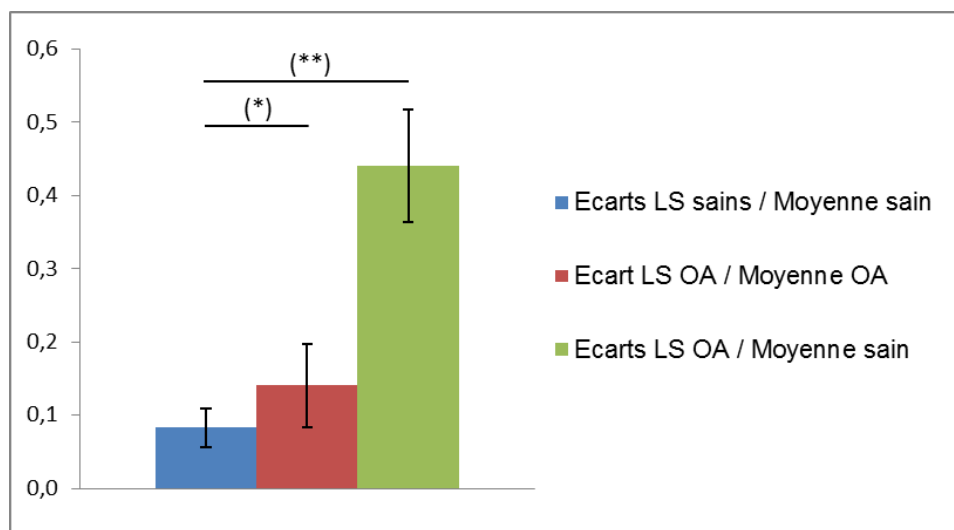


Figure 3.8 | Écarts entre les spectres des LS sains et OA
Les barres représentent les moyennes, les barres d'erreur les écarts-types.

La forme des bandes et leurs intensités varient visiblement, sans affecter leur position, entre les spectres sains et OA (Figure 3.10).

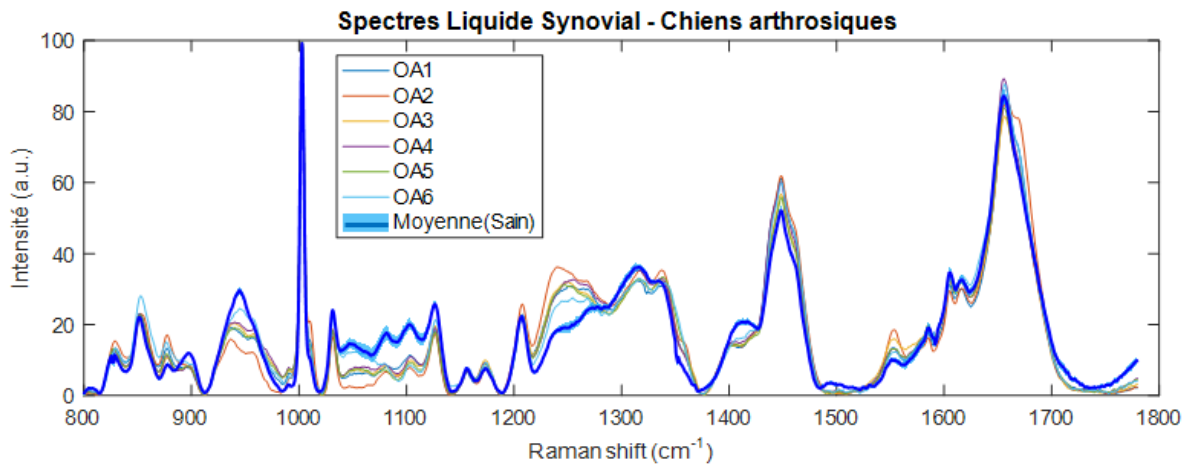


Figure 3.9 | Spectres moyens normalisés des LS de chiens arthrosiques
Spectres moyens normalisés des LS arthrosiques chez le chien (n=6). Le spectre en gras représente l'empreinte spectrale moyenne du LS sain, la zone grisée correspond à l'écart-type.

On observe non seulement des variations d'intensité mais également de nouvelles bandes Raman comme :

- ➔ 960 cm^{-1} qui est la bande Raman la plus forte du tissu osseux, liée à la teneur en phosphate minéral osseux.
- ➔ 970, 1248 et 1363 cm^{-1} attribuées respectivement à la fibrine pour les deux premières bandes et à l'hémoglobine pour la dernière, résultant de l'inflammation de l'articulation (Virkler and Lednev, 2010).

Plusieurs zones spectrales d'intérêt ont focalisé notre attention (Figure 3.10).

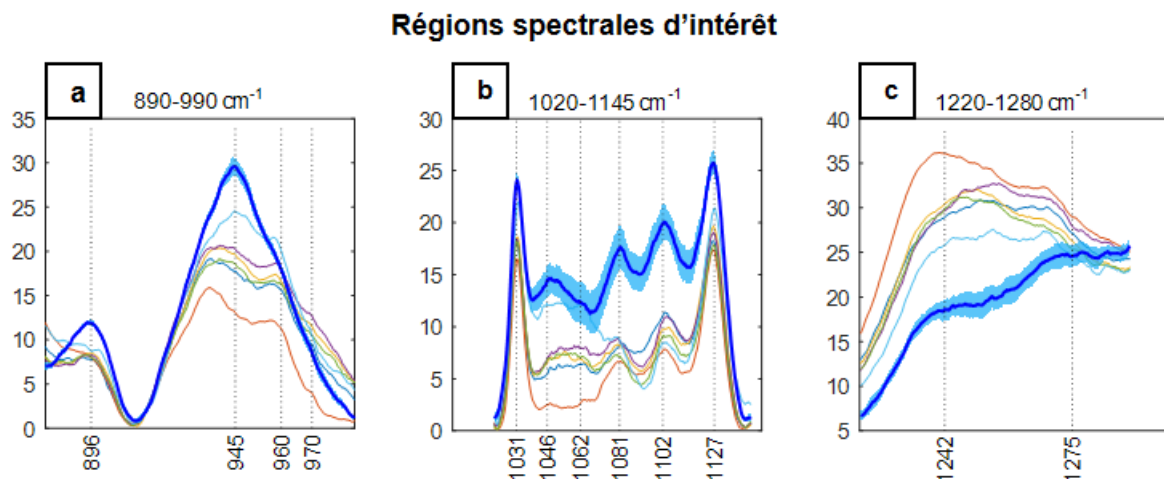


Figure 3.10 | Régions spectrales d'intérêt regroupant de nombreuses bandes radicalement différentes entre les LS sains et OA.

La région 890-990 cm^{-1} (Figure 3.10a) s'est révélée être drastiquement différente entre spectres sains et OA : alors que seule la bande acide hyaluronique à 945 cm^{-1} est prédominante sur les spectres sains, des bandes à 960 cm^{-1} et 970 cm^{-1} apparaissent sur les spectres OA.

La région 1020-1145 cm^{-1} (Figure 3.10b) est riche en information car elle contient des bandes de la phénylalanine (1031 cm^{-1}), acide hyaluronique (1046, 1102 et 1127 cm^{-1}), C6S (1062 cm^{-1}) et le squelette des protéines (1081 cm^{-1}) qui varient entre LS sains et OA.

Finalement, la région 1220-1280 cm^{-1} des Amide III (Figure 3.10c) est la troisième à être notablement différente. On peut aussi remarquer d'autres bandes qui se démarquent entre LS sains et OA, comme le doublet de la tyrosine, les bandes associées à CH_2 et CH_3 et la bande autour de 1550 cm^{-1} , relative aux Amides II.

Pour comparer quantitativement les spectres sains et OA, des bandes Raman ont été sélectionnées et les ratios d'intensité calculés. Les vingt et une bandes choisies permettent de prendre en compte les principaux constituants du LS : acide hyaluronique, protéines, chondroïtine 6-sulfate et phosphate minéral (Figure 3.11) et résultent dans le calcul de deux cent dix ratios.

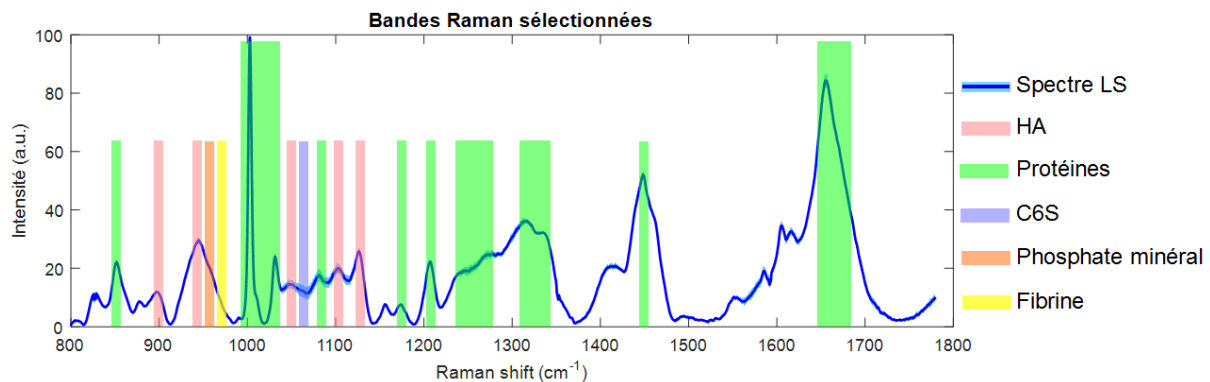


Figure 3.11 | Bandes Raman sélectionnées pour analyses quantitatives.

Des tests univariés de Mann Whitney ont été réalisés sur ces deux cent dix ratios pour comparer le groupe sain ($n=6$) et le groupe OA ($n=6$). Cent soixante-quatre d'entre eux se sont révélés être significativement différents. Quelques ratios sont illustrés Figure 3.12. L'analyse des ratios significatifs permet d'exprimer les principales différences entre spectres de LS sains et OA :

- ➔ Diminution de la teneur en acide hyaluronique
- ➔ Diminution de la teneur en chondroïtine-6 sulfate
- ➔ Augmentation de la teneur en phosphate minéral osseux
- ➔ Augmentation de la teneur en CH_2 et CH_3 et diminution de la teneur en squelette des protéines

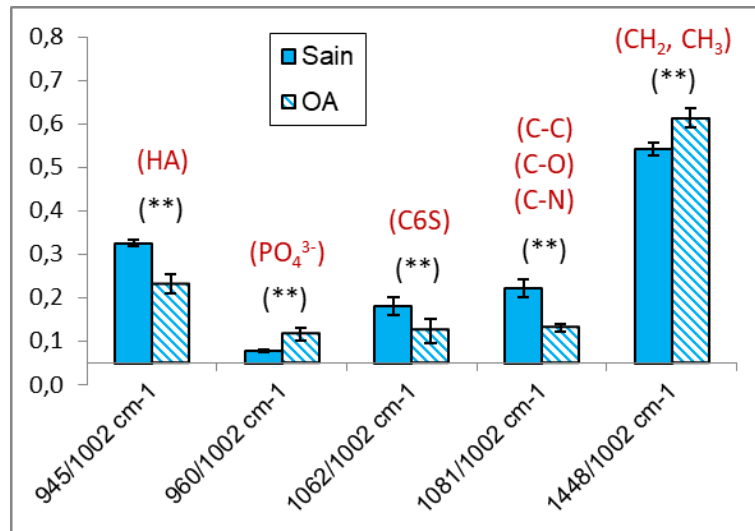


Figure 3.12 | Exemples de ratios significativement différents entre LS sains et OA. Ces ratios, tous exprimés sur la bande du cycle aromatique de la phénylalanine, concernent de gauche à droite : l'acide hyaluronique, le phosphate minéral osseux, la chondroïtine-6 sulfate, le squelette des protéines et les terminaisons méthyles CH₂ et CH₃ ; ** (p < 0.01).

Afin de conforter les différences statistiques entre les spectres de LS sains et OA, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été effectuée. Cette méthode statistique multivariée classiquement utilisée sur les données hyper spectrales permet de réduire le grand nombre de variables contenu dans les spectres. Les Composantes Principales sont calculées comme étant un nouvel ensemble de variables décorréelées, combinaisons linéaires des variables initiales corrélées, et expliquant le maximum de variance possible entre les données. Les « scatter plots » des quatre premiers scores de l'ACP (Figure 3.13), représentant 92,2% de la variance expliquée totale, ont montré que les groupes OA et sains sont bien distincts.

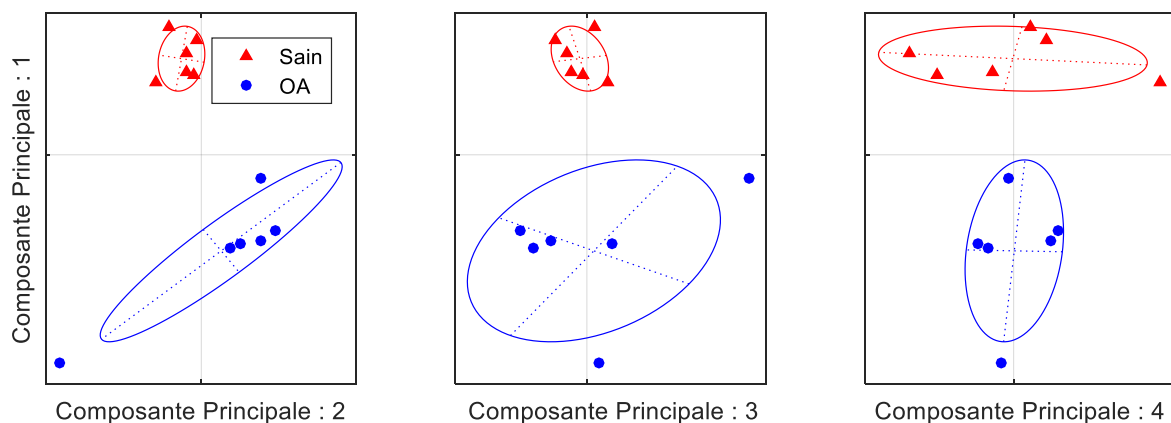


Figure 3.13 | Résultats ACP : scores des composantes principales 1 à 4 représentant 92,2% de la variance totale et confirmant que les deux groupes Sains et OA sont clairement distincts.

2.3 Bilan physico-tribologique

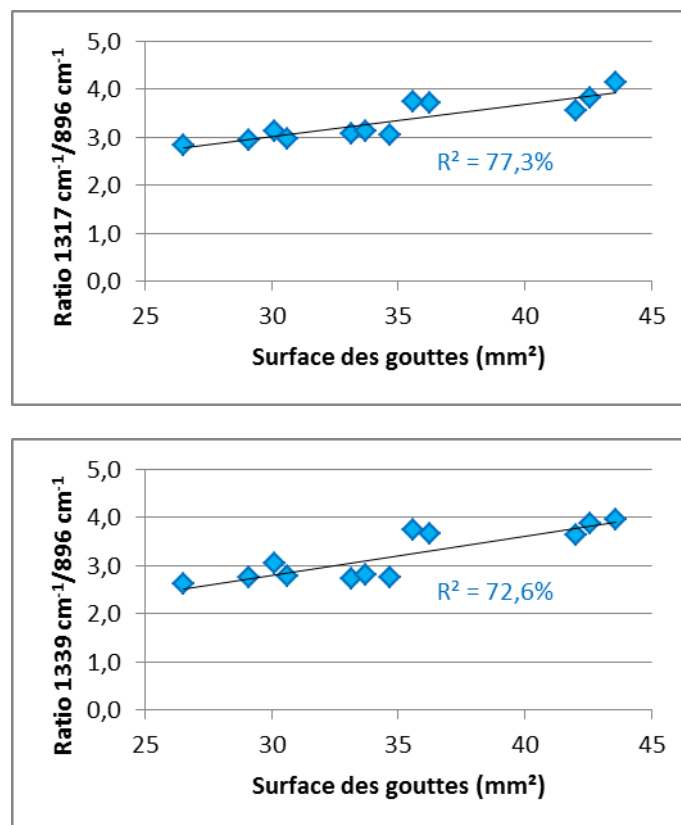
Des tests de corrélation de Pearson ont été menés sur les deux cent dix ratios pour trouver les corrélations pouvant exister entre les ratios et les caractérisations tribologiques des gouttes (surfaces des gouttes et hauteurs des bourrelets).

Ces tests ont montré que quatre ratios avaient une forte corrélation avec un coefficient R^2 supérieur à 70% ($p < 10^{-3}$) avec la surface des gouttes (Tableau 3.2).

Ratios	Type	Sain		OA		Mann-Whitney p	Tendance	Corrélation Surface R^2 (%)
		Moyenne	$\sigma(\pm)$	Moyenne	$\sigma(\pm)$			
1317 cm^{-1} /896 cm^{-1}	Pr/HA	3,00	0,10	3,68	0,31	0,004	↗	77,3
1339 cm^{-1} /896 cm^{-1}	Pr/HA	2,74	0,06	3,65	0,29	0,002	↗	72,6
1317 cm^{-1} /945 cm^{-1}	Pr/HA	1,30	0,04	1,86	0,26	0,002	↗	70,8
1062 cm^{-1} /1046 cm^{-1}	Pr/HA	0,88	0,06	1,05	0,05	0,002	↗	71,8

Tableau 3.2 | Liste des quatre ratios montrant un fort degré de corrélation avec la surface des gouttes. Moyennes et écarts-types des ratios, valeurs p des tests de Mann-Whitney, tendances d'évolution, coefficients de corrélation avec la surface des gouttes. HA : acide hyaluronique, Pr : protéines.

Ces corrélations sont illustrées Figure 3.14.



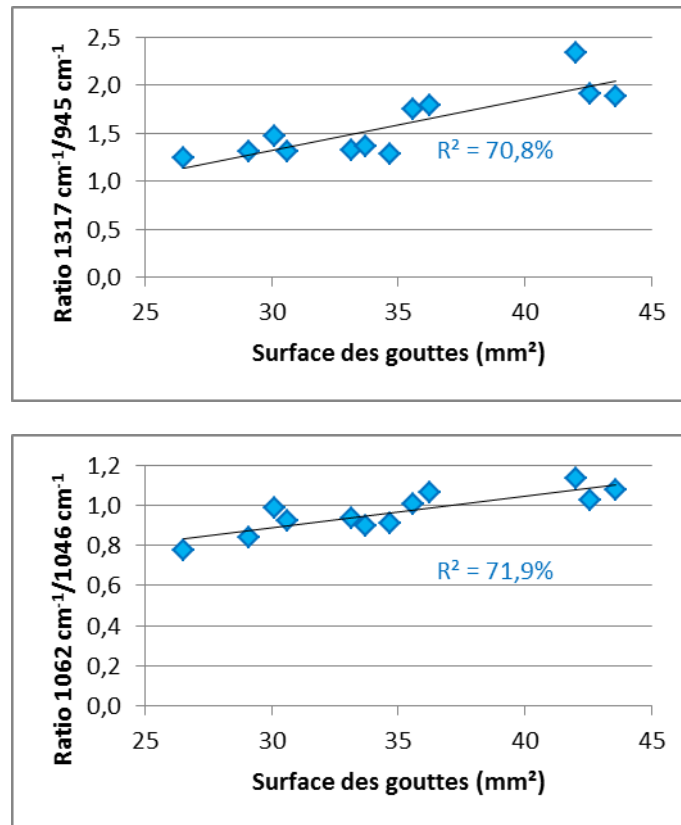


Figure 3.14 | Régression linéaire des quatre ratios corrélés avec la surface des gouttes.

De la même façon, dix-huit ratios ont révélé une corrélation supérieure à 80% ($p < 10^{-4}$), dont huit avec un excellent degré de corrélation, supérieur à 85%, avec la hauteur des bourrelets (Tableau 3.3). Deux de ces corrélations sont illustrées Figure 3.15.

Ratios	Type	Sain		OA		Mann-Whitney p	Tendance	Corrélation Hauteur R^2 (%)
		Moyenne	$\sigma(\pm)$	Moyenne	$\sigma(\pm)$			
1102 cm ⁻¹ /852 cm ⁻¹	HA/Pr	0,92	0,06	0,42	0,07	0,002	↘	88,3
1102 cm ⁻¹ /1002 cm ⁻¹	HA/Pr	0,20	0,02	0,10	0,01	0,002	↘	86,0
1102 cm ⁻¹ /1031 cm ⁻¹	HA/Pr	0,84	0,04	0,53	0,07	0,002	↘	90,5
1127 cm ⁻¹ /1102 cm ⁻¹	HA/HA	1,28	0,07	1,97	0,30	0,002	↗	88,2
1172 cm ⁻¹ /1102 cm ⁻¹	Pr/HA	0,38	0,05	0,93	0,12	0,002	↗	87,1
1448 cm ⁻¹ /1102 cm ⁻¹	Pr/HA	2,51	0,21	6,04	0,92	0,002	↗	86,6
1654 cm ⁻¹ /1102 cm ⁻¹	Pr/HA	3,30	0,32	6,46	0,90	0,002	↗	86,3
1448 cm ⁻¹ /1317 cm ⁻¹	Pr/Pr	1,37	0,03	1,70	0,07	0,002	↗	88,7

Tableau 3.3 | Liste des huit ratios montrant un excellent degré de corrélation avec la hauteur des bourrelets. Moyennes et écarts-types des ratios, valeurs p des tests de Mann-Whitney, tendances d'évolution, coefficients de corrélation avec la hauteur des bourrelets. HA : acide hyaluronique, Pr : protéines.

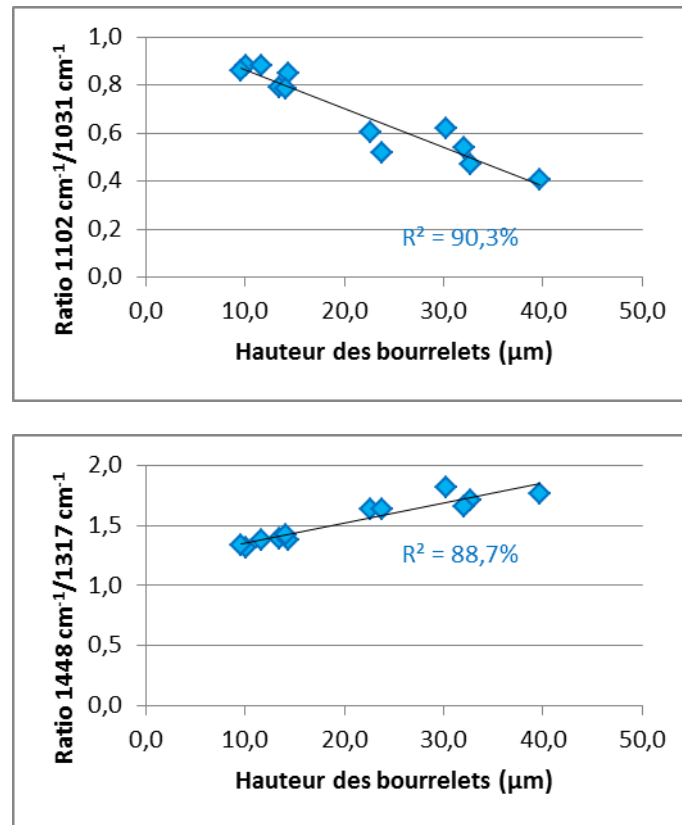


Figure 3.15 | Régression linéaire de deux ratios corrélés avec la hauteur des bourrelets.

Tous ces ratios faisaient partie des cent soixante-quatre ratios significativement différents entre groupes sain et OA.

3. Discussion

A notre connaissance, cette étude est la première à comparer la composition globale de LS, prélevés de manière mini-invasive, dans des genoux sains et arthrosiques sur une population canine. Le modèle spontané canin a ici offert l'avantage de pouvoir disposer de LS sains, issus de Beagle du troupeau pédagogique de VetAgro Sup, à comparer à des LS arthrosiques, prélevés sur des chiens de clients du CHEV opérés suite à rupture du LCA liées au processus dégénératif de l'OA chez le chien.

Des gouttes de faible volume de LS ont été déposées sur des substrats plats et laissées sécher à température ambiante semi-couvertes. Cette technique a démontré plusieurs avantages et a permis des caractérisations combinées des morphologies des gouttes séchées et de la composition chimique globale du LS. Cette méthode s'est avérée : i) facile d'utilisation, ii) hautement reproductible comme en atteste les faibles écarts-types mesurés aussi bien sur les marqueurs tribologiques que spectraux,

iii) très efficace pour discriminer les LS sains et arthrosiques aussi bien sur les marqueurs tribologiques que spectraux.

Ces gouttes ont été déposées sur des lames en verre standard offrant par ailleurs une technique accessible et peu onéreuse. Les mesures Raman portant sur des gouttes sont souvent menées sur des substrats spécifiques minimisant le bruit de fond Raman, comme des lames en Calcium Fluoride (CaF_2) ou en Quartz, voire des lames pour des techniques dites de Raman exalté de surface (SERS Surface Enhancement Raman Spectroscopy) qui sont plus chères et souvent non réutilisables (Bonifacio et al., 2014; Esmonde-White et al., 2008b, 2014; Mandair et al., 2006). La méthode décrite ici ne nécessite pas ces consommables car les routines utilisateur développées dans Matlab permettent de post-traiter efficacement les données obtenues.

Des différences significatives ont été observées entre les surfaces des gouttes des chiens sains et arthrosiques. En effet, l'OA provoque des processus complémentaires agissant sur la régulation, la concentration et la masse moléculaire de l'acide hyaluronique (Hui et al., 2012; McCarty et al., 2012; Praest et al., 1997; Watterson and Esdaile, 2000). En particulier, les synoviocytes synthétisent des molécules d'acide hyaluronique de plus petits poids moléculaires et en plus petite quantité. Dans le même temps, la dégradation de la MEC et de la membrane synoviale diminue la résistance à la perte d'acide hyaluronique par le réseau lymphatique. Plusieurs études ont démontré que la viscosité du LS est largement dépendante de la concentration en acide hyaluronique et plus précisément que la perte de viscosité est due à une diminution de la concentration en acide hyaluronique (Fam et al., 2007; Praest et al., 1997; Schmidt et al., 2007).

Par ailleurs, l'analyse spectrale révèle que tous les ratios significatifs relatifs aux bandes de l'acide hyaluronique (896, 945, 1046, 1102, 1127 cm^{-1}) reflètent une diminution de la concentration en acide hyaluronique sur les LS OA comparés aux LS sains. Des tests statistiques complémentaires de corrélation de Pearson ont montré que les ratios corrélés à la surface des gouttes sont principalement liés aux bandes d'acide hyaluronique. Finalement, les surfaces des gouttes de LS sains sont significativement plus petites que celles de LS OA ce qui est cohérent avec la diminution de la concentration en acide hyaluronique liée au processus arthrosique.

Ces résultats combinés peuvent confirmer le défaut de production des molécules d'acide hyaluronique par les synoviocytes et la modification de la perméabilité de la membrane synoviale, conduisant à la baisse de la concentration de l'acide hyaluronique ainsi que la baisse de son poids moléculaire dans les LS OA. Les LS OA sont moins visqueux que les sains en raison de la faible concentration et de dépolymérisation de l'acide hyaluronique.

Pendant le processus de séchage de la goutte, les bords de la goutte sont fixés sur le substrat pendant que le liquide s'évapore. Ceci provoque un écoulement des solutés du centre vers la périphérie où se produit spontanément un anneau de matière concentrée, incluant les protéines du LS (Filik and Stone, 2007; Kopecký and Baumruk, 2006). Des études ont observé la présence de ce bourrelet en périphérie de la goutte séchée et certaines d'entre elles ont montré la dépendance entre la hauteur du bourrelet et la concentration en protéines sur des solutions de protéines plus ou moins diluées (Ortiz et al., 2006).

L'analyse des tendances des ratios significatifs liés aux bandes des protéines et des acides aminés a montré une augmentation de la teneur en protéines dans les LS OA. Les tests de corrélation de Pearson ont montré que de fortes corrélations existent entre des ratios liés aux protéines et la hauteur des bourrelets de la périphérie des gouttes. Ces résultats, cohérents avec les précédents, confirment la modification de la perméabilité de la membrane synoviale, conduisant à une augmentation des protéines dans le LS OA. L'augmentation très significative de la hauteur des bourrelets (trois fois supérieure) dans la périphérie externe des gouttes séchées des LS OA reflète ainsi l'augmentation du contenu en protéines.

Globalement, la baisse de la concentration de l'acide hyaluronique, la baisse de son poids moléculaire et l'afflux de protéines dans le LS sont des témoins du processus inflammatoire, qui influe à son tour sur l'efficacité des synoviocytes et la perméabilité de la membrane synoviale.

La question de l'influence du poids des chiens sur les résultats se pose également, les chiens ayant subi une LCA étant significativement plus lourds que les chiens sains du troupeau pédagogique. Cependant, aucun chien ne présentait de signes d'obésité, aussi aucune influence des adipokines, ces protéines produites par les tissus adipeux dont plusieurs études ont montré une relation avec le développement de l'OA, n'est suspectée.

L'os est un matériau composite constitué d'une matrice organique elle-même constituée de fibres de collagène de type I et de cristaux minéraux inorganiques, formés de plaquettes d'hydroxyapatite carbonatée. La partie minérale de l'os représente 60 à 70% du poids du matériau. L'analyse de la région spectrale 910-990 cm^{-1} a révélé la présence d'une bande à 960 cm^{-1} sur les spectres de LS OA, inexistante sur les spectres de LS sains. Cette bande est la plus importante de la composante minérale de l'os ($\nu_1\text{P-O}$), et suggère la présence de produits de dégradation de l'os sous-chondral.

La chondroïtine 6-sulfate est le glycosaminoglycane majoritaire dans le cartilage articulaire et le ménisque. Il peut être détecté en spectroscopie Raman grâce à sa bande la plus forte à 1062 cm^{-1} (Bansil et al., 1978; Ellis et al., 2009). L'analyse des ratios significatifs liés à la bande à 1062 cm^{-1} de la chondroïtine 6-sulfate a montré une nette diminution de sa concentration dans le LS OA. Ceci est en accord avec des études qui ont mis en évidence une diminution des niveaux de chondroïtine 6-sulfate dans le LS arthrosique à un stade avancé (Lohmander et al., 1993; Uesaka et al., 2001), reflétant le turnover du cartilage. Il est à noter que notre protocole ne permet pas de détecter la chondroïtine 4-sulfate dont les bandes Raman sont beaucoup moins intenses (Bansil et al., 1978).

La dégradation des agrécanes et leur libération sous forme de fragments dans le LS sont principalement liées à l'action des enzymes cataboliques. Plusieurs études ont montré une augmentation du ratio des métalloprotéinases (MMP) sur leur inhibiteurs (TIMP) associée à la dégradation de la matrice cartilagineuse (Lohmander et al., 1993). Des ratios significatifs liés au squelette des protéines (1081 cm^{-1}) ont révélé une diminution de cette bande dans les LS OA. Dans le même temps, des ratios significatifs associés aux terminaisons méthyles CH_2 , CH_3 ont montré une augmentation de ces bandes dans les LS OA. Ces observations pourraient suggérer un clivage des protéines et des chaînes polypeptidiques des acides aminés et ces bandes pourraient ainsi être des marqueurs de l'action des enzymes cataboliques prenant le pas sur leurs inhibiteurs. Pour confirmer cette hypothèse, des tests de dégradation enzymatique par ajout de protéases à des échantillons de LS pourraient être réalisés pour vérifier si leur action a une influence sur la signature spectrale des protéines du LS.

Conclusion du chapitre

Dans cette étude, l'utilisation de la technique du dépôt de goutte combinée à la spectroscopie Raman a permis pour la première fois de mettre en évidence la signature spectrale d'un LS sain. La simple analyse tribologique des gouttes séchées a montré la possibilité d'observer des changements physiologiques et chimiques dans le LS liés à la perte de perméabilité de la membrane. Les résultats ont en effet montré que la surface des gouttes séchées des LS OA sont significativement plus grandes que celles des LS sains, reflétant une baisse de la viscosité du liquide pathologique, corrélée avec la baisse de la concentration en acide hyaluronique. Dans le même temps, la technique a mis en évidence la formation d'un bourrelet en périphérie de la goutte, dont la hauteur est beaucoup plus importante dans les LS OA que sains. Ce résultat est corrélé à l'augmentation de la teneur en protéines.

Les acquisitions spectrales ont complété ces observations grâce à la quantification de la baisse de concentration de l'acide hyaluronique et de l'augmentation de la teneur en protéines, grâce aux ratios liés aux bandes Raman qui leur sont propres. Par ailleurs, cette étude préliminaire met en évidence le potentiel de la technique à pouvoir détecter d'autres changements physico-chimiques de la pathologie arthrosique puisque des ratios marqueurs de l'altération générale de l'articulation, que ce soit à une échelle micro par l'observation du clivage des protéines, ou à une échelle macro par l'observation des produits de dégradation tissulaire des cartilage, ménisque et tissu osseux, ont été observés.

Tous ces résultats sont cohérents avec des études déjà réalisées montrant séparément par des techniques de dosage spécifiques l'effet de la pathologie sur la perméabilité de la membrane par l'étude des teneurs en acide hyaluronique et en protéines, sur la dégradation des tissus par le dosage des fragments de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes ou de leurs épitopes et sur la balance entre anabolisme et catabolisme par le dosage en protéases et leurs inhibiteurs.

La méthodologie mise au point ici, et telle que brevetée, présente l'avantage d'analyser la composition globale d'un LS sans avoir à cibler une espèce ou un composé chimique spécifique, ce qui n'a, à notre connaissance, aucun équivalent sur le marché.

Cette étude valide le potentiel de cette méthodologie à pouvoir différencier le LS sain d'un LS arthrosique. Les chapitres suivants ont pour objectif de vérifier si cette technique permet un suivi longitudinal de l'évolution de la pathologie sur un modèle lapin et peut aboutir à des biomarqueurs compatibles d'une translation clinique vers l'homme pour aboutir à un outil pronostique dans le cadre d'une médecine personnalisée.

Chapitre 4

CORRELATIONS ENTRE LES PROPRIETES DU LS ET LES PROPRIETES VISCOELASTIQUES DES TISSUS ARTICULAIRES SUR MODELE D'ARTHROSE INDUITE LAGOMORPHE

Introduction du chapitre

Une technique innovante de caractérisation du LS a été explicitée au Chapitre 2. Une étude sur un modèle spontané canin, détaillée au Chapitre 3, a montré son potentiel à distinguer le LS sain du LS pathologique, à partir de biomarqueurs tribologiques, surface et hauteur des bourrelets périphériques des gouttes séchées, et de biomarqueurs physico-chimiques, ratios des intensités des bandes Raman des principaux constituants du LS (acide hyaluronique, protéines, produits témoins de la dégradation globale de l'articulation). Cette méthode s'est par ailleurs révélée très aisée à mettre en œuvre et reproductible dans ses résultats.

L'étude présentée dans ce chapitre fait partie d'une étude plus globale menée au sein du laboratoire impliquant plusieurs groupes de lapins sur lesquels tous les tissus articulaires ont été collectés : fémur, tibia, rotule, ménisque, LS, membrane synoviale, sur les deux pattes postérieures. Cette étude visait à étudier les effets de la viscosupplémentation, sur le développement et l'évolution de l'OA et plus particulièrement sur les propriétés biomécaniques des tissus de l'articulation qui restent jusqu'ici encore mal connues. Elle a donné lieu à plusieurs publications, publiées (Levillain et al., 2015, 2017a, 2017b) ou en cours de publication, sur la biomécanique et la microstructure des ménisques, des cartilages et de l'os sous-chondral.

La section du ligament croisé antérieur (ACLT) est la technique qui a été retenue pour induire l'OA. Cette méthode offre l'avantage de connaître la date de l'initiation de l'OA. Cinq groupes de six lapins ont été mis en place afin d'étudier statistiquement l'effet de l'OA sur l'hétérogénéité des tissus, soit trente lapins au total répartis comme suit :

- ➔ Un groupe sain servant de référence,
- ➔ Deux groupes OA 2 et 6 semaines pour une étude longitudinale de l'OA,
- ➔ Deux groupes OA 2 et 6 semaines avec thérapie médicamenteuse par viscosupplémentation.

Le groupe de lapins sains a été utilisé comme référence (groupe contrôle non opéré et non traité). En effet, la patte controlatérale est souvent utilisée comme patte contrôle « saine », permettant de réduire le nombre d'animaux et de s'affranchir de la variabilité inter-individus. Mais, des études ont montré que cette patte subissait des modifications systématiques, notamment au niveau du cartilage, dues à un report de charge lié à la douleur ressentie dans la patte opérée, entraînant dès 4 semaines, sur un modèle induit par immobilisation, une modification des propriétés des tissus (Zhou et al., 2015).

L'étude présentée ici s'est focalisée sur les pattes opérées et a pour objectif principal de montrer le potentiel de la technique de caractérisation du LS à suivre longitudinalement l'évolution de la pathologie et les effets de traitement par viscosupplémentation. Un second objectif a été de quantifier les modifications des propriétés mécaniques des différents tissus viscoélastiques articulaires, ménisque et cartilage, afin de les comparer aux propriétés tribologiques et physico-chimiques du LS pour identifier leurs comportements en fonction de l'avancement de la pathologie et de l'effet de traitement par viscosupplémentation.

Ce chapitre est divisé en plusieurs parties. La première partie (A) consiste à détailler le modèle animal choisi, les procédures chirurgicales utilisées et la collecte des échantillons pour réaliser une première évaluation macroscopique de l'évolution des tissus des pattes opérées en fonction de la progression de l'OA et du traitement. La deuxième partie (B) traite des propriétés viscoélastiques des ménisques et des cartilages articulaires. La troisième partie (C) est consacrée à la caractérisation tribologique et physico-chimique du LS conformément au protocole explicité au Chapitre 2.

Partie A : Modèle animal et suivi macroscopique de la progression de l'arthrose

Cette première partie a pour objectif de détailler le modèle animal utilisé dans cette étude et les étapes ayant conduit au prélèvement des échantillons. L'évaluation macroscopique des tissus articulaires sera présentée pour les lapins des différents groupes en fonction de l'évolution longitudinale de la pathologie et du traitement.

A1. Modèle animal

A1.1 Induction de l'arthrose

Pour évaluer les propriétés des différents tissus articulaires, les modèles animaux fournissent des informations utiles sur les mécanismes impliqués dans l'OA. Notamment, ils permettent le suivi longitudinal de l'évolution de l'OA dès les premiers stades. Ces modèles comprennent l'OA naturelle et induite. L'OA peut être induite par voie chimique ou chirurgicale (Bendele, 2001) permettant de mimer une OA post-traumatique (PTOA) proche de celle observée chez l'homme (Lampropoulou-Adamidou et al., 2013). Par ailleurs, les modèles d'OA induites sur animaux offrent la possibilité de suivre la séquence des événements précoces qui se produisent lors de la dégénérescence du cartilage tout en permettant de les distinguer du processus dégénératif de l'arthrose lié au vieillissement naturel (Setton et al., 1999).

Les modèles de petits animaux comme le lapin, le cochon d'inde et le rat sont relativement peu coûteux, faciles à manipuler, à héberger et à étudier, et développent l'OA plus rapidement que les modèles de plus grands animaux (Bachy et al., 2013; Fu et al., 2009). En particulier, l'espèce lagomorphe offre un accès chirurgical facile et une quantité de tissu suffisante pour des analyses biomécaniques par rapport à des modèles animaux plus petits tels que des rats. Le volume de LS dans un genou de lapin même faible, environ 50 µl comparé à 500 à 1000 µl chez l'homme, reste ainsi suffisant (Sabaratnam et al., 2005).

Dans la présente étude, un modèle de transection chirurgicale du ligament croisé antérieur (ACLT) chez les genoux de lapin a été choisi puisqu'il s'agit d'un modèle de PTOA bien établi aboutissant au développement d'OA induite par l'instabilité créée (Mansour et al., 1998). L'ACLT chez le lapin, est un des modèles les plus appropriés d'OA précoce chez l'homme (Madry et al., 2016). Il a été largement utilisé pour évaluer les premiers changements structurels dans le cartilage, l'os sous-chondral et le ménisque (Florea et al., 2015; Hellio Le Graverand et al., 2001; Levillain et al., 2015, 2017a, 2017b; Mäkelä et al., 2014).

A1.2 Traitement par viscosupplémentation

La viscosupplémentation est une thérapie intra articulaire préconisée chez les patients souffrant d'arthrose symptomatique. Ce traitement consiste à injecter de l'acide hyaluronique directement dans l'articulation concernée (Figure 4.1) et est utilisé chez l'homme depuis plus de 30 ans, principalement dans le genou, mais aussi de manière croissante dans d'autres articulations (la hanche, l'épaule, la cheville et le pouce) (Legré-Boyer, 2015).

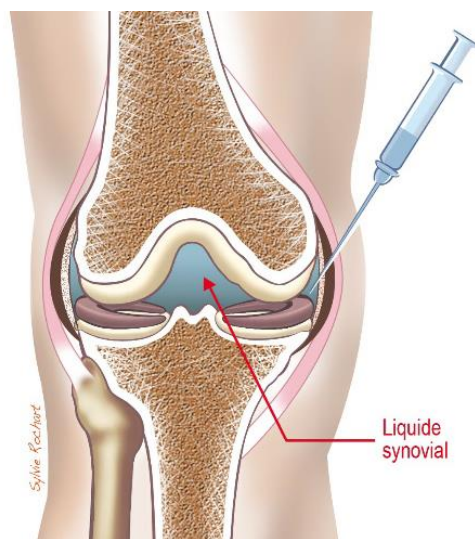


Figure 4.1 | L'acide hyaluronique est injecté directement dans l'articulation
(<http://www.centre-orthopedique-santy.com/site/patients/fiches/arthrose-je-m-informe-sur-la-viscosupplementation.htm>)

Son objectif principal est de pallier la perte d'acide hyaluronique et potentiellement de stimuler sa production endogène (Strauss et al., 2009), et ainsi rétablir un environnement rhéologique normal dans le LS (Balazs and Denlinger, 1993). La viscosupplémentation possède différents mécanismes d'action par ses effets anti-inflammatoires, anabolisants, analgésiques et chondroprotecteurs (Watterson and Esdaile, 2000).

La viscosupplémentation a démontré une efficacité modérée mais significative (20%) par rapport au placebo en termes de douleur et de fonction, avec un taux élevé de répondants (60-70%) dans l'arthrose du genou (Legré-Boyer, 2015). Plusieurs études ont montré des résultats prometteurs de ce traitement sur le cartilage, réduisant les lésions et stimulant la synthèse de protéoglycanes, mais aussi pour ralentir la progression de la maladie (Clegg et al., 2013; Goldberg and Buckwalter, 2005).

Plusieurs produits de viscosupplémentation existent sur le marché différant par leur poids moléculaire (de 0,5 à 6 MDa), leur origine (bactérienne ou aviaire), leur structure (linéaire ou réticulée). Pour cette étude, le Synvisc one® (Hylane G-F 20) a été choisi. Hylane G-F 20 est un liquide stérile, viscoélastique contenant les polymères réticulés hylane A et hylane B, produits à partir d'un extrait aviaire hautement purifié, dans une solution physiologique de chlorure de sodium tamponnée. Les hylanes sont des dérivés de l'hyaluronane (l'hyaluronate de sodium). L'hylane A, constituant 80% de la solution, est une molécule soluble à haut poids moléculaire (6 MDa) et l'hylane B, composant les 20% restant, est un gel hydraté insoluble (fiche de pharmacie Vidal).

L'avantage de ce produit est sa forme réticulée, qui permet un temps de résidence plus long dans l'articulation que celui des produits linéaires, grâce notamment à l'hylane B, dont l'insolubilité retarde son élimination de l'articulation. Ainsi, la demi-vie de l'Hylane G-F 20 a été estimée à 40 h chez le lapin alors que celui d'une formulation linéaire n'excède pas 24 h (Migliore et al., 2010).

A2. Matériel et méthodes

Toutes les expérimentations et procédures impliquant des animaux ont été approuvées par le Comité d'éthique (ComEth Anses/ENVA/UPEC numéro 16) et ont été réalisées en accord avec la législation de la Communauté Européenne. Dans cette étude, vingt-huit lapins adultes mâles White New Zealand, élevés par des vendeurs agréés (EUROLAP, Gosné, France et Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), répartis dans plusieurs groupes distincts ont été utilisés. Tous les lapins étaient en bonne santé, âgés de 6 à 10 mois, de poids moyens $4 \pm 0,4$ kg.

A2.1 Procédure chirurgicale

Après deux semaines d'acclimatation et de quarantaine, l'arthrose a été induite chirurgicalement par transection du LCA (ACLT) par un chirurgien vétérinaire qualifié de l'école vétérinaire de Maisons-

Alfort, dans le genou droit de vingt-quatre lapins. Avant la fermeture de la capsule articulaire, une dislocation horizontale manuelle (test du tiroir antérieur) a été effectuée pour attester de la rupture complète du LCA. La chirurgie a été effectuée sous anesthésie générale pour une durée de 40 minutes par une injection intramusculaire d'un anxiolytique (Valium à 0,5mg/kg soit 0,1ml/kg), d'un sédatif analgésique (Domitor à 0,25mg/kg soit 0,292ml/kg) et d'un anesthésique (Ketamine à 50mg/kg soit 0,5ml/kg) ce qui représente un volume intramusculaire injecté de 2ml pour toute l'anesthésie réparti en 1ml dans chaque cuisse avec aiguille de 25G au niveau du quadriceps. Ce protocole permet la ventilation spontanée de l'animal qui ne nécessite donc pas d'être intubé. Le genou gauche n'a pas été opéré. Pour limiter la douleur, une analgésie post-opératoire a été mise en place sans attendre les premiers signes de réveil par un antalgique en sous cutanée (Métacam à la dose 0,3mg/kg) pendant 3 jours suivi d'un antalgique en solution buvable (Métacam à la dose de 0,3mg/kg) pendant encore 3 jours.

Six autres lapins n'ont pas été opérés et ont servi de témoins et sont appelés groupe Sain par la suite.

Parmi les vingt-quatre lapins opérés, deux groupes de six lapins ont reçu une injection intra-articulaire d'acide hyaluronique Synvisc One® dans le genou droit opéré :

- ➔ Le groupe Opéré Traité 2sem a reçu une première injection de 300 µl immédiatement après l'opération, puis une deuxième injection de 300 µl une semaine après ACLT
- ➔ Le groupe Opéré Traité 6sem a reçu une unique injection de 300 µl dans le genou droit, deux semaines après l'ACLT

Deux lapins ont été exclus de l'étude en raison pour l'un de son comportement anormal (Groupe Opéré Traité 6sem) et pour l'autre d'une infection qui a empêché le chirurgien de récupérer proprement les parties anatomiques (Groupe Opéré Traité 2sem). Au total, l'étude porte donc sur vingt-huit lapins. La liste des groupes, des lapins les composant et des jalons d'intervention sont détaillés dans le Tableau 4.1.

n°	Groupe	Semaine 0	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 6
LP1 ... LP6	Témoin sain non opéré (n=6)				Prélèvement
LP7 ... LP12	Opéré 2sem (n=6)	ACLT		Prélèvement	
LP13 ... LP17	Opéré Traité 2sem (n=5)	ACLT + Injection HA	Injection HA	Prélèvement	
LP18 ... LP23	Opéré 6sem (n=6)	ACLT			Prélèvement
LP24 ... LP28	Opéré Traité 6sem (n=5)	ACLT		Injection HA	Prélèvement

Tableau 4.1 | Liste des groupes et des lapins utilisés dans cette étude avec les jalons d'intervention.

Les animaux étaient hébergés individuellement et les lapins ont été autorisés à se déplacer librement dans leurs cages, sans que le membre opéré n'ait été immobilisé après l'intervention chirurgicale ou après les injections.

A2.2 Collecte des échantillons

Après une période d'observation, tous les lapins ont été euthanasiés après d'une sédation profonde par une méthode non invasive (Inhalation d'Isoflurane). La mise à mort a été effectuée par injection intracardiaque d'une solution de barbiturique (pentobarbital), Dolethal® (5ml). Les euthanasies ont été pratiquées à différents temps d'étude :

- ➔ Les lapins des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem ont été euthanasiés 2 semaines après l'ACLT.
- ➔ Les lapins des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem ont été euthanasiés 6 semaines après l'ACLT.
- ➔ Les lapins du groupe Sain (témoin non opéré) ont été euthanasiés le même jour que les lapins des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem.

Les LS ont été prélevés en totalité par arthrocentèse (aiguille 20G, seringue 5 ml) dans les genoux qui ont ensuite été explantés et disséqués pour récupérer les ménisques médiaux et latéraux, les fémurs et les tibias. Tous les échantillons ont été photographiés après collecte.

A2.3 Evaluation macroscopique

L'aspect macroscopique du LS a été noté, notamment la couleur pour vérifier la présence de sang et le volume de LS prélevé a été déterminé. Les dégradations des ménisques et des cartilages ainsi que la formation d'ostéophytes ont été gradés macroscopiquement par deux examinateurs en aveugle, selon l'échelle développée par Laverty et al. (Laverty et al., 2010) et présentée Tableau 4.2. Pour le groupe Sain, seuls les genoux droits ont été gradés. Pour tous les autres groupes, les genoux opérés et contralatéraux ont été gradés.

Ménisque (surface fémorale)
1 : Normal 2 : Fibrillation minimale 3 : Fibrillation modérée, pas de lésions 4 : Fibrillation sévère, lésions incomplètes 5 : Lésions complètes, anses de seau, ou lésions incomplètes multiples
Cartilage articulaire (condyles tibial et fémoral)
0 : Surface lisse de couleur normale 1 : Surface rugueuse avec une fibrillation minimale ou une légère décoloration jaunâtre 2 : Erosion du cartilage s'étendant dans les couches superficielles ou intermédiaires 3 : Erosion du cartilage s'étendant dans les couches profondes 4 : Erosion complète du cartilage exposant l'os sous-chondral
Formation d'ostéophyte (plateau tibial, condyles fémoral et trochlée)
0 : Absence 1 : Légère 2 : Modérée 3 : Sévère

Tableau 4.2 | Scores utilisés pour l'évaluation macroscopique de la gonarthrose (Laverty et al., 2010).

Après avoir été photographiés et gradés, tous les échantillons ont été congelés. Les échantillons de LS ont été placés dans des tubes Eppendorf® non stériles hermétiques, correctement identifiés et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les autres pièces anatomiques ont été placées dans des compresses imbibées de PBS dans des récipients individuels et stockées à -20°C.

A2.4 Analyses statistiques

Dans cette étude, tous les tests statistiques ont été réalisés dans Matlab avec les outils « Statistics and Machine Learning Toolbox ». Pour comparer les différents groupes, des tests statistiques non paramétriques de Kruskal-Wallis ont été utilisés avec un seuil de significativité standard de 0,05 ($p < 0.05$), suivis de tests de Mann-Whitney pour les comparaisons par paires.

A3. Résultats

A3.1 Prélèvement de LS

Dans tous les groupes, hormis le groupe Sain, la totalité du LS a pu être prélevé. Leur couleur variait entre jaune (couleur normale), orange (présence de sang diffus), rose (présence de traînées de sang) à rouge. Seuls quelques échantillons de LS n'ont pu être exploités car les volumes étaient trop faibles pour pouvoir faire un dépôt de 12 μl ou car ils contenaient trop de sang masquant le signal Raman du LS. Au total, vingt échantillons ont pu être exploités.

Les volumes de LS ont été déterminés (Tableau 4.3).

Volumes (μl)	Opéré 2sem (n=6)	Opéré Traité 2sem (n=4)	Opéré 6sem (n=6)	Opéré Traité 6sem (n=4)
Moyenne	249,8	263,5	112,2	94,2
σ (\pm)	124,2	122,8	75,0	78,2

Tableau 4.3 | Volumes de LS prélevés.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem, ni entre les groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem. Par contre, le volume de LS est plus important après 2 semaines ($255,3 \pm 123,8 \mu\text{l}$) qu'à 6 semaines ($105,0 \pm 78,2 \mu\text{l}$), de manière significative ($p = 0,0125$).

A3.2 Scores macroscopiques

Les moyennes des scores macroscopiques attribués aux dégradations des ménisques, cartilage et formation d'ostéophytes dans le compartiment médial droit sont données, pour tous les groupes, dans le Tableau 4.4.

Groupes	Ménisque	Cartilage		Ostéophyte			Score global	
		Tibia	Fémur	Tibia	Condyle	Trochlée	Moyenne	σ (\pm)
Sain (n=6)	1,00	1,00	0,17	0,33	0,00	0,00	2,50	0,76
Opéré 2sem (n=6)	1,00	1,08	0,33	0,25	0,17	0,17	3,00	1,10
Opéré Traité 2sem (n=5)	1,00	0,90	0,00	0,00	0,10	0,30	2,30	0,40
Opéré 6sem (n=6)	3,00	2,00	1,17	1,17	0,83	2,17	10,33	1,98
Opéré Traité 6sem (n=5)	1,00	1,00	0,40	1,60	0,40	2,60	7,00	1,67

Tableau 4.4 | Scores macroscopiques des ménisques, cartilages et de la formation d'ostéophytes
Moyennes des scores pour chaque pièces anatomiques et moyennes et écarts-types des scores globaux pour chaque groupe (le score global correspond à la somme des scores).

La Figure 4.2 permet de visualiser les différences de scores entre un lapin Sain dont les tissus articulaires ne présentent aucune altération et un lapin du Groupe Opéré 6sem dont les pièces anatomiques sont très dégradées.



Figure 4.2 | Photographies de ménisques et cartilages des condyles fémoraux, trochlée fémorale et plateau tibial
(a) LP1 : lapin du groupe Sain : aucune altération ; (b) LP20 : lapin du groupe Opéré 6sem : fibrillation du ménisque avec anse de seuil, érosion du cartilage, plusieurs ostéophytes.

Les histogrammes de la Figure 4.3 illustrent les résultats macroscopiques.

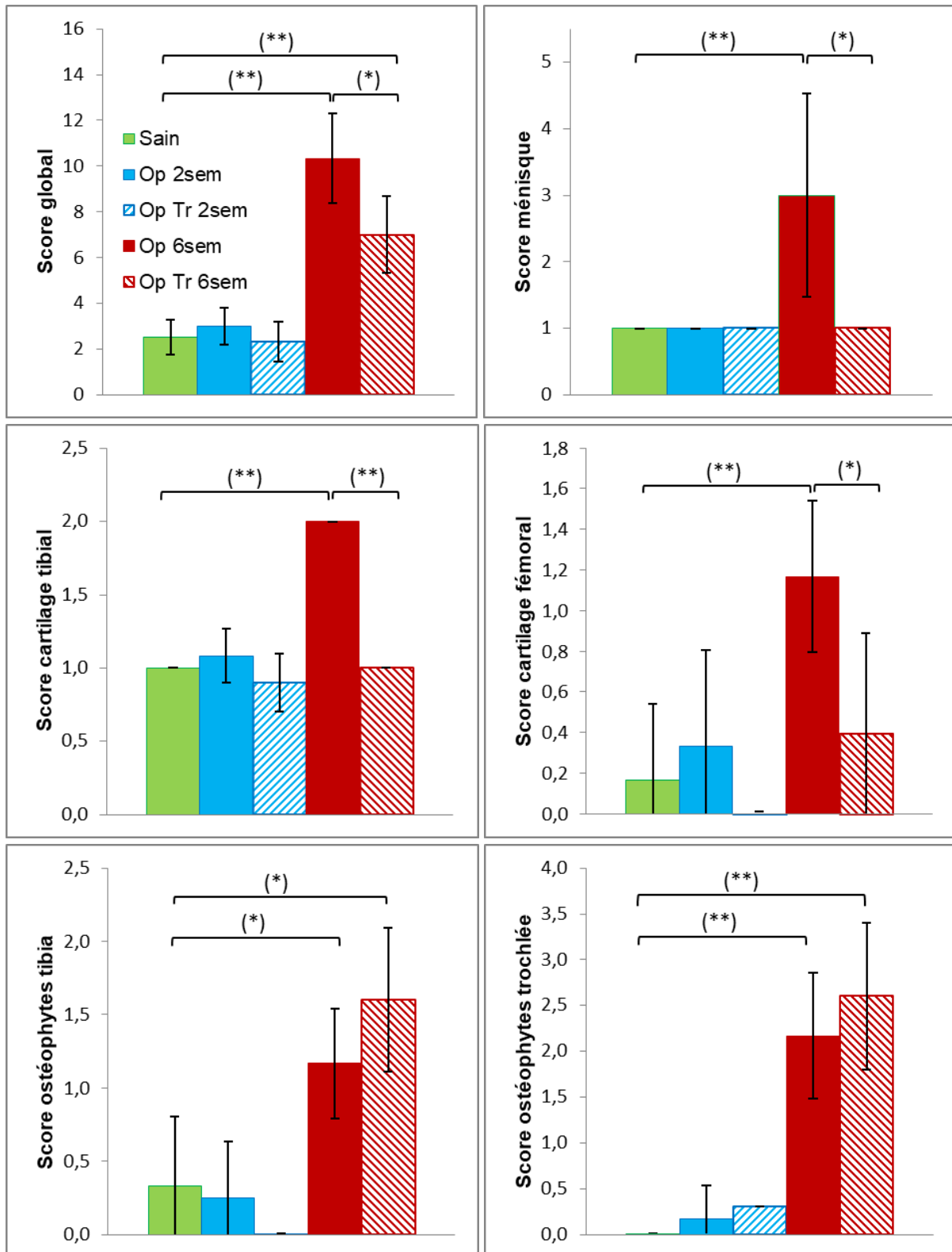


Figure 4.3 | Scores macroscopiques significatifs
 * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

Les genoux des lapins du groupe Sain sont caractérisés par des ménisques d'aspect normal (lisse et brillant), de rares dégradations du cartilage et quelques ostéophytes de taille minimale.

A un stade précoce, les genoux des lapins des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem présentent des ménisques sans fibrillation, des cartilages avec peu de lésions et très peu de formations d'ostéophytes. Il n'existe pas de différences significatives entre les scores des groupes Sain, Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem.

A 6 semaines d'arthrose, les lapins du groupe Opéré 6sem présentent des lésions méniscales avec différents degrés de gravité, des fibrillations et érosion du cartilage tibial et fémoral, ainsi que des ostéophytes. Tous les ménisques du groupe Opéré Traité 6sem ont un score minimal, avec une surface lisse et brillante, comme pour le groupe sain. Le score macroscopique pour la dégradation méniscale est significativement plus important pour le groupe Opéré 6sem que pour les groupes Sain et Opéré Traité 6sem ($p = 0,009$ et $p = 0,016$, respectivement). Il en est de même pour les scores du cartilage tibial ($p = 0,001$ et $p = 0,002$, respectivement) et fémoral ($p = 0,007$ et $p = 0,042$, respectivement). Par contre, les scores des ménisques et cartilage ne sont pas différents entre les groupes Sain et Opéré Traité 6sem. Par ailleurs, les scores macroscopiques pour la formation d'ostéophytes dans le plateau tibial et dans la trochlée sont significativement plus élevés pour le groupe Opéré Traité 6sem que pour le groupe Sain ($p = 0,015$ et $p = 0,003$, respectivement) ainsi que dans une moindre mesure pour le groupe Opéré 6sem ($p = 0,022$ et $p = 0,003$, respectivement).

Le score macroscopique global fait apparaître une plus forte dégradation de l'articulation dans le groupe Opéré 6sem que dans le groupe Sain ($p = 0,004$). Même si le traitement par viscosupplémentation permet au groupe Opéré Traité 6sem d'être moins altéré que le groupe Opéré 6sem ($p = 0,043$), les scores sont plus élevés que dans le groupe Sain ($p = 0,007$).

A4. Discussion

Cette partie montre les effets macroscopiques de l'évolution de l'OA et d'un traitement par viscosupplémentation sur le compartiment médial des genoux de lapins dont l'OA a été chirurgicalement induite par ACLT.

Le LS

L'augmentation de volume de LS constatée à 2 semaines est liée à la conjonction entre l'augmentation de volume lié au processus arthrosique (Hunter and Felson, 2006) et l'inflammation post-opératoire

due à la section des ligaments qui va s'estomper avec le temps. Une ACLT comme une rupture traumatique des LCA provoque un gonflement de l'articulation et donc une augmentation du LS (Cimino et al., 2010). L'étude de Bouchgua *et al.* a montré une augmentation significative de l'épanchement synovial à la suite d'une intervention chirurgicale, une ACLT, chez des lapins. Les volumes de LS étaient significativement plus élevés 2 semaines post-ACLT, ont culminé à 4 semaines post-ACLT, et sont demeurés élevés jusqu'à 8 semaines post-ACLT avant de revenir à un niveau proche de la normale à 12 semaines post-ACLT (Bouchgua et al., 2009a).

Les tissus viscoélastiques

L'évaluation macroscopique a montré que les ménisques et cartilages articulaires, traités ou non traités, ne présentaient aucune dégradation à 2 semaines, se traduisant par des scores similaires à ceux obtenus sur les lapins sains. Les ménisques étaient d'aspect normal, lisses et brillants, et de rares dégradations du cartilage et quelques ostéophytes ont pu être observés à ce stade du développement de la pathologie.

La situation était toute autre 6 semaines post-ACLT puisque toutes les articulations présentaient des tissus très dégradés, comme attendu dans ce modèle : les ménisques du groupe opéré non traité montraient des signes manifestes de fibrillation ou de déchirure, les cartilages étaient érodés et des ostéophytes visibles.

Comme chez l'homme, la rupture du LCA chez les lapins modifie leur démarche et induit une cinématique articulaire anormale. La section du LCA autorise des mouvements antéro-postérieurs et rotatifs anormaux, engendrant des conditions de chargement altérées, associées à des pressions de contact et des répartitions de contraintes modifiées, sans que le cartilage ait le temps de s'y adapter (Florea et al., 2015; Mäkelä et al., 2014; Mansour et al., 1998). L'instabilité mécanique ainsi créée permet d'initier une série de changements biochimiques, métaboliques et mécaniques dans les tissus articulaires reproduisant les changements histologiques et morphologiques proches de ceux observés dans l'OA humaine post-traumatique (Bendele, 2001; Florea et al., 2015; Laverty et al., 2010; Setton et al., 1994). Ces changements, pouvant apparaître entre 3 et 6 semaines post-ACLT, incluent la fibrillation et l'augmentation de la rugosité de la surface articulaire et l'altération de l'organisation des fibres de collagène, dans le cartilage comme dans le ménisque, l'épaississement des capsules

articulaires et la formation d'ostéophytes (Setton et al., 1999). Nos scores macroscopiques à 6 semaines se révèlent ainsi conformes à ces changements.

La viscosupplémentation

A contrario, l'injection intra-articulaire d'acide hyaluronique à 2 semaines dans les genoux des lapins examinés 6 semaines après induction de l'OA montrent sans équivoque une amélioration de l'état de surface des cartilages et ménisques. Ces résultats confirment l'effet bénéfique de la viscosupplémentation dans l'amélioration de la lubrification du genou arthrosique et donc sur la protection des ménisques et cartilages (Moreland, 2003; Strauss et al., 2009).

Cependant, on remarque que le traitement n'a pas eu d'effet sur la formation d'ostéophytes dont les scores sont supérieurs, sans être significatifs, à ceux obtenus dans le groupe non traité. Ce résultat est à comparer à l'étude réalisée par Li *et al.* portant sur l'effet de trois injections intra-articulaires hebdomadaires administrées 4 semaines post-ACLT à des lapins. Les scores du cartilage et la taille des ostéophytes ont été évalués à 1, 4 et 8 semaines après les injections. Bien que les scores des ostéophytes régressent à 4 semaines par rapport à un groupe de lapins non traités, les scores à 8 semaines sont identiques (Li et al., 2012).

Beaucoup d'études reconnaissent les effets analgésiques bénéfiques de la viscosupplémentation. Cependant, d'autres études pointent du doigt cet effet analgésique qui induit finalement une surutilisation de l'articulation : la douleur ayant disparue ou étant atténuée, il n'y a plus de report de charge sur le membre contralatéral qui soulageait l'articulation pathologique (Herrero-Beaumont et al., 2001). Cela pourrait expliquer l'augmentation du nombre d'ostéophytes dans la patte opérée traitée dont l'articulation dégradée subirait des charges anormalement élevées (Ko et al., 2013).

Ces résultats soulignent la nécessité de diagnostiquer l'arthrose à un stade précoce, c'est-à-dire avant l'apparition de modifications structurelles, et de développer des traitements pour prévenir ces dégradations. Néanmoins, malgré de nombreux essais cliniques, l'efficacité de la viscosupplémentation reste matière à débat avec des interprétations discordantes. Parmi les méta-analyses publiées, certaines ont conclu à un effet bénéfique global pour les injections d'acide hyaluronique, d'autres ont rapporté un petit avantage tandis que d'autres n'ont trouvé aucune preuve

de l'efficacité de la thérapie (Ayhan et al., 2014). Ces résultats contradictoires peuvent être liés en partie aux différentes formulations d'acide hyaluronique disponibles, aux différents temps et nombre d'injections mais aussi à la sévérité des lésions déjà formées (Strauss et al., 2009).

Synthèse

En conclusion, la caractérisation macroscopique des LS et tissus articulaires a mis en évidence :

- ➔ Alors que le volume de LS est quasi nul dans les pattes du groupe Sain, une augmentation très nette du volume de LS a été remarquée à 2 semaines post-ACLT suivie d'une baisse significative à 6 semaines d'OA.
- ➔ Aucune modification macroscopique n'est visible sur les différents tissus articulaires 2 semaines après l'intervention. Elles deviennent nettement significatives 6 semaines post-ACLT avec des dégradations cartilagineuses et méniscales ainsi que des formations d'ostéophytes importantes.
- ➔ Le traitement par injection intra-articulaire d'acide hyaluronique produit des améliorations visibles même si les tissus ne sont pas réparés.

Partie B : Evolution des propriétés viscoélastiques des tissus articulaires OA

La partie précédente a démontré que les dégradations macroscopiques des tissus viscoélastiques ne deviennent visibles que 6 semaines après l'induction de l'OA et que le traitement par viscosupplémentation a un impact positif sur leur aspect macroscopique.

L'objectif de la présente partie est de vérifier si les scores macroscopiques sont corrélés aux propriétés mécaniques des cartilages et des ménisques pour les différents groupes investigués. Pour cela, les propriétés viscoélastiques des cartilages et des ménisques des pattes opérées des différents groupes vont être mesurées par des tests d'indentation-relaxation.

B1. Les propriétés viscoélastiques

Un matériau viscoélastique est un matériau dont le comportement mécanique dépend du temps. Ce comportement peut-être décrit par deux types phénomènes : i) le fluage qui consiste à soumettre le matériau à une contrainte constante et à observer l'augmentation de sa déformation au cours du temps ; ii) la relaxation qui consiste au contraire à imposer au matériau une déformation constante et à observer la diminution de la contrainte au cours du temps.

Le comportement viscoélastique des tissus articulaires, plus particulièrement ménisque et cartilage, est lié à l'interaction entre la phase solide, et la phase fluide, qui les constituent, avec à la fois la mise en pression du fluide, l'écoulement du fluide et la déformation de la matrice (Levillain et al., 2017a; Setton et al., 1999; Sophia Fox et al., 2009). Cette nature viscoélastique est ici caractérisée par le module instantané, caractérisant la rigidité du matériau pour des fortes vitesses de déformation (comportement dynamique), ainsi que le module à l'équilibre, caractérisant la rigidité du matériau pour des faibles vitesses de déformation (comportement quasi statique).

Ces paramètres viscoélastiques en compression sont classiquement identifiés à partir d'un essai d'indentation – relaxation. 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 et de dimensions connues, dans un matériau et à enregistrer le signal force – déplacement. Le test d'indentation-relaxation consiste à maintenir la pénétration et à enregistrer la décroissance de la force au cours du temps. Il existe plusieurs modèles rhéologiques pour caractériser un matériau viscoélastique, sous la forme d'un ensemble de ressorts et d'amortisseurs en série ou en parallèle. Dans cette étude, le modèle de Maxwell généralisé (aussi nommé modèle de Weichert) a été choisi pour comparer les propriétés mécaniques des tissus articulaires pour les différents groupes. Dans ce modèle, détaillé par Levillain *et al.* (Levillain *et al.*, 2017a), plusieurs couples de ressorts et d'amortisseurs en séries, sont mis en parallèle, caractérisant respectivement son élasticité et sa viscosité (Figure 4.4).

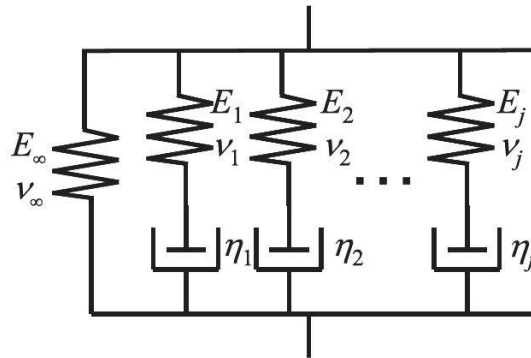


Figure 4.4 | Schéma représentant le modèle de Maxwell généralisé à N branches
E et *v* sont respectivement le module de Young et le coefficient de Poisson de chaque ressort, η est la viscosité de chaque amortisseur. Une branche est un couple ressort – amortisseur (Chen *et al.*, 2012).

Le module viscoélastique est alors décrit avec une somme d'exponentielles, appelée séries de Prony (Equation 4.1) :

$$G(t) = G_0 + \sum_{i=1}^n G_i \exp(-t/\tau_i) \quad (4.1)$$

où G_0 est le module de cisaillement à l'équilibre, G_i représentent les paramètres de relaxation, τ_i les constantes de temps ($\tau_i = \eta_i/E_i$) et n le nombre de branches du modèle.

Dans le cas d'un matériau viscoélastique, où le comportement du matériau dépend du temps, le module viscoélastique peut être identifié lors d'un essai d'indentation-relaxation lors de la phase de maintien de la pénétration, à partir de la relation (Equation 4.2) :

$$F(t) = \frac{8\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \int_0^{t_c} G(t-s) \frac{dh(s)^{3/2}}{ds} ds \quad (4.2)$$

Où F est la force décroissante mesurée lors de la phase de maintien, R le rayon de la pointe d'indentation, h la pénétration, ν le coefficient de Poisson du matériau et t_c est le temps de charge.

Les modules instantanés et à l'équilibre peuvent être calculés à partir des équations (4.3) et (4.4) :

$$E_{ins} = 2(1+\nu) \left(G_0 + \sum_{i=1}^n G_i \right) \quad (4.3)$$

$$E_{eq} = 2(1+\nu)G_0 \quad (4.4)$$

La fraction élastique, f , a ensuite été calculée comme le rapport du module à l'équilibre sur le module instantané (Equation 4.5). Cette fraction élastique décrit la viscosité du matériau : $f = 1$ correspond à un matériau parfaitement élastique, tandis que $f = 0$ correspond à un matériau parfaitement visqueux.

$$f = \frac{E_{eq}}{E_{ins}} \quad (4.5)$$

B2. Matériel et méthodes

B2.1 Préparation des échantillons

Les caractérisations des tissus viscoélastiques, ménisques et cartilages articulaires, ont été menées sur les tissus du compartiment médial car la littérature montre qu'ils sont plus affectés macroscopiquement après une ACLT chez le lapin (Florea et al., 2015; Hellio Le Graverand et al., 2001; Levillain et al., 2015; Mäkelä et al., 2014; Yoshida et al., 2013).

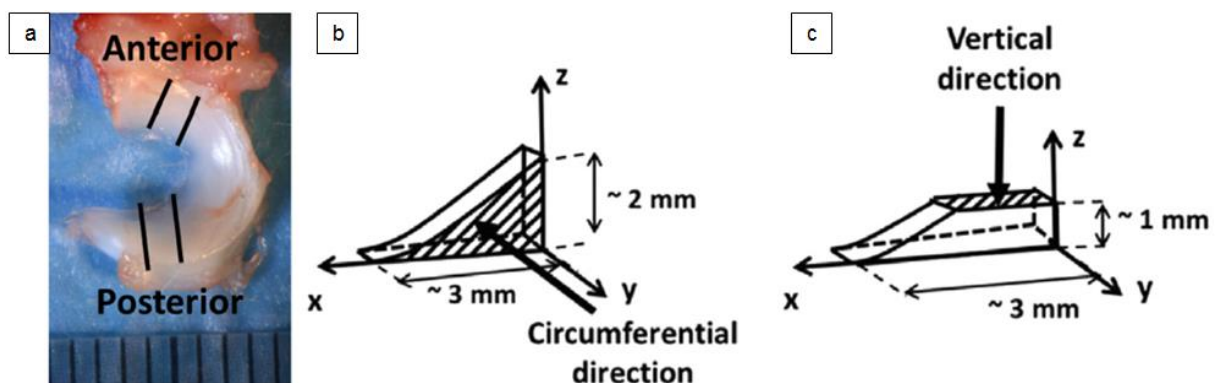
Le protocole d'expérimentation et d'analyse pour la détermination des propriétés des ménisques a été établi et standardisé par A. Levillain au cours de sa thèse au LTDS (Levillain, 2016) et a fait l'objet de

trois publications (Levillain et al., 2015, Levillain et al., 2017a, Levillain et al., 2017b). Au cours de sa thèse, A. Levillain, a caractérisé le comportement viscoélastique des ménisques des groupes Sain, Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem. Dans la suite du manuscrit, les valeurs obtenues par A. Levillain pour ces 3 groupes seront inclus dans les résultats. Le protocole d'expérimentation et d'analyse pour la détermination des propriétés des cartilages est basé sur celui des ménisques.

B2.1.1 Les ménisques

Les ménisques médiaux des pattes opérées des groupes Sain, Opéré 2sem, Opéré Traité 2sem, Opéré 6sem, Opéré Traité 6sem (n=28) ont été caractérisés.

Les ménisques ont été décongelés à 4°C pendant 24h avant caractérisation. Une tranche de 2 mm d'épaisseur est coupée avec un scalpel dans les régions antérieure et postérieure (Figure 4.5a et b). Chacune des deux tranches est ensuite coupée parallèlement à la face tibiale, environ 1 mm sous la surface (Figure 4.5c).



Les propriétés mécaniques des ménisques médiaux ont été déterminées sur le plan horizontal coupé (face fémorale hachurée de la Figure 4.5c), selon la direction verticale.

B2.1.2 Les cartilages articulaires

Les cartilages articulaires des condyles fémoraux médiaux des pattes opérées des groupes Sain, Opéré 2sem, Opéré Traité 2sem, Opéré 6sem, Opéré Traité 6sem (n=28) ont été caractérisés.

Les fémurs ont été décongelés à 4°C la nuit précédant leur caractérisation. La région d'intérêt était la zone la plus mise en charge du condyle médial, définie comme étant au sommet de la courbure postérieure comme décrit précédemment par Mäkelä *et al.* (Mäkelä *et al.*, 2014). Pour cela, les fémurs ont été coupés à la scie de manière à isoler les sommets des condyles (Figure 4.6 a). Puis, les deux condyles fémoraux ont été séparés pour ne retenir que la partie médiale (Figure 4.6 b). Les propriétés mécaniques des cartilages médiaux ont été mesurées dans la direction matérialisée par la flèche bleue de la Figure 4.6a dans la région d'intérêt de la Figure 4.6 b aux points d'indentation représentés Figure 4.6c.

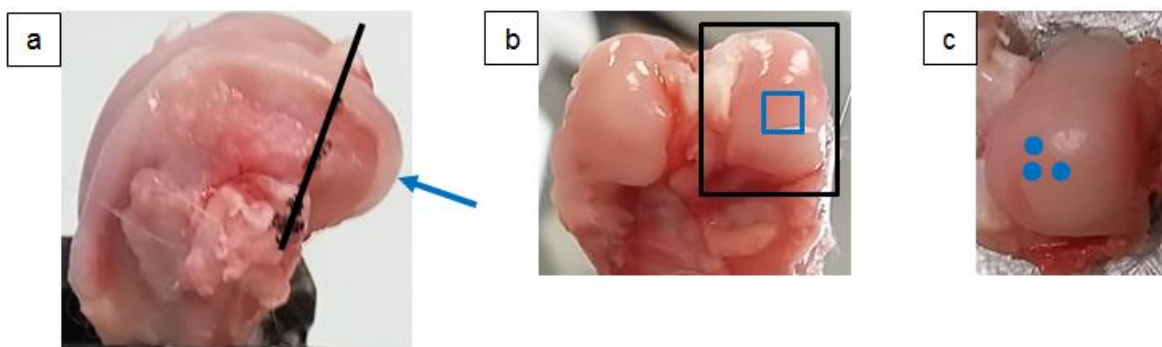


Figure 4.6 | Préparation du cartilage pour caractérisation
(a) Photo du profil latéral de l'extrémité distale d'un fémur sain (genou droit), la ligne noire correspond à la coupe réalisée pour indenter le cartilage dans la région mise en charge, la flèche bleue correspond à la direction d'indentation; (b) Photo de face de l'extrémité distale d'un fémur, la partie médiale est encadrée en noir et le cadre bleu correspond à la région d'intérêt; (c) Photo du condyle fémoral médial, les points bleus correspondent aux points d'indentation au sommet du condyle.

B2.2 Tests d'indentation-relaxation

Les tests d'indentation-relaxation ont été réalisés au sein du laboratoire LTDS sur le nanoindenteur de la plateforme IVTV (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France). L'ensemble des essais a été effectué à température ambiante immergés dans une solution saline. Pour éviter les phénomènes d'adhésion entre la pointe et l'échantillon, et pour assurer l'hydratation des tissus, les essais sont réalisés en milieu liquide, avec une pointe sphérique saphir de rayon 0,479 mm.

Le cycle d'indentation appliqué à l'échantillon est composé d'une charge, d'un maintien de la pénétration et d'une décharge.

Par ailleurs, comme réalisé classiquement en nanoindentation, un matériau de référence en caoutchouc a été indenté avant chaque série de tests pour étalonner l'appareil.

B2.2.1 Les ménisques

La face tibiale des échantillons, a été collée sur un support aluminium (Glue 3, Loctite®). Les tests d'indentation ont été effectués en trois points espacés de 200 μm minimum, répétés trois fois ($n=9$ indentations pour chaque échantillon). Les paramètres d'indentation utilisés étaient les suivants : une vitesse de déplacement constante de 5 $\mu\text{m/s}$ et une pénétration de 100 μm pour éviter les effets de perturbation de la surface et des fibres. Le contact avec l'échantillon a été défini à partir d'une pente de 5 N/m dans la courbe charge / déplacement, correspondant à une forte augmentation de la raideur de contact. Le déplacement de l'indenteur a ensuite été maintenu pendant 400s jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. La décharge a été effectuée à 0,5 $\mu\text{m/s}$.

B2.2.2 Les cartilages articulaires

La face coté os trabéculaire a été collée sur un support aluminium (Glue 3, Loctite®). Les tests d'indentation ont été réalisés en trois points espacés de 200 μm . Les paramètres d'indentation étaient les suivants : une vitesse de déplacement constante de 5 $\mu\text{m/s}$ et une pénétration de 40 μm . Le contact avec l'échantillon a été défini à partir d'une pente de 32 N/m dans la courbe charge / déplacement, correspondant à une forte augmentation de la raideur de contact. Le déplacement de l'indenteur a ensuite été maintenu pendant 400s jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. La décharge a été effectuée à 0,05 $\mu\text{m/s}$.

B2.3 Modèle viscoélastique

Les propriétés viscoélastiques ont été déterminées à partir des courbes force / temps. L'équation (4.2) n'admet pas de solution analytique aussi la solution exacte a été approchée par un algorithme d'optimisation implémenté dans Matlab par A. Levillain (Levillain et al., 2017a). L'objectif de cet algorithme est de « fitter » la courbe expérimentale pour pouvoir en déduire les paramètres de relaxation. Pour cela, il utilise la méthode du point médian pour calculer l'intégrale (fonction *fmincon*). Les paramètres à déterminer sont le module à l'équilibre G_0 , les paramètres viscoélastiques G_i et τ_i , pour $i = 1..n$, où n le nombre de branches du modèle. Le coefficient de Poisson ν a été fixé à 0,49 en faisant l'hypothèse d'incompressibilité des tissus. Pour limiter la durée d'identification, on essaie de

réduire le nombre de paramètres dépendants. La Figure 4.7 illustre l'effet du nombre de branches sur la représentativité de la solution calculée.

L'écart entre la force expérimentale et la force obtenue avec le modèle diminue lorsque le nombre de branches augmente. Le choix du nombre de branches résulte d'un compromis entre le nombre de paramètres décrivant le comportement du matériau et l'erreur par rapport à la courbe expérimentale.

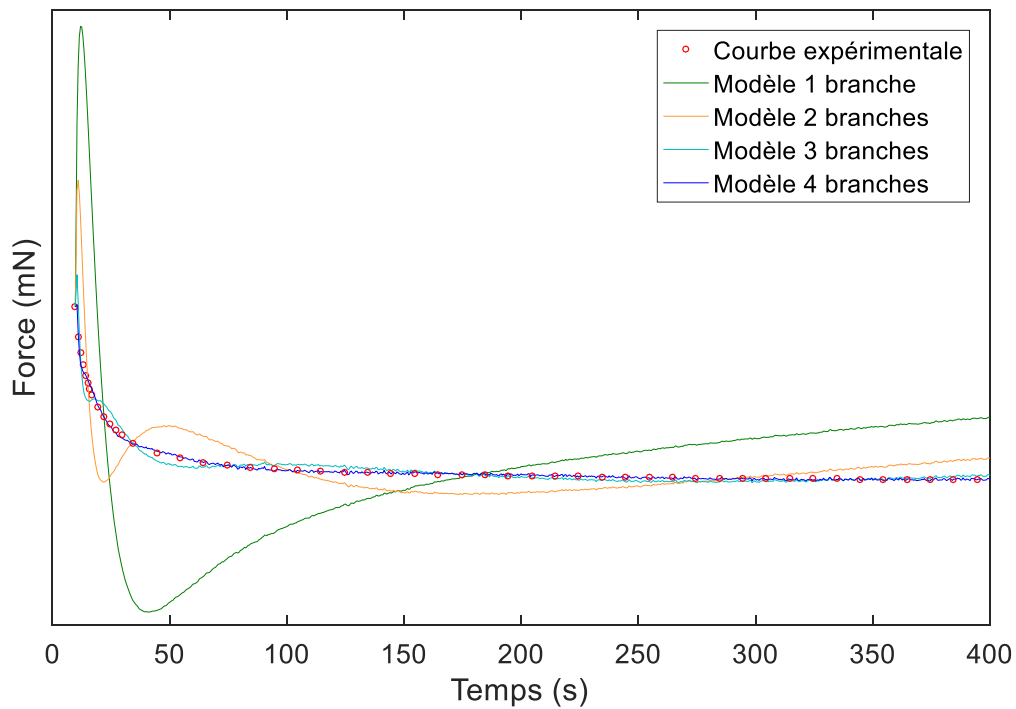


Figure 4.7 | Effet du nombre de branches dans le modèle viscoélastique (traits pleins) et comparaison avec la courbe expérimentale (pointillés) obtenus sur du cartilage.

Cette routine a servi à déterminer les modules des ménisques et des cartilages. Le nombre de branches pour déterminer les paramètres viscoélastiques des ménisques et des cartilages a été fixé respectivement à trois et à quatre branches. Les modules instantanés, modules à l'équilibre et fraction élastique déduits des équations (4.3) à (4.5) ont été calculés pour chaque indent et moyennés sur chaque échantillon.

B2.4 Analyses statistiques

Pour comparer les différents groupes, des tests statistiques non paramétriques de Kruskal-Wallis ont été réalisés dans Matlab avec un seuil de significativité standard de 0,05 ($p < 0.05$), suivis de tests de Mann-Whitney pour les comparaisons par paires. Les résultats sont illustrés sous forme de boîtes à moustache (ie. « box plot ») représentant médianes, quartiles et valeurs minimales et maximales.

B3. Résultats

B3.1 Propriétés viscoélastiques des ménisques

Les moyennes et écarts-types des modules instantanés, des modules à l'équilibre et des fractions élastiques pour les régions antérieures et postérieures et pour chaque groupe sont donnés dans le Tableau 4.5. Les modules de la région antérieure sont largement supérieurs aux modules de la région postérieure, ceci quels que soient les groupes.

Groupes	Ménisque antérieur						Ménisque postérieur					
	E _{ins} (MPa)		E _{eq} (MPa)		f		E _{ins} (MPa)		E _{eq} (MPa)		f	
	Moyenne	σ (+)	Moyenne	σ (+)	Moyenne	σ (+)	Moyenne	σ (+)	Moyenne	σ (+)	Moyenne	σ (+)
Sain (n=6)	2,88	1,01	0,60	0,18	0,22	0,03	0,67	0,32	0,14	0,06	0,21	0,02
Opéré 2sem (n=6)	1,77	0,77	0,45	0,16	0,28	0,06	0,62	0,21	0,15	0,03	0,24	0,04
Opéré Traité 2sem (n=5)	1,34	0,50	0,31	0,13	0,23	0,02	0,81	0,74	0,19	0,19	0,22	0,03
Opéré 6sem (n=6)	1,29	0,75	0,26	0,12	0,21	0,04	0,43	0,21	0,08	0,06	0,16	0,05
Opéré Traité 6sem (n=5)	1,30	1,25	0,26	0,25	0,18	0,06	0,42	0,07	0,07	0,05	0,14	0,04

Tableau 4.5 | Propriétés viscoélastiques des cinq groupes de ménisques
Modules instantanés, modules à l'équilibre et fractions : moyennes et écarts-types.

B3.1.1 Effet de l'évolution de la pathologie

Pour étudier l'effet du stade d'avancement de la pathologie, des tests statistiques ont été réalisés entre les groupes Sain, Opéré 2sem et Opéré 6sem (Figure 4.8).

Ces analyses ont montré que, dans la région antérieure, les modules instantanés décroissent progressivement de 38% à 2 semaines puis encore de 27% à 6 semaines. Le module à l'équilibre se comporte de même avec une baisse de 25% à 2 semaines puis de 43% à 6 semaines, devenant significativement plus faible qu'à l'état initial ($p = 0,026$). Dans la région postérieure, les modules à 2

semaines évoluent peu par rapport à l'état initial. Des différences significatives se sont manifestées entre 2 et 6 semaines pour le module à l'équilibre ($p = 0,041$) et la fraction élastique ($p = 0,041$).

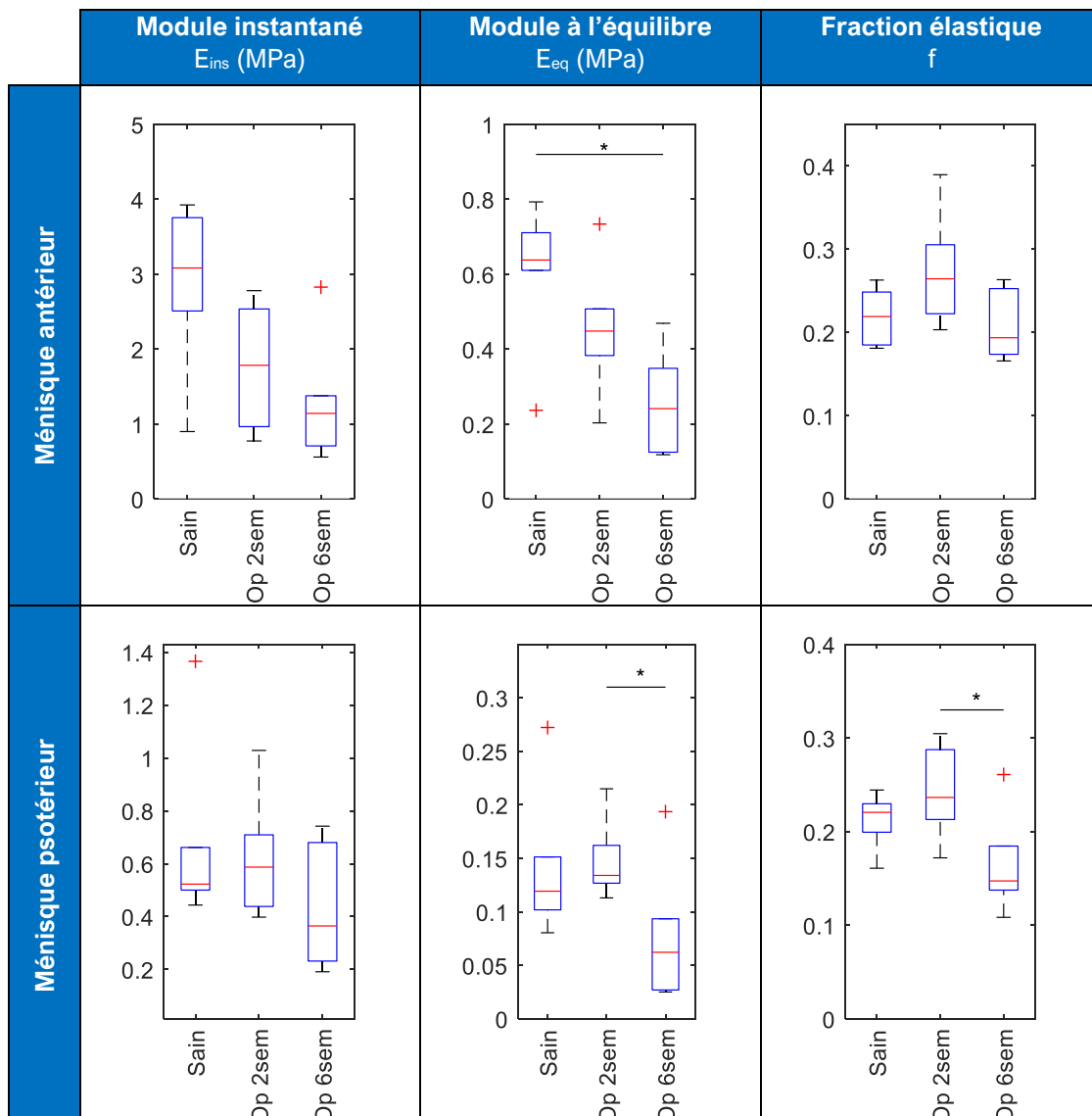


Figure 4.8 | Propriétés viscoélastiques des ménisques sains et opérés non traités
* ($p < 0,05$).

B3.1.2 Effet de la thérapie par viscosupplémentation

Pour étudier l'effet de la thérapie par viscosupplémentation, des tests statistiques ont été réalisés entre les groupes Sain, Opéré Traité 2sem et Opéré Traité 6sem (Figure 4.9).

Ces analyses ont montré que, dans la région antérieure, les modules instantanés décroissent drastiquement de 53% à 2 semaines. Le module à l'équilibre décroît également avec une baisse de 48% à 2 semaines puis de 17% à 6 semaines, devenant significativement plus faible qu'à l'état initial ($p = 0,017$). De grandes variations sont observées pour toutes les variables à 6 semaines. Dans la région

postérieure, les modules à 2 semaines évoluent peu par rapport à l'état initial. Les modules instantanés et à l'équilibre chutent ensuite respectivement de 48% et 64%. Ces diminutions ont un impact sur la fraction élastique qui devient significativement plus faible à 6 semaines qu'à 2 semaines ($p = 0,031$) et qu'à l'état initial ($p = 0,017$).

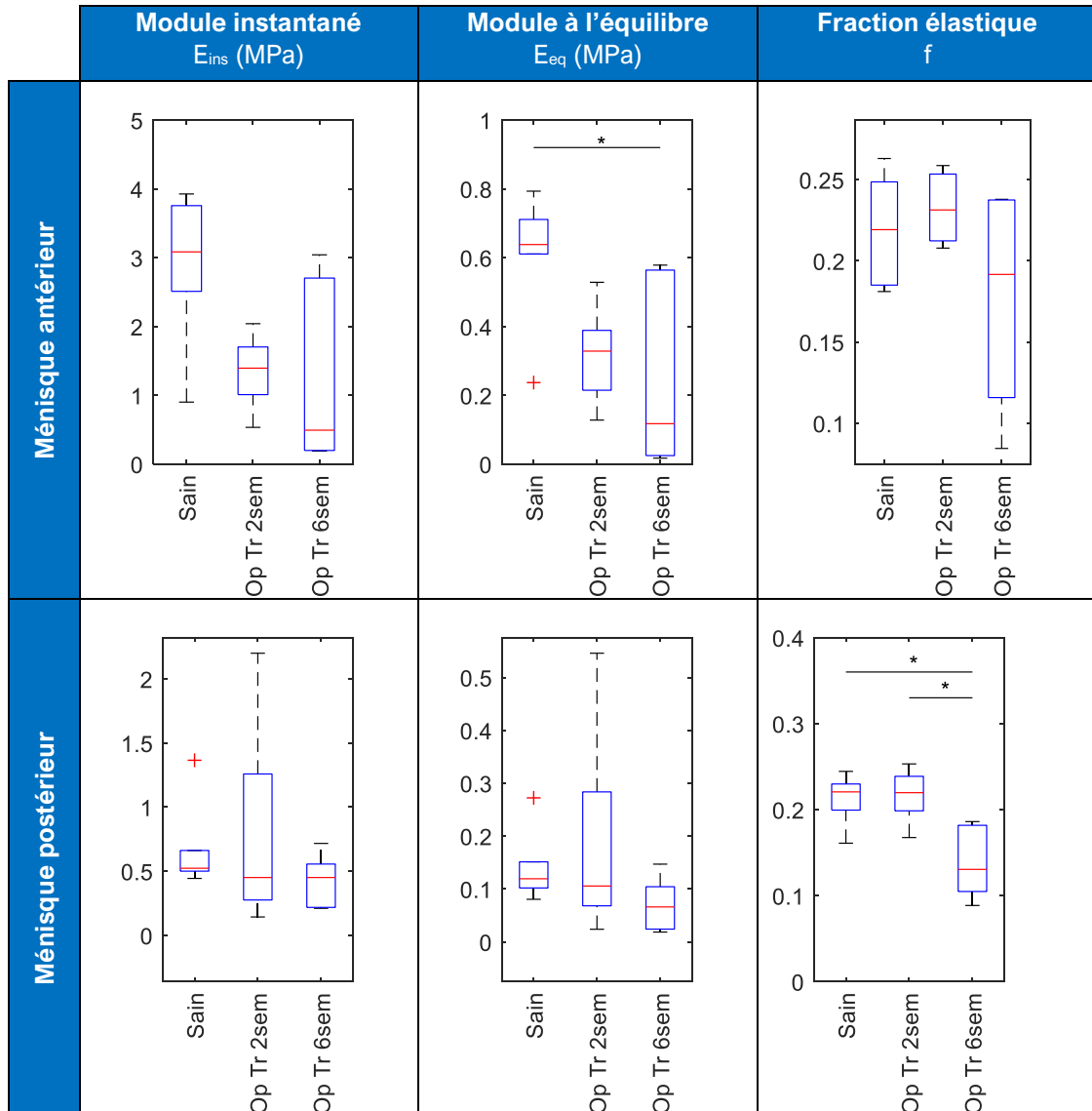


Figure 4.9 | Propriétés viscoélastiques des ménisques sains et opérés traités
* ($p < 0,05$).

B3.1.3 Analyse globale

On note que les valeurs des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem sont proches (Tableau 4.5). De même, les valeurs des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem sont du même ordre de grandeur, ce qui est confirmé par des tests de Mann-Whitney dont aucun n'est significatif.

Aussi, une analyse statistique plus globale a été menée. Les résultats des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem ont été rassemblés en un groupe nommé OA 2sem (n=11) et les résultats des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem ont été rassemblés en un groupe nommé OA 6sem (n=11) (Tableau 4.6). D'une manière générale, on observe qu'à 6 semaines, les modules sont quasiment réduits de moitié avec l'avancement de l'OA.

Groupes	Ménisque antérieur						Ménisque postérieur					
	E _{ins} (MPa)		E _{eq} (MPa)		f		E _{ins} (MPa)		E _{eq} (MPa)		f	
	Moyenne	σ (±)	Moyenne	σ (±)	Moyenne	σ (±)	Moyenne	σ (±)	Moyenne	σ (±)	Moyenne	σ (±)
Sain (n=6)	2,88	1,01	0,60	0,18	0,22	0,03	0,67	0,32	0,14	0,06	0,21	0,02
OA 2sem (n=11)	1,58	0,69	0,39	0,16	0,26	0,05	0,71	0,53	0,17	0,13	0,23	0,04
OA 6sem (n=11)	1,30	1,01	0,26	0,19	0,19	0,05	0,42	0,07	0,07	0,05	0,15	0,05
p-value	0,028		0,011		0,044		0,245		0,025		0,004	

Tableau 4.6 | Propriétés viscoélastiques des ménisques en fonction de l'évolution de la pathologie
Modules instantanés, modules à l'équilibre et fractions :
moyennes, écarts-type et p-value obtenues (tests de Kruskal-Wallis).

Les résultats sont illustrés Figure 4.10. Dans la région antérieure, les modules instantanés et les modules à l'équilibre chutent significativement dès 2 semaines respectivement de $2,88 \pm 1,01$ MPa à $1,58 \pm 0,69$ MPa ($p = 0,027$) et de $0,60 \pm 0,18$ MPa à $0,39 \pm 0,16$ MPa ($p = 0,048$). A 6 semaines, la diminution s'accroît par rapport au groupe Sain à $1,30 \pm 1,01$ MPa ($p = 0,020$) et $0,26 \pm 0,19$ MPa ($p = 0,005$). Cependant, aucune différence significative n'est constatée entre les groupes OA 2sem et OA 6sem. La fraction élastique évolue peu après 2 semaines, passant de $0,22 \pm 0,03$ à $0,26 \pm 0,05$ puis chute significativement à 6 semaines, atteignant $0,19 \pm 0,05$ ($p = 0,019$).

Dans la région postérieure, les modules à l'équilibre sont significativement plus bas dans le groupe OA 6sem que dans les groupes Sain et OA 2sem ($p = 0,027$ et $p = 0,019$, respectivement). Il en est de même pour la fraction élastique ($p = 0,014$ et $p = 0,002$, respectivement). On constate également une diminution importante bien que non significative du module instantané, passant de $0,71 \pm 0,53$ MPa à $0,42 \pm 0,19$ MPa. Cependant, les valeurs obtenues entre les groupes Sain et OA 2sem ne sont pas statistiquement différentes.

Finalement, cette analyse statistique globale a permis de souligner que les deux régions des ménisques évoluent différemment. Des modifications significatives sont enregistrées dès 2 semaines dans la région antérieure, alors que dans la région postérieure, les modifications apparaissent entre 2 et 6 semaines.

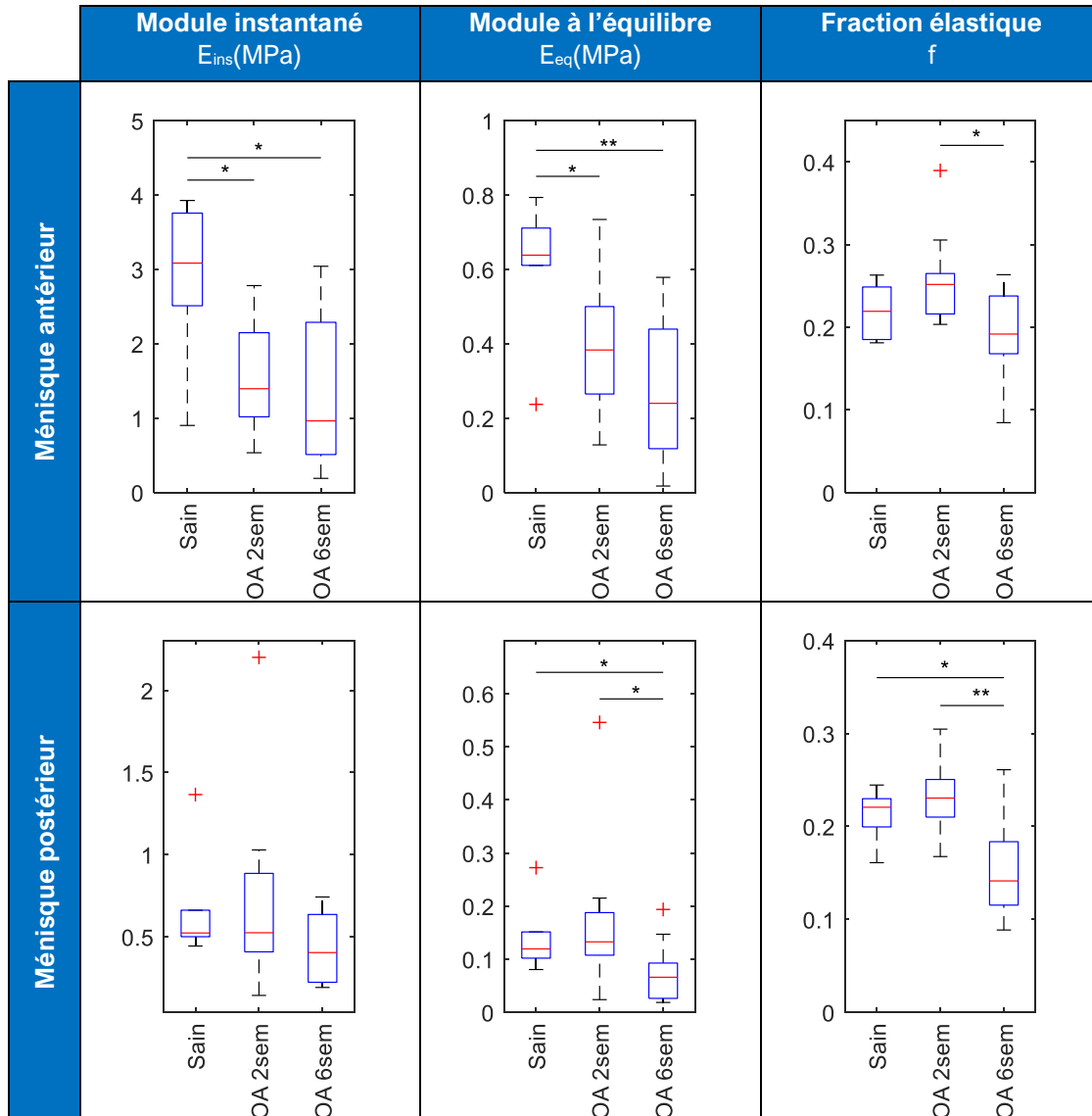


Figure 4.10 | Propriétés viscoélastiques des ménisques
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

B3.2 Propriétés viscoélastiques des cartilages articulaires

Les moyennes et écarts-types des modules instantanés, des modules à l'équilibre et des fractions élastiques des cartilages des condyles fémoraux médiaux pour chaque groupe sont donnés dans le Tableau 4.7. On observe que les modules et la fraction élastique du groupe Sain sont plus élevés que les autres groupes.

Groupes		E_{ins} (MPa)		E_{eq} (MPa)		f	
		Moyenne	σ (\pm)	Moyenne	σ (\pm)	Moyenne	σ (\pm)
Sain	(n=6)	3,79	0,82	1,47	0,35	0,39	0,03
Opéré 2sem	(n=6)	2,35	1,18	0,67	0,40	0,27	0,07
Opéré Traité 2sem	(n=5)	2,25	0,58	0,55	0,21	0,25	0,07
Opéré 6sem	(n=6)	3,37	1,23	0,85	0,29	0,25	0,03
Opéré Traité 6sem	(n=5)	3,24	1,03	0,89	0,29	0,28	0,04

Tableau 4.7 | Propriétés viscoélastiques des cinq groupes de cartilages articulaires
Modules instantanés, modules à l'équilibre et fractions : moyennes et écarts-types

B3.2.1 Effet de l'évolution de la pathologie

Pour étudier l'effet du stade d'avancement de la pathologie des tests statistiques ont été réalisés entre les groupes Sain, Opéré 2sem et Opéré 6sem (Figure 4.11).

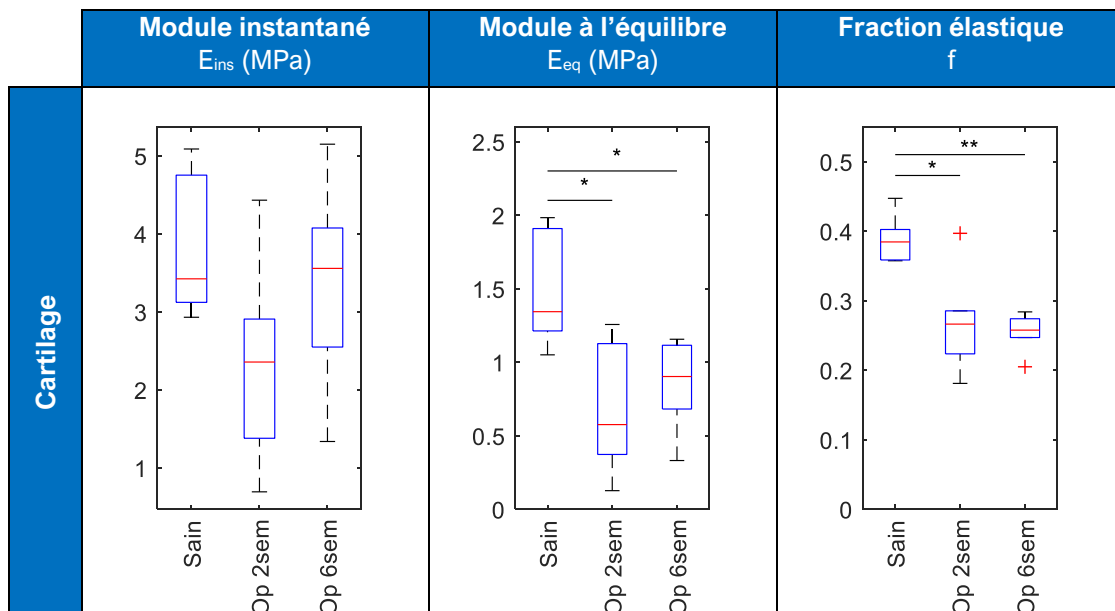


Figure 4.11 | Propriétés viscoélastiques des cartilages sains et opérés non traités
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

On observe que les modules chutent de façon importante à 2 semaines par rapport à l'état initial et de manière significative pour le module à l'équilibre ($p = 0,015$). La tendance s'inverse ensuite à 6

semaines : les modules augmentent tout en restant néanmoins inférieur à l'état initial de manière significative pour le module à l'équilibre ($p = 0,015$). La fraction élastique diminue significativement par rapport à l'état initial à 2 semaines ($p = 0,026$) et à 6 semaines ($p = 0,002$).

B3.2.2 Effet de la thérapie par viscosupplémentation

Pour étudier l'effet de la thérapie par viscosupplémentation, des tests statistiques ont été réalisés entre les groupes Sain, Opéré Traité 2sem et Opéré Traité 6sem (Figure 4.12).

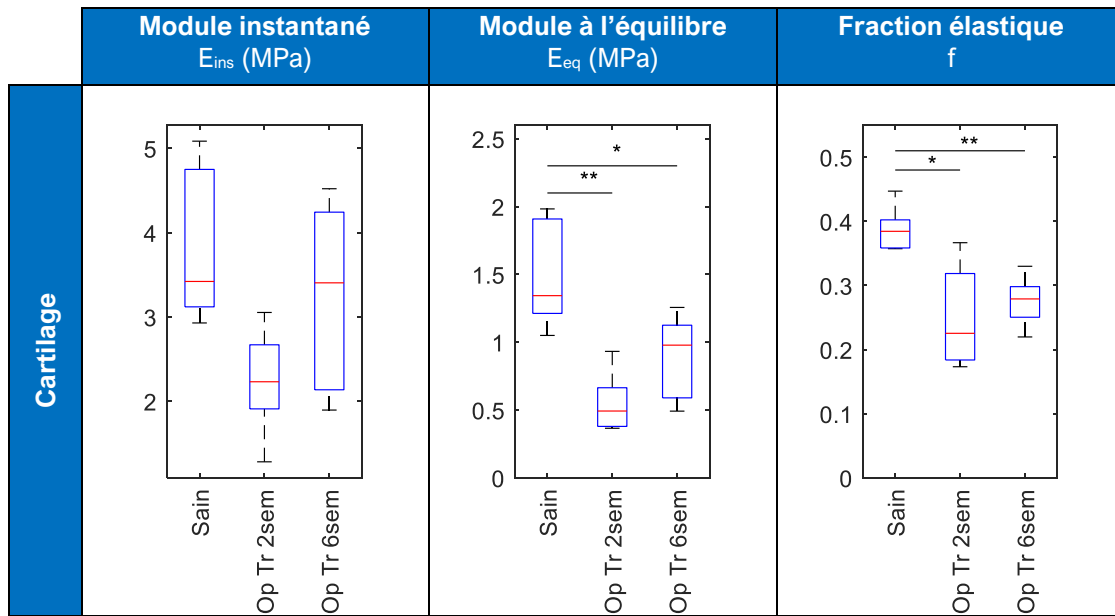


Figure 4.12 | Propriétés viscoélastiques des cartilages sains et opérés traités
* ($p < 0,05$) ; ** ($p < 0,01$).

Les observations sont identiques à celles constatées dans le paragraphe précédent. Les modules chutent de façon importante à 2 semaines par rapport à l'état initial et de manière significative pour le module à l'équilibre ($p = 0,004$). La tendance s'inverse ensuite à 6 semaines : les modules augmentent tout en restant néanmoins inférieur à l'état initial, de manière significative pour le module à l'équilibre ($p = 0,030$). La fraction élastique diminue significativement par rapport à l'état initial avec un comportement similaire : une baisse à 2 semaines ($p = 0,017$), suivie d'une augmentation à 6 semaines ($p = 0,004$).

B3.2.3 Analyse globale

Comme pour les ménisques, on remarque que les valeurs des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem sont proches et qu'il en est de même pour les valeurs des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem qui sont du même ordre de grandeur, ce qui est confirmé par des tests de Mann-Whitney dont aucun n'est significatif.

Aussi, une analyse statistique plus globale des résultats a été réalisée en rassemblant les groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem en un groupe nommé OA 2sem (n=11) et les groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem en un groupe nommé OA 6sem (n=11) (Tableau 4.8).

Groupes		E_{ins} (MPa)		E_{eq} (MPa)		f	
		Moyenne	σ (\pm)	Moyenne	σ (\pm)	Moyenne	σ (\pm)
Sain	(n=6)	3,79	0,82	1,47	0,35	0,39	0,03
OA 2sem	(n=11)	2,30	0,96	0,62	0,33	0,26	0,07
OA 6sem	(n=11)	3,31	1,15	0,87	0,29	0,26	0,03
p-value		0,021		0,002		0,004	

Tableau 4.8 | Propriétés viscoélastiques cartilages en fonction de l'évolution de la pathologie : Modules instantanés, modules à l'équilibre et fractions : moyennes, écarts-types et p-value obtenues (tests de Kruskal-Wallis).

Les résultats sont illustrés Figure 4.13 et confirment les tendances constatées dans les paragraphes précédents.

Les modules instantanés et les modules à l'équilibre sont significativement plus bas dans les groupes OA que dans le groupe Sain. Après 2 semaines, ils chutent respectivement de $3,79 \pm 0,82$ MPa à $2,30 \pm 0,96$ MPa ($p = 0,003$) et de $1,47 \pm 0,35$ MPa à $0,62 \pm 0,33$ MPa ($p = 0,001$). A 6 semaines, ils remontent légèrement à $3,31 \pm 1,15$ MPa et $0,87 \pm 0,29$ MPa ($p = 0,001$). La fraction élastique évolue significativement dès 2 semaines, passant de $0,39 \pm 0,03$ à $0,26 \pm 0,07$ ($p = 0,005$). Cette valeur se stabilise à 6 semaines à $0,26 \pm 0,03$ ($p = 1,6 \cdot 10^{-4}$). Cependant, aucune différence significative n'est constatée entre les groupes OA 2sem et OA 6sem.

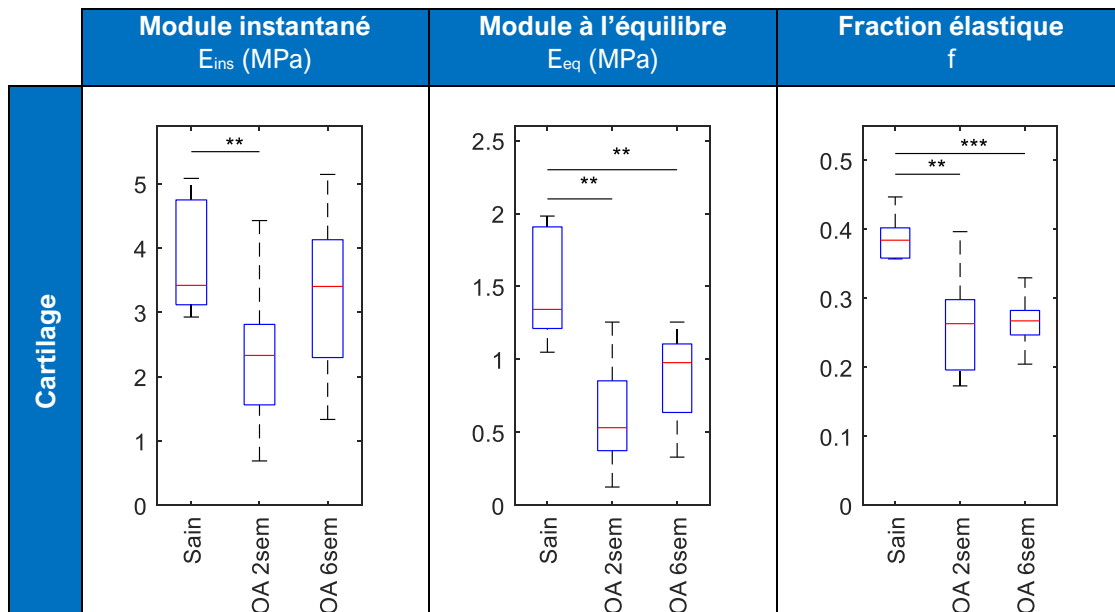


Figure 4.13 | Propriétés viscoélastiques des cartilages fonction de l'évolution de la pathologie mesurés dans la région d'intérêt ; (*) montre les différences significatives entre les groupes * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

B4. Discussion

Dans ce chapitre, les propriétés mécaniques des ménisques et cartilages articulaires des pattes opérées ont été caractérisées par nanoindentation dans un modèle d'OA induite par ACLT chez des lapins. Les mesures ont été menées sur des sites spécifiques dans les parties médiales des pièces anatomiques puisqu'il a été reporté que les dégradations y étaient plus importantes que dans le compartiment latéral (Florea et al., 2015; Hellio Le Graverand et al., 2001; Levillain et al., 2015; Mäkelä et al., 2014; Yoshida et al., 2013; Yoshioka et al., 1996). Plusieurs groupes de lapins étaient impliqués, incluant un groupe contrôle de lapins sains, non opérés non traités, pour évaluer l'effet de la viscosupplémentation d'une part et l'effet de l'avancement de l'OA sur les propriétés viscoélastiques d'autre part.

Parmi les tests mécaniques, l'indentation est couramment utilisée car elle offre une bonne sensibilité pour révéler les modifications de propriétés mécaniques de la zone superficielle du cartilage, la première à subir des altérations arthrosiques, notamment par la participation du réseau de fibres de collagène à la raideur (Mäkelä et al., 2014; Yoshioka et al., 1996). Cette technique permet en outre de mesurer la raideur du cartilage articulaire intact attaché à son os natif (Mäkelä et al., 2014).

Comparaison entre les scores macroscopiques et les propriétés mécaniques

Des analyses ACP menées sur l'ensemble des scores (ménisque, cartilage et ostéophyte) et des propriétés mécaniques (modules instantané, à l'équilibre et fractions élastiques) offrent une représentation visuelle des cinq groupes (Figure 4.14).

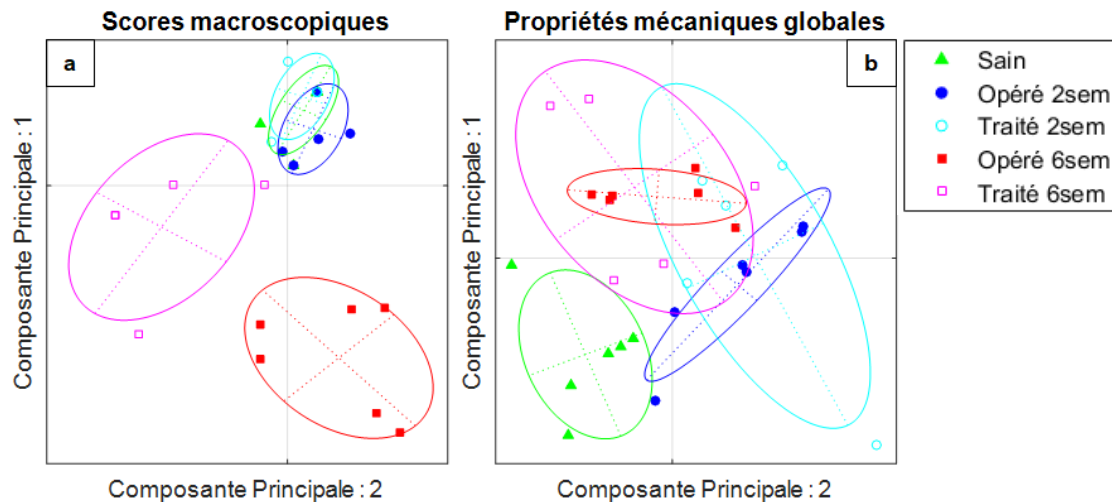


Figure 4.14 | ACP des scores macroscopiques et des propriétés mécaniques.

A 6 semaines post ACLT, on constate que :

- ➔ Les deux groupes de lapins sont différents du groupe Sain, que cela soit pour les propriétés mécaniques ou les scores macroscopiques.
- ➔ Les scores macroscopiques des groupes traités et non traités sont différents, ce qui n'est pas le cas des propriétés mécaniques. On observe cependant une plus grande diversité de réponse au viscosupplément selon l'individu analysé.

A 2 semaines au contraire, il est clair que le score macroscopique qui postule un comportement proche du sain ne reflète pas les propriétés mécaniques des tissus. Bien que les comportements des ménisques et cartilages soient différents en réponse au processus arthrosique, on observe que, pour ces deux tissus, la dégradation des propriétés mécaniques est initiée dès 2 semaines, sans que cela ne soit visible à l'échelle macroscopique, ce qui n'a à notre connaissance jamais été rapporté.

Evolution longitudinale des propriétés mécaniques

L'évolution des propriétés mécaniques en fonction de l'avancement du processus arthrosique a été appréhendée par l'analyse des groupes Opéré 2sem et Opéré 6sem.

Une ACP menée sur l'ensemble des propriétés viscoélastiques démontre dans un premier temps que les propriétés viscoélastiques des groupes Sain et Opéré 6sem sont distinctes (Figure 4.15). Le

groupe Opéré 2sem est intermédiaire et s'étale du groupe Sain au groupe Opéré 6sem montrant que le stade précoce du processus arthrosique varie selon les individus.

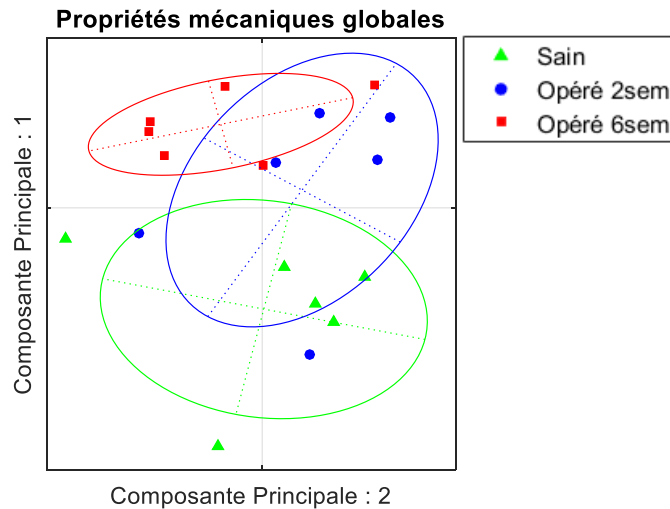


Figure 4.15 | ACP des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages sains et opérés non traités.

Dans un second temps, des ACP ont été réalisées de la même manière sur les propriétés viscoélastiques des cartilages puis des ménisques.

Evolution du comportement mécanique des cartilages articulaires

Le cartilage du condyle fémoral médial a un comportement mécanique très particulier avec le temps : une baisse significative des modules et de la fraction élastique est enregistrée dès 2 semaines post-ACLT suivie d'une augmentation des modules à 6 semaines, qui restent cependant significativement plus bas qu'à l'état initial. L'ACP Figure 4.16 illustre la différence entre le groupe Sain et les groupes Opéré 2sem et Opéré 6sem.

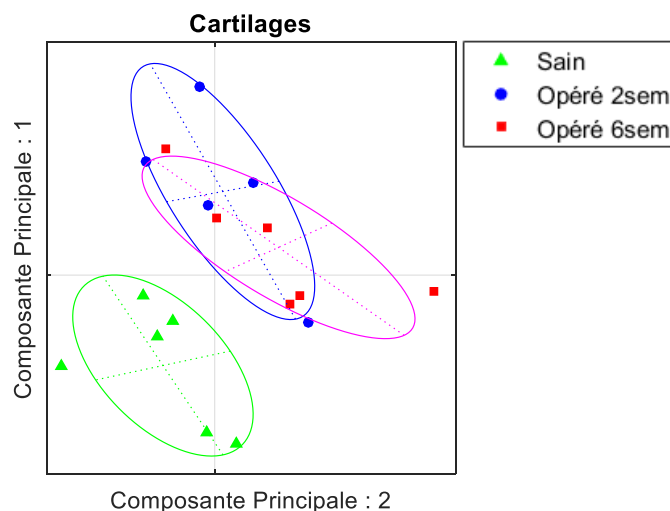


Figure 4.16 | ACP des propriétés viscoélastiques des cartilages sains et opérés non traités.

Les propriétés du cartilage ont été largement étudiées dans la littérature en particulier dans le modèle ACLT (Sah et al., 1997; Setton et al., 1994, 1995; Vignon et al., 1983). Les résultats montrent chez le lapin, des dégradations rapides et sévères du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral (Batiste et al., 2004; Bouchgua et al., 2009b; Yoshioka et al., 1996). Des modifications biochimiques et métaboliques du cartilage articulaire, liées à l'instabilité mécanique créée par l'ACLT, ont été rapportées, comme l'augmentation de la teneur en eau, l'augmentation de la synthèse des protéoglycanes et du collagène et l'altération de la structure moléculaire des protéoglycanes (Mäkelä et al., 2014; Setton et al., 1999).

De la même manière, une augmentation de l'épaisseur du cartilage a été observée chez les modèles animaux d'OA pendant la phase précoce de la maladie (Cotofana et al., 2012), attribuée au gonflement du cartilage sans que l'on sache précisément s'il s'agit d'un phénomène réversible initial, un endommagement durable des tissus (Calvo et al., 2004; Watson et al., 1996) ou s'il s'agit d'un processus de réparation hypertrophique (Vignon et al., 1983).

Il a ainsi été suggéré que le gonflement du cartilage précédait la dégradation du cartilage dans un modèle de chien ACLT (Vignon et al., 1983). En outre, l'augmentation d'épaisseur du cartilage mesurée par IRM a été reportée comme étant un signe précoce d'OA chez les hommes atteints de rupture du LCA ou présentant des signes radiographiques de gonarthrose précoce (Frobell et al., 2010). Watson *et al.* ont mené une étude sur le cartilage articulaire dans un modèle d'OA spontanée par IRM sur des cochons d'inde âgés de 8 à 52 semaines. Cette étude a montré un gonflement initial plus ou moins important du cartilage dans toutes les articulations entre 8 et 24 semaines avant de décroître (Watson et al., 1996). Une explication réside dans l'altération de la matrice des fibres de collagène, diminuant la résistance à la traction du cartilage et permettant au gel de protéoglycanes d'absorber plus d'eau et donc d'occuper un volume accru (Setton et al., 1999; Watson et al., 1996). Calvo *et al.* ont de leur côté étudié un modèle de lapin ayant subi une ménissectomie dont l'épaisseur de cartilage par IRM est passé de $0,58 \pm 0,14$ mm initialement à $0,72 \pm 0,19$ mm, 8 semaines après l'opération avant de diminuer à $0,58 \pm 0,16$ mm, 10 semaines après l'opération. Cette augmentation de l'épaisseur détectée avec l'IRM s'est révélée être corrélée avec une diminution progressive de la teneur en protéoglycanes, laissant penser qu'une altération du rôle des protéoglycanes dans

l'hydratation du cartilage facilite l'imbibition (Calvo et al., 2004). Les temps impliqués dans ces études sont plus longs que ceux trouvés dans nos analyses mais les modèles utilisés, ACLT chez le chien et OA spontanée par vieillissement chez le cochon d'inde, induisent des durées de progression plus longues que celles induites par ACLT chez le lapin.

Ces modifications contribuent aux changements significatifs dans le comportement mécanique du cartilage arthrosique qui ont été mesurés ici.

A notre connaissance, l'évolution des propriétés mécaniques dans le temps n'a été mesurée que par Setton *et al.* qui ont caractérisé en compression le cartilage dans la région mise en charge du condyle fémoral latéral de chiens ayant subi une ACLT à différents temps. *L'aggregate modulus*, qui représente la rigidité de la phase solide du matériau lorsque toute l'eau s'est échappé, mesurée à $0,56 \pm 0,19$ MPa dans le groupe de chiens sains, a régressé de façon significative à $0,31 \pm 0,10$ MPa dans le groupe 6 semaines post-ACLT avant de remonter à $0,42 \pm 0,10$ MPa dans le groupe 12 semaines post-ACLT (Setton et al., 1994), ce qui est cohérent avec nos résultats.

Propriétés mécaniques des ménisques

Dans notre étude, la diminution des modules à l'équilibre et instantané est observée dès 2 semaines après l'induction de l'OA dans la région antérieure alors qu'aucune différence n'est observée macroscopiquement. Dans le même temps, les modules de la région postérieure ne sont pas différents de l'état initial ce qui est cohérent avec les scores macroscopiques. Entre 2 et 6 semaines post-ACLT, les modules sont significativement plus bas dans les régions antérieure et postérieure.

Une ACP, menée sur les propriétés viscoélastiques des ménisques des groupes Sain, Opéré 2sem et Opéré 6sem permettent de compléter les analyses statistiques univariées présentées au paragraphe précédent. Le comportement dans le temps des régions antérieure et postérieure étant différent, on observe un plus grand recouvrement entre les groupes (Figure 4.17).

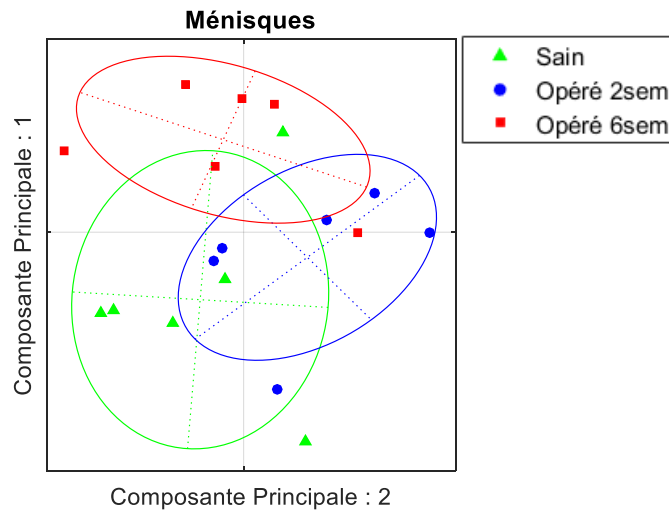


Figure 4.17 | ACP des propriétés viscoélastiques des ménisques sains et opérés non traités.

Les études sur les propriétés mécaniques des ménisques dans des modèles d'OA sont plus rares. On citera les travaux de Sweigart *et al.* dont les valeurs d'*aggregate modulus* mesurés sur des ménisques de lapins sains sont cohérents avec les modules à l'équilibre des régions antérieure et postérieure calculés ici. Leurs modules sont respectivement de 0,50 MPa et de 0,12 MPa dans les régions antérieure et postérieure à comparer aux modules à l'équilibre dans la présente étude de 0,60 MPa et 0,14 MPa, respectivement (Sweigart *et al.*, 2004). Fischenich *et al.* ont observé une diminution des modules instantané et à l'équilibre de ménisques humains à un stade d'arthrose avancé, en particulier dans la région antérieure du ménisque médial, où ils diminuent respectivement de 56% et 73%, ce qui est cohérent avec nos résultats où les baisses sont respectivement de 57% et 55% (Fischenich *et al.*, 2015a). D'autres études se sont intéressées à un stade plus avancé d'OA sur des modèles lapin. Les tissus se sont alors avérés trop dégradés 12 semaines après induction, notamment dans la région postérieure pour être complètement caractérisés (Fischenich *et al.*, 2014, 2015b; Wheatley *et al.*, 2015).

Levillain *et al.* ont montré que la diminution des propriétés viscoélastiques des ménisques pouvait s'expliquer par une modification de l'organisation des fibres de collagène et par une diminution de la teneur en glycosaminoglycanes. Dans les ménisques arthrosiques à 6 semaines post-ACLT, la teneur en glycosaminoglycanes était significativement réduite de 17% dans la région antérieure ($p = 0,017$) et de 11% dans la région postérieure par rapport au groupe Sain. Les fibres ne résistent alors plus efficacement aux contraintes circonférentielles transmises par le fémur, diminuant ainsi la rigidité du tissu et son élasticité. Tandis que le rôle des glycosaminoglycanes dans la résistance aux efforts de

compression et dans le glissement entre les fibres de collagène ne sont plus assurés efficacement (Levillain et al., 2017a). D'autres études confirment ces tendances (Coatney et al., 2015; Hellio Le Graverand et al., 2001).

Finalement, les propriétés mécaniques sont affectées dès 2 semaines post-ACLT sans que cela ne soit visible à l'échelle macroscopique. Nos résultats tendent à montrer que le cartilage réagit précocement au processus arthrosique lié à un gonflement décrit dans la littérature, entraînant immédiatement une forte baisse des modules viscoélastiques avant de remonter à un niveau néanmoins plus faible qu'à l'état Sain. Par ailleurs, nos résultats montrent également que la région antérieure du ménisque est plus précocement affectée par le développement de l'OA que la région postérieure. Dans la région antérieure, la diminution des modules est associée à une fraction élastique constante, signifiant que la viscosité du tissu n'est pas modifiée. 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, pour les ménisques sains comme les ménisques opérés, ce qui contribue à l'apparition plus fréquente de lésions dans la région postérieure.

La viscosupplémentation

Dans ce chapitre, l'effet d'une thérapie de viscosupplémentation sur les propriétés mécaniques des ménisques et cartilage a également été étudié à des stades précoces d'arthrose. L'efficacité clinique de l'acide hyaluronique reste 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. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet de ce traitement sur les propriétés mécaniques des tissus viscoélastiques dans le temps.

Les résultats ont montré dans la partie A un effet positif du traitement à 6 semaines sur l'état de surface des tissus à l'échelle macroscopique, confirmant son rôle dans l'amélioration de la lubrification au niveau du genou. Pourtant, il s'avère que les propriétés mécaniques des ménisque et cartilage sont aussi dégradées, que l'articulation ait bénéficié d'une injection de viscosupplément ou non.

Une analyse ACP menée sur les propriétés mécaniques des ménisques et cartilages des groupes Opéré Traité 2sem et Opéré Traité 6sem montrent qu'elles sont globalement distinctes de celles du groupe Sain (Figure 4.18).

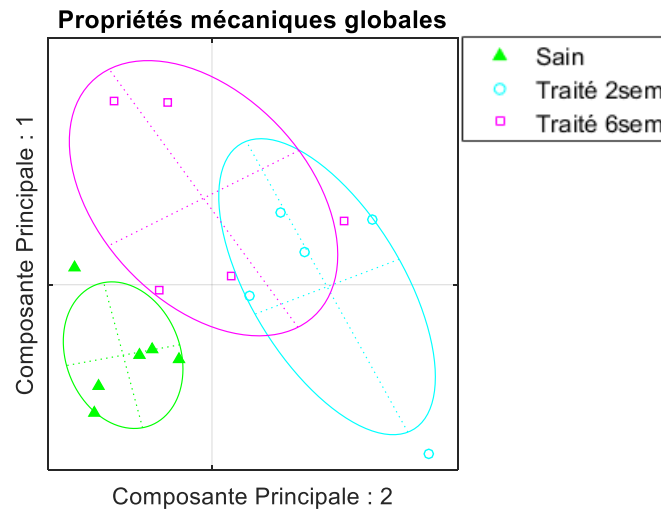


Figure 4.18 | ACP des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages sains et opérés traités.

En prenant en compte les cinq groupes, on observe Figure 4.19a que la réponse des ménisques au traitement présente une grande variation inter-individus bien que les lapins soient tous semblables (âge, sexe, poids, race). La Figure 4.19b montre que finalement à 6 semaines pots-ACLT, les propriétés mécaniques des cartilages sont semblables, qu'ils aient été traités ou non.

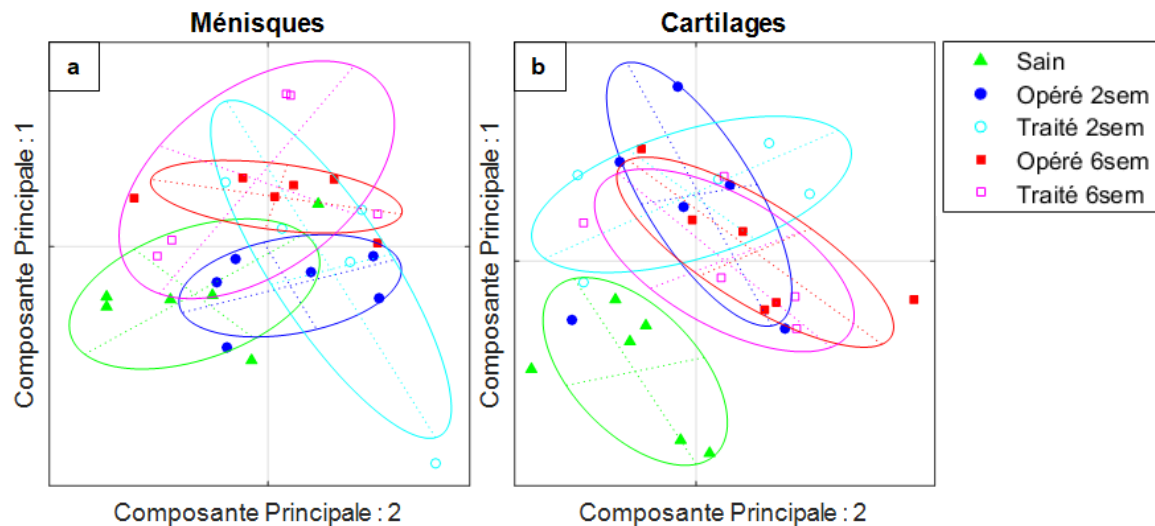


Figure 4.19 | ACP des propriétés viscoélastiques de tous les ménisques et cartilages.

Ces résultats démontrent que la dégénérescence des propriétés mécaniques se produit avant les dégradations macroscopiques dans l'articulation. On peut donc supposer que la viscosupplémentation a permis de ralentir la progression des lésions macroscopiques, et aurait donc plus un rôle préventif que curatif sur leur formation.

Levillain *et al.* ont prouvé que la thérapie de viscosupplémentation a des effets positifs sur la teneur glycosaminoglycanes : après l'injection du traitement, plusieurs ménisques ont une quantité de glycosaminoglycanes similaire à celle des ménisques sains, tandis que les ménisques non traités n'en ont quasiment plus. Toutefois, cette amélioration n'est accompagnée d'aucun effet sur leur microstructure ou leurs propriétés viscoélastiques (Levillain *et al.*, 2017b). Par conséquent, les propriétés mécaniques des ménisques du groupe Opéré Traité 6sem ne sont pas significativement améliorées par rapport au groupe Opéré 6sem non traité et ceci, même pour le groupe Opéré Traité 2sem qui a pourtant bénéficié d'injections dès la phase d'initiation de l'ACLt.

Synthèse

La caractérisation des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages articulaires a mis en évidence leur dégradation qu'ils soient traités ou non :

- ➔ Le cartilage subit des modifications dès 2 semaines
- ➔ La région antérieure du ménisque subit également des modifications dès 2 semaines
- ➔ Les modifications apparaissent entre 2 et 6 semaines dans la région postérieure du ménisque

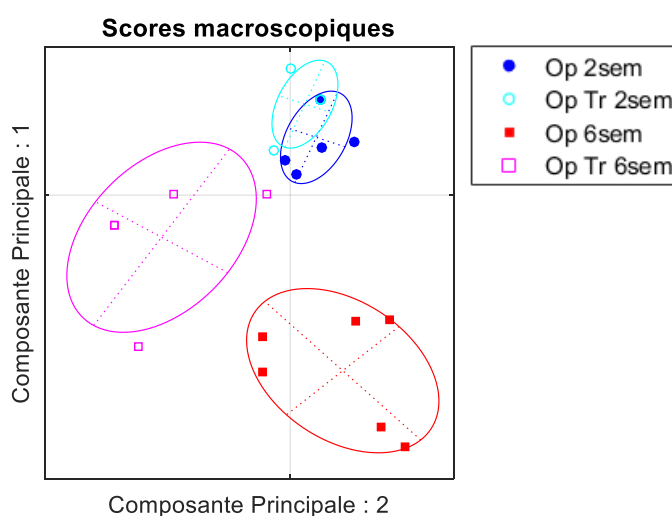
Cette partie permet donc d'établir qu'il y a une corrélation entre les scores macroscopiques et les propriétés mécaniques pour les temps longs mais que les modifications mécaniques aux temps précoces ne sont pas visibles à l'échelle macroscopique. Pour compléter cette étude, des analyses histologiques devraient être menées pour doser la quantité de glycosaminoglycanes dans le cartilage, comme cela a été fait sur les ménisques et ainsi valider les hypothèses liées à l'hypertrophie suivie de la perte d'épaisseur du cartilage.

Partie C : Les propriétés physico-tribologiques du LS

La quantité de LS prélevée sur les lapins sains était nulle ou très insuffisante et n'a pas permis de les caractériser. Aussi, cette partie se concentre sur les groupes de lapins après 2 et 6 semaines d'OA, avec et sans traitement.

Les deux premières parties ont montré que l'arthrose dans un modèle de lapin ACLT évoluait vers des dégradations macroscopiques des tissus articulaires à 6 semaines post-ACLT alors qu'il apparaît que les propriétés viscoélastiques de ces tissus étaient dégradées dès 2 semaines.

Plus précisément, la partie A a montré qu'il existait des différences significatives entre les scores macroscopiques des groupes 6 semaines et 2 semaines, ce dernier présentant des scores minimaux (Figure 4.20).



La partie B a montré une baisse des propriétés mécaniques du cartilage et des ménisques antérieurs dès deux semaines. Entre 2 semaines et 6 semaines, les variations sont plus faibles sauf sur les ménisques postérieurs où l'on observe une baisse significative du module à l'équilibre et de la fraction élastique, attestée par des tests de Mann Whitney réalisés entre les propriétés mécaniques des groupes OA 2sem et OA 6sem (respectivement, $p = 0,019$ et $p=0,002$). Une analyse ACP menée sur

l'ensemble des propriétés mécaniques des groupes opérés et opérés traités permet de confirmer que si les groupes opérés sont différenciés, ce n'est pas le cas des groupes opérés traités (Figure 4.21).

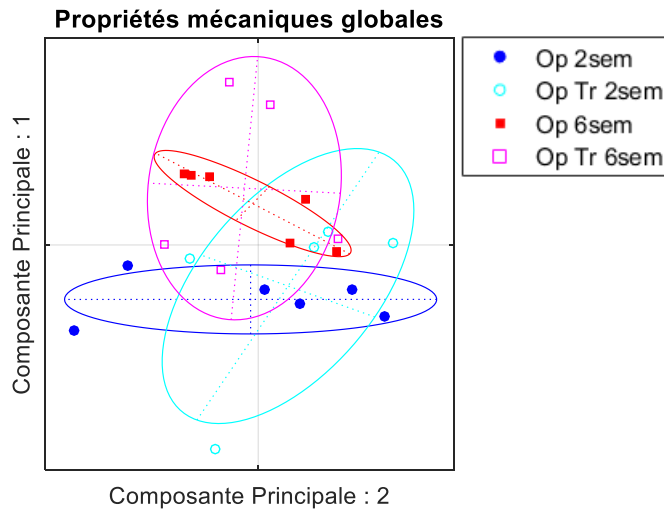


Figure 4.21 | ACP des propriétés mécaniques des ménisques et cartilages opérés et opérés traités.

Cette troisième partie consiste à caractériser les LS selon le protocole détaillé dans le Chapitre 2 pour vérifier si la technique proposée permet de suivre l'évolution de la pathologie dans le temps et de visualiser les effets du traitement par viscosupplémentation. L'objectif de cette partie sera de vérifier si notre protocole permet de visualiser des différences entre ces groupes.

C1. Analyse tribologique des gouttes séchées de LS

Comme pour les modèles précédents, les gouttes ont été déposées sur des lames en verre standard et des images 2D des gouttes séchées ont été capturées. Toutes les images des gouttes des échantillons de LS de lapins (n=17) sont visibles en Annexe 3. La périphérie des gouttes de LS des lapins des différents groupes ont également été mesurées par interférométrie. Les cartes topographiques sont visibles en Annexe 4. Les résultats des surfaces et hauteurs des bourrelets périphériques sont donnés dans le Tableau 4.9.

Groupes		Surface (mm ²)		Hauteur (mm)	
		Moyenne	σ (+)	Moyenne	σ (+)
Opéré 2sem	(n=4)	39,07	2,85	27,55	1,17
Opéré Traité 2sem	(n=4)	37,07	2,10	27,55	1,81
Opéré 6sem	(n=5)	30,80	3,54	21,54	5,21
Opéré Traité 6sem	(n=4)	27,41	1,09	21,99	3,63

Tableau 4.9 | Propriétés tribologiques des quatre groupes de LS
Surfaces et hauteurs des bourrelets : moyennes et écarts-types.

C1.1 Effet de la thérapie par viscosupplémentation

On note que les propriétés tribologiques, surface et hauteur de bourrelet périphérique, des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem sont proches et que de même les valeurs des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem sont du même ordre de grandeur, ce qui est confirmé par des tests de Mann-Whitney dont aucun n'est significatif.

C1.2 Effet du stade d'avancement de l'OA

Le traitement n'ayant pas d'efficacité visible sur les propriétés tribologiques des LS à 2 semaines comme à 6 semaines post-ACLT, les résultats des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem sont rassemblés en un groupe nommé OA 2sem (n=8) et les résultats des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem sont rassemblés en un groupe nommé OA 6sem (n=9) (Tableau 4.10).

Groupes		Surface (mm ²)		Hauteur (mm)	
		Moyenne	σ (+)	Moyenne	σ (+)
OA 2sem	(n=8)	38,07	2,70	27,55	1,52
OA 6sem	(n=9)	29,29	3,21	21,74	4,58
p-value		3.10 ⁻⁴		0,0037	

Tableau 4.10 | Propriétés tribologiques des deux groupes de LS
Surfaces et hauteurs des bourrelets :
moyennes, écarts-types et p-value obtenues (tests de Mann-Whitney).

Les surfaces des gouttes des LS du groupe OA 2sem sont significativement plus grandes que celles du groupe OA 6sem (Figure 4.22).

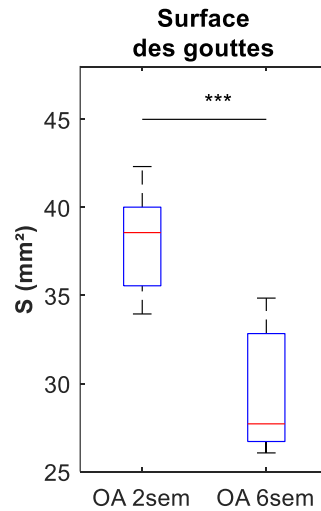


Figure 4.22 | Surface des gouttes des deux groupes de LS
Boîtes à moustache (ie. « box plot ») des surfaces des gouttes de LS des groupes OA 2sem et OA 6sem ; *** ($p < 0,001$).

Les hauteurs des bourrelets en périphérie des gouttes des LS du groupe OA 2sem sont significativement plus grandes que celles du groupe OA 6sem (Figure 4.23).

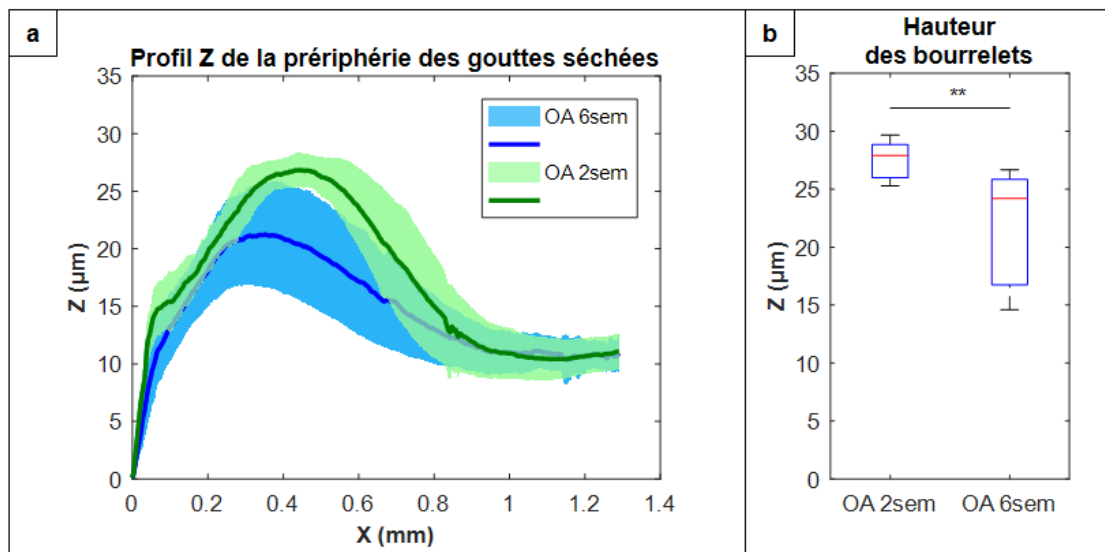


Figure 4.23 | Profils périphériques des gouttes des deux groupes de LS
(a) Les profils Z le long de la périphérie des gouttes de LS : les lignes en gras et les zones ombrées représentent respectivement les moyennes et les écarts-types;
(b) Boîtes à moustache des hauteurs des bourrelets des gouttes de LS des groupes OA 2sem et OA 6sem ; ** ($p < 0,01$).

Les gouttes de LS des deux groupes de lapins présentent deux phénotypes différents : les gouttes de LS du groupe OA 2sem sont de plus grandes tailles et présentent des bourrelets plus hauts que celles du groupe OA 6sem.

C2. Analyse physico-chimique des gouttes séchées de LS

C2.1 Répétabilité des mesures

Les écarts intra- et inter-zones ont été calculés et sont tous compatibles avec le seuil limite fixé au Chapitre 2. Ainsi, pour les dix-sept échantillons, la moyenne (*écart-type*) des écarts intra-zone est de 0,09 ($\pm 0,029$) et de 0,06 ($\pm 0,041$) pour les écarts inter-zone, soit sensiblement du même ordre de grandeur que ce qui avait été constaté sur les gouttes de LS de chiens au chapitre précédent.

C2.2 Analyse des différents groupes

La comparaison des spectres des groupes Opéré 2sem (n=4) et Opéré Traité 2sem (n=4) montre que les moyennes sont très proches (Figure 4.24a). On remarque que la dispersion est plus forte sur le groupe Opéré Traité 2sem due à la présence de deux échantillons contenant des traces de sang, la dispersion étant ainsi liée aux pics de la fibrine, à 970 cm^{-1} , 1248 cm^{-1} et 1575 cm^{-1} (Figure 4.24a). Les tests univariés de Mann-Whitney menés sur les deux cent dix ratios des deux groupes ne montrent pas de différences significatives : quinze ratios sont calculés significativement différents, tous liés à la bande à 960 cm^{-1} , certainement induits par la dispersion autour de la bande à 970 cm^{-1} .

De la même façon, la comparaison des spectres des groupes Opéré 6sem (n=5) et Opéré Traité 6sem (n=4) montre que les moyennes sont très proches, et que la dispersion est plus forte sur le groupe Opéré 6sem due à la présence de deux échantillons contenant des traces de sang (Figure 4.24b). Les tests univariés de Mann-Whitney sont là aussi non significatifs.

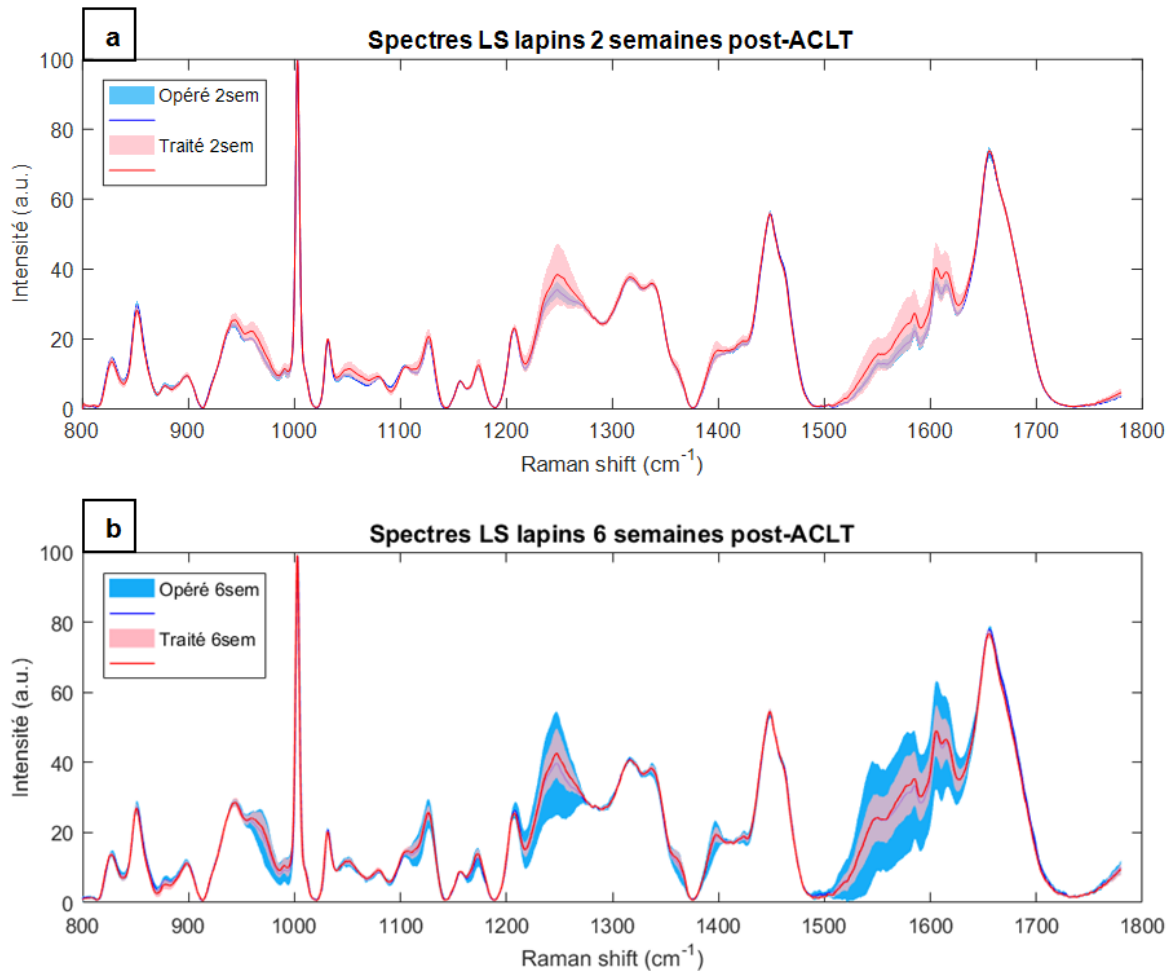


Figure 4.24 | Spectres des quatre groupes de LS
 (a) A 2 semaines post-ACLT, les spectres des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem ;
 (b) A 6 semaines post-ACLT, les spectres des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem ;
 les lignes en gras et les zones ombrées représentent respectivement les moyennes et les écarts-types.

Les ACP traduisent visuellement que les groupes opérés et opérés traités des groupes 2 semaines et 6 semaines post-ACLT ne sont pas distincts (Figure 4.25).

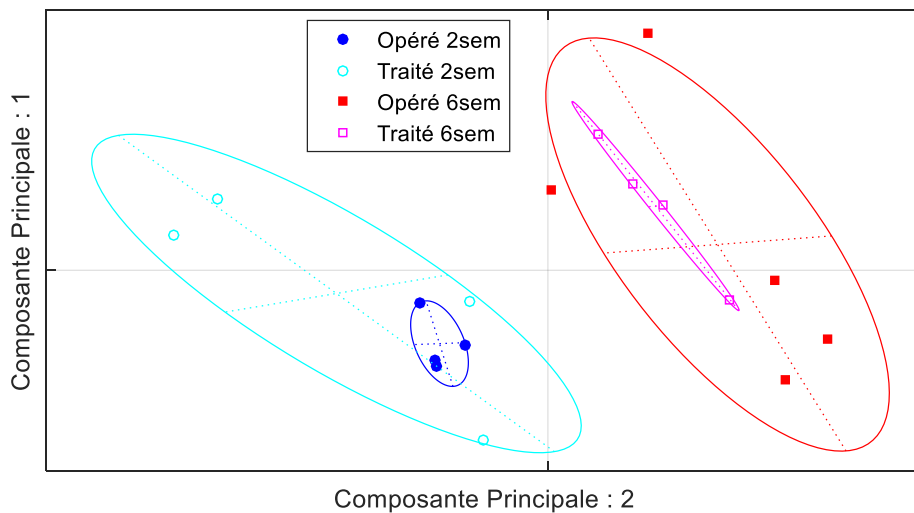


Figure 4.25 | ACP des quatre groupes de LS
 Les groupes Opéré et Opéré Traité 2sem sont confondus ainsi que les groupes Opéré et Opéré Traité 6sem.

Ces ACP montrent également que la dispersion est plus forte dans le groupe Opéré Traité à 2 semaines en réponse au traitement réalisé une semaine auparavant. A 6 semaines, la dispersion est plus forte dans le groupe Opéré en réponse à l'avancement du processus pathologique. Le groupe Opéré Traité 6sem est inclus dans le groupe Opéré 6sem laissant penser que l'effet de la viscosupplémentation s'est dissipé.

C2.3 Effet du stade d'avancement de l'OA

En se basant sur les résultats précédents pour postuler que les effets du traitement par viscosupplémentation n'apportent pas de différences significatives sur les propriétés physico-chimiques des LS à 2 semaines et à 6 semaines post-ACLT, les résultats des groupes Opéré 2sem et Opéré Traité 2sem ont été rassemblés en un groupe nommé OA 2sem (n=8) et les résultats des groupes Opéré 6sem et Opéré Traité 6sem ont été rassemblés en un groupe nommé OA 6sem (n=9) pour visualiser l'effet du stade d'avancement de la pathologie sur les spectres Raman (Figure 4.26).

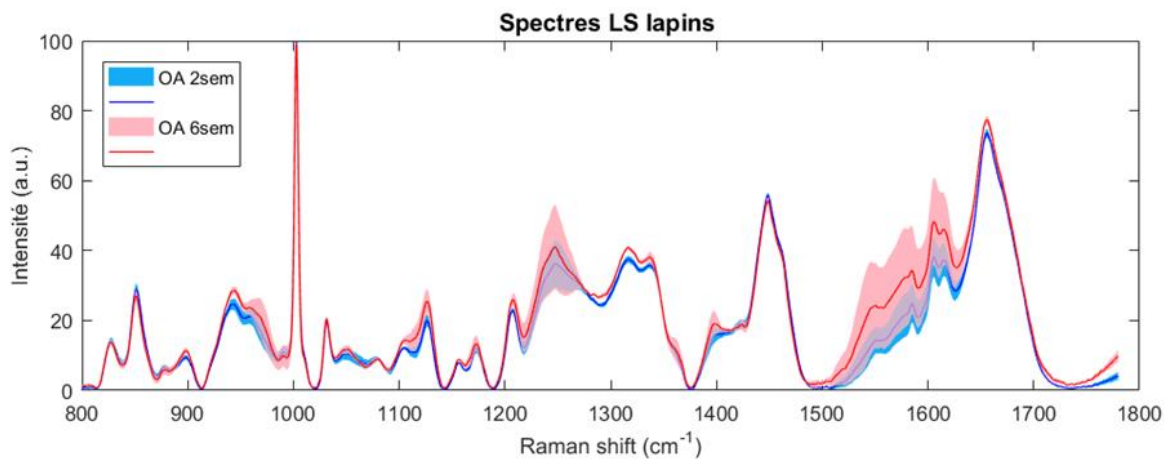
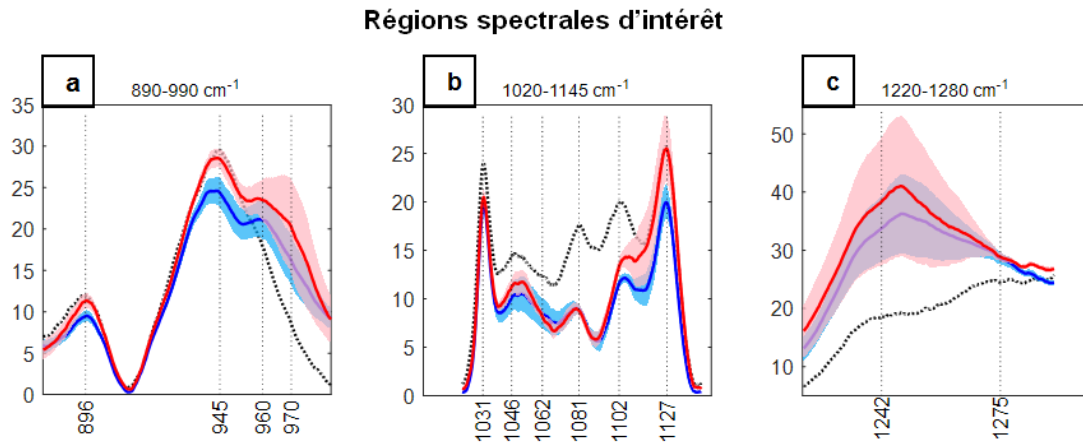


Figure 4.26 | Spectres des LS de lapins
Regroupés en deux groupes OA 2sem (bleu) et OA6sem (rouge)
les lignes en gras et les zones ombrées représentent respectivement les moyennes et les écarts-types.

Les régions spectrales d'intérêt, déjà décrites dans le chapitre précédent, permettent de mieux visualiser les différences entre les spectres des LS des groupes OA 2sem et OA 6sem (Figure 4.27).



*Figure 4.27 | Régions spectrales d'intérêt
Groupes OA 2sem (bleu) et OA6sem (rouge) ; les lignes en gras et les zones ombrées représentent respectivement les moyennes et les écarts-types ; pour mémoire, et en l'absence de LS de lapins sains disponibles, le spectre moyen des chiens sains est représenté en pointillés noirs.*

Des tests univariés de Mann-Whitney ont été menés sur les deux cent dix ratios pour comparer les deux groupes OA 2sem et OA 6sem : quatre-vingt-douze ratios se sont révélés être significativement différents (44% des ratios).

Dans la région 890-990 cm^{-1} (Figure 4.27a), la bande Raman à 960 cm^{-1} , témoin de la présence de phosphate minéral osseux, est visible dans les deux groupes, sans être significativement différente. On distingue aussi clairement la bande relative à la fibrine à 970 cm^{-1} dans le groupe OA 6sem pour laquelle seize ratios sont significativement différents.

On note également une plus faible concentration d'acide hyaluronique dans le groupe OA 2sem que dans le groupe OA 6sem, aussi bien dans la région 890-990 cm^{-1} avec les bandes à 896 et 945 cm^{-1} , que par les bandes à 1046, 1102 et 1127 cm^{-1} dans la région 1020-1145 cm^{-1} (Figure 4.27b) résultant dans quarante-quatre ratios significativement différents.

La région des Amides III, 1220-1280 cm^{-1} (Figure 4.27c), fait surtout apparaître des différences liées à la fibrine du sang, par sa bande 1248 cm^{-1} , en lien avec la bande à 970 cm^{-1} ainsi que les bandes entre 1542 et 1575 cm^{-1} .

Par ailleurs, on note comme chez les chiens, que les ratios liés aux protéines tendent à montrer une augmentation du contenu en protéines dans le groupe OA 2sem.

Finalement, l'analyse des ratios significatifs permet d'exprimer les différences remarquables entre les spectres de LS des groupes OA 2sem et OA 6sem :

- ➔ Augmentation de la teneur en acide hyaluronique
- ➔ Augmentation de la fibrine
- ➔ Diminution de la teneur en protéines

La Figure 4.28 illustre quelques-uns de ces ratios significatifs.

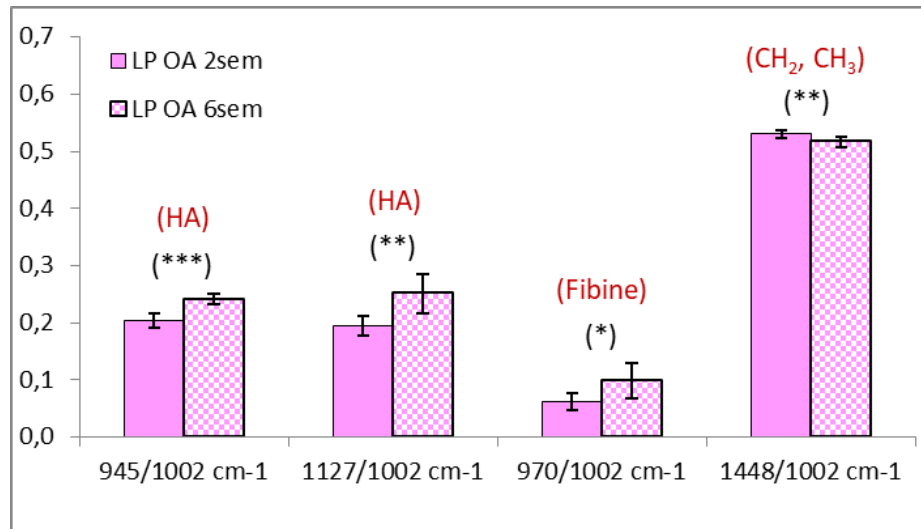


Figure 4.28 | Exemples de ratios significativement différents entre groupes OA 2sem et OA 6sem
Ces ratios, tous exprimés sur la bande du cycle aromatique de la phénylalanine, concernent de gauche à droite :
l'acide hyaluronique, la fibrine et des terminaisons méthyles des protéines CH₂ et CH₃ ;
* (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001).

C3. Bilan physico-tribologique

Des tests de corrélation de Pearson ont été menés sur les deux cent dix ratios pour trouver les corrélations pouvant exister entre les ratios et les caractérisations tribologiques des gouttes (surfaces des gouttes et hauteurs des bourrelets). Les degrés de corrélation sont plus modérés que ceux calculés sur les chiens.

On peut cependant retenir que cinq ratios ont une bonne corrélation, supérieure à 60% avec la surface des gouttes (Tableau 4.11).

Ratios	Type	OA 2sem		OA 6sem		Mann-Whitney p	Tendance	Corrélation Surface R ² (%)
		Moyenne	$\sigma(\pm)$	Moyenne	$\sigma(\pm)$			
896 cm ⁻¹ /852 cm ⁻¹	HA/Pr	0,33	0,02	0,42	0,02	8,2.10 ⁻⁵	↗	65,6
1002 cm⁻¹/945 cm⁻¹	Pr/HA	4,90	0,29	4,16	0,16	1,6.10 ⁻⁴	↘	60,3
1031 cm⁻¹/945 cm⁻¹	Pr/HA	0,94	0,03	0,83	0,01	8,2.10 ⁻⁵	↘	67,7
1654 cm ⁻¹ /1002 cm ⁻¹	Pr/Pr	0,57	0,02	0,63	0,02	1,6.10 ⁻⁴	↗	62,4
1654 cm ⁻¹ /1448 cm ⁻¹	Pr/Pr	1,07	0,04	1,23	0,04	8,2.10 ⁻⁵	↗	64,3

Tableau 4.11 | Liste des cinq ratios montrant un bon degré de corrélation avec la surface des gouttes Moyennes et écarts-types des ratios, valeurs p des tests de Mann-Whitney, tendances d'évolution, coefficients de corrélation avec la surface des gouttes. Les valeurs en gras correspondent aux deux ratios qui présentent également un bon degré de corrélation entre les surfaces des gouttes de LS de chiens sains et OA.
HA : acide hyaluronique, Pr : protéines.

Parmi eux, deux ratios présentaient également des corrélations du même ordre de grandeur chez les chiens (Figure 4.29). Ces deux ratios sont liés à la bande Raman 945 cm⁻¹ de l'acide hyaluronique.

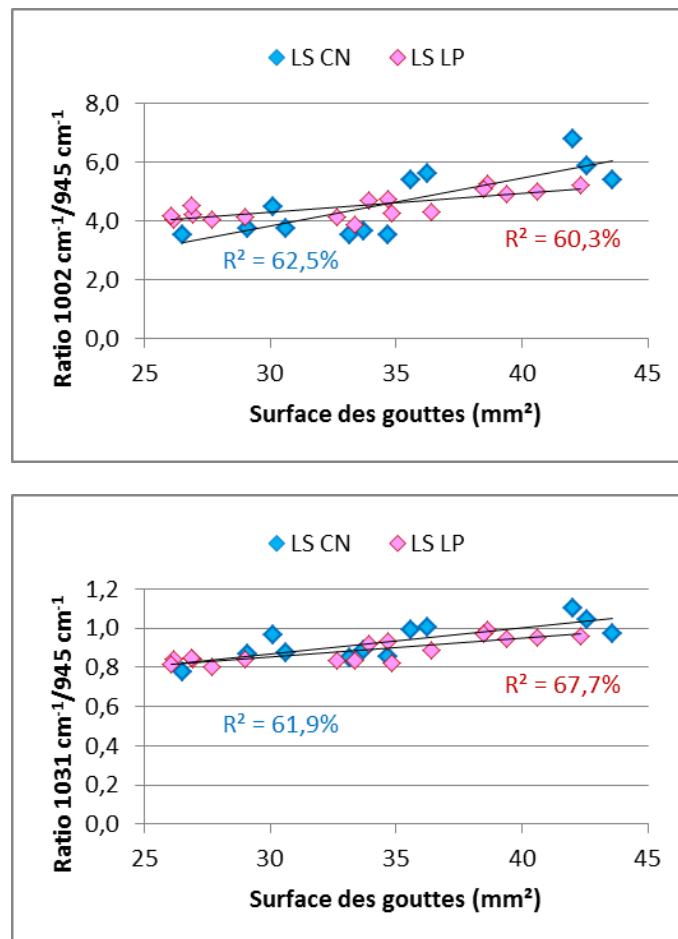


Figure 4.29 | Régression linéaire des deux ratios corrélés avec la surface des gouttes Chez le chien (sains et OA) et les lapins (OA 2sem/OA 6sem).

De la même façon, seuls deux ratios présentent de bons degrés de corrélation avec la hauteur des bourrelets, avec un coefficient supérieur à 60% (Tableau 4.12).

Ratios	Type	OA 2sem		OA 6sem		Mann-Whitney p	Tendance	Corrélation Hauteur R ² (%)
		Moyenne	$\sigma(\pm)$	Moyenne	$\sigma(\pm)$			
1448 cm ⁻¹ /1002 cm ⁻¹	Pr/Pr	0,53	0,01	0,52	0,01	2,5.10 ⁻³	↘	63,1
1448 cm ⁻¹ /1317 cm ⁻¹	Pr/Pr	1,43	0,03	1,28	0,04	8,2.10 ⁻⁵	↘	63,6

Tableau 4.12 | Liste des deux ratios montrant un bon degré de corrélation avec la hauteur des bourrelets Moyennes et écarts-types des ratios, valeurs p des tests de Mann-Whitney, tendances d'évolution, coefficients de corrélation avec la surface des gouttes. Pr : protéines.

Ces deux ratios étaient également très bien corrélés chez les chiens, avec des coefficients supérieurs à 70% (Figure 4.30). Ces deux ratios sont des ratios de bandes de protéines.

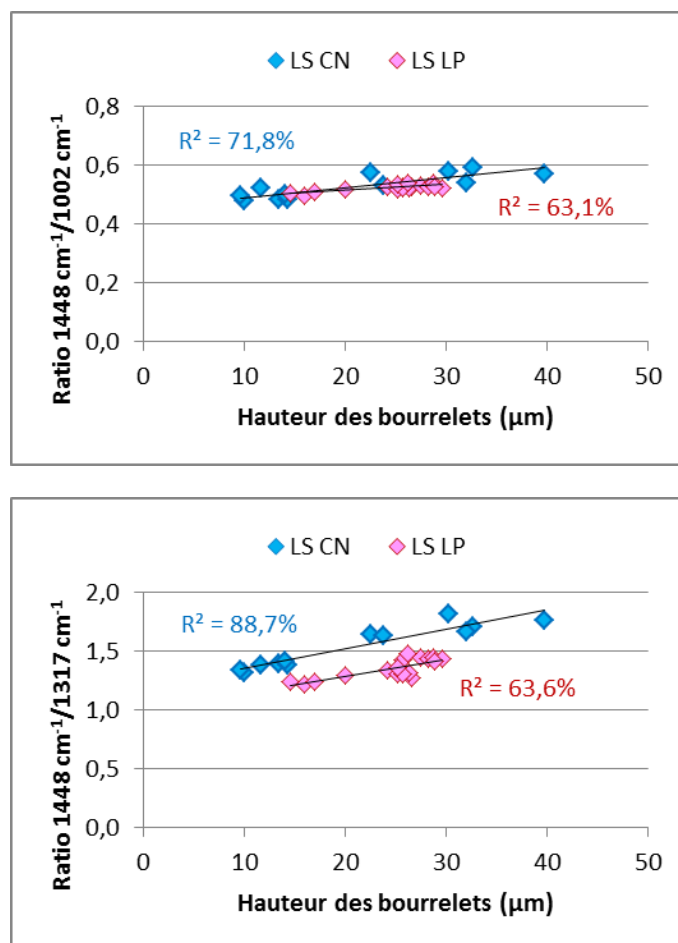


Figure 4.30 | Régression linéaire des deux ratios corrélés avec la hauteur des bourrelets Chez le chien (sains et OA) et les lapins (OA 2sem/OA 6sem).

Tous ces ratios faisaient partie des quatre-vingt-douze ratios significativement différents entre les groupes OA 2sem et OA 6sem.

C4. Discussion

Les parties précédentes ont montré successivement la dégradation macroscopique de l'articulation, en particulier l'effusion synoviale, puis l'évolution des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages. Cette troisième partie a permis de caractériser le LS des lapins ayant subi une ACLT avec ou sans traitement intra-articulaire post-opératoire, en fonction du temps.

Les propriétés du LS en fonction de l'évolution de la pathologie

Ne disposant pas de LS sain, en raison de la petite taille de la cavité articulaire du lapin sain, nous nous sommes focalisés sur les différences constatées entre les LS à 2 semaines et 6 semaines post-ACLT, présentant vraisemblablement moins de différences que ce qui a pu être mis en évidence entre les LS de chiens sains et arthrosiques. Par ailleurs, même si cette étude permet, contrairement au modèle spontané, de connaître la date d'induction de l'arthrose par ACLT, elle ne permet pas de s'affranchir des variations inter individus liées à l'intervention chirurgicale, au processus arthrosique et aux effets du traitement par viscosupplémentation. Cela peut donc aussi expliquer en partie que les corrélations trouvées entre les différents biomarqueurs soient moins marquées que dans le modèle spontané canin.

L'analyse du LS permet, comme le score macroscopique, de distinguer les groupes à 2 et 6 semaines d'OA.

Etat inflammatoire plus aigu à 2 semaines

Des différences significatives ont été observées entre les surfaces des gouttes des LS des lapins des groupes OA 2sem et OA 6sem. Comme démontré dans le chapitre précédent, la surface des gouttes est liée à la viscosité du LS, elle-même liée à la concentration et au poids moléculaire de l'acide hyaluronique. Ainsi, une goutte plus grande 2 semaines après l'ACLT correspond à un LS moins visqueux dû en partie à une diminution de la concentration en acide hyaluronique. L'analyse spectrale a corroboré ce résultat puisqu'elle a révélé une plus grande concentration d'acide hyaluronique sur les gouttes des LS du groupe OA 6sem par rapport au groupe OA 2sem. Ce résultat témoigne d'un état inflammatoire à 2 semaines comme expliqué au § 2.2.3 au Chapitre 1. Il est comparable à l'étude réalisée par Mc Carty *et al.* sur des lapins ayant subi une ACLT. La distribution de la concentration a

été mesurée par électrophorèse sur les LS prélevés à 7 et 28 jours après ACLT. Les résultats montrent que la concentration est diminuée de 47% à 7 jours et de 26% à 28 jours par rapport au LS sain (McCarty et al., 2012).

De la même façon, des différences significatives ont été relevées entre les hauteurs des bourrelets périphériques des gouttes de LS des lapins des groupes OA 2sem et OA 6sem. Les spectres Raman ont révélé là aussi que ce résultat était cohérent avec une plus grande concentration en protéines dans le groupe OA 2sem, ce qui est également un témoin de l'état inflammatoire. L'étude de McCarty *et al.* a également montré que l'augmentation de la perméabilité de la membrane synoviale, liée à l'inflammation, conduit à l'augmentation du contenu en protéines sériques dans le LS. Ces résultats suggèrent donc que, dans notre étude, l'inflammation était plus importante à 2 semaines qu'à 6 semaines post-ACLT. Ceci est compatible avec des études mesurant les cytokines pro-inflammatoires aboutissant à une intensité de l'inflammation plus forte en début (stade aigu) qu'en fin du processus arthrosique (stade chronique) (Benito et al., 2005a; McCarty et al., 2012; Sohn et al., 2012; Sokolove and Lepus, 2013).

Pathologie plus sévère à 6 semaines

La fibrine est une protéine sanguine responsable de la coagulation, de poids moléculaire élevé 340 kDa, qui est présente à des niveaux anormalement élevés dans le LS OA, alors qu'elle est absente d'un LS sain (Evans et al., 2014). Dans notre étude, la fibrine est davantage présente à 6 semaines qu'à 2 semaines post-ACLT ce qui est cohérent avec plusieurs études qui ont noté que la quantité de fibrine relevée dans la membrane synoviale est en corrélation avec la sévérité de l'OA (Gobezie et al., 2007; Loeuille et al., 2005; Sohn et al., 2012). Notamment, chez l'humain, Loeuille *et al.* ont mis en évidence une plus grande déposition de fibrine sur la membrane synoviale pour des OA dont la dégradation du cartilage étaient plus avancées (Loeuille et al., 2005). On peut donc supposer que la forte intensité des bandes Raman associées à la fibrine observée dans le groupe de lapins 6 semaines après l'intervention est liée à une plus forte quantité de fibrine déposée sur la membrane synoviale.

Pour les deux temps d'étude, la bande phosphate liée au minéral osseux est présente. Cependant, aucune différence sur la teneur en phosphate minéral osseux n'est constatée.

Corrélations entre les propriétés du LS et des tissus articulaires

L'objectif ici est de faire le bilan des différentes caractérisations menées successivement sur les différents tissus articulaires et liquide synovial et d'étudier les liens pouvant exister entre eux.

La première partie (A) a montré que, comparé aux tissus sains, des dégradations macroscopiques sont visibles dans l'articulation à 6 semaines et que l'injection intra-articulaire d'acide hyaluronique limite les dégradations sans toutefois réparer les tissus. La deuxième partie (B) a mis en évidence que les propriétés mécaniques des ménisques et cartilages articulaires des pattes opérées étaient dégradées par rapport aux tissus sains dès 2 semaines post-ACLT, sans montrer d'effet bénéfique de la viscosupplémentation. La présente partie (C), consacrée à la caractérisation du LS, a prouvé qu'il était possible de distinguer le LS des lapins prélevés 2 semaines et 6 semaines après l'intervention chirurgicale.

Finalement, on constate qu'à 2 semaines post-ACLT, bien que les dégradations ne soient pas encore visibles, les propriétés mécaniques des ménisques et cartilages sont dégradées avec une perte d'élasticité des tissus. En particulier, une altération de la matrice des fibres de collagène est suspectée, diminuant leur résistance et permettant au gel de protéoglycanes d'absorber plus d'eau et provoquant un gonflement du cartilage. En parallèle, une effusion synoviale est marquée par un plus grand volume de LS dans l'articulation par rapport au groupe Sain et aux groupes 6 semaines post-ACLT. Les caractérisations du LS soulignent la diminution de la concentration en acide hyaluronique et une augmentation de la concentration en protéines, liée à un épisode inflammatoire.

A contrario, 6 semaines après l'induction de l'OA, les dégradations macroscopiques se sont très significativement accentuées. Les propriétés viscoélastiques des ménisques ont continué à baisser alors que celles du cartilage ont légèrement augmenté, supposant son dégonflement, qui pourrait être lié à une perte en protéoglycanes. Le volume de LS a diminué mais reste néanmoins élevé, et sa teneur en acide hyaluronique a augmenté marquant le recul de l'inflammation. La présence de fibrine est remarquée, témoignant de l'aggravation de la pathologie.

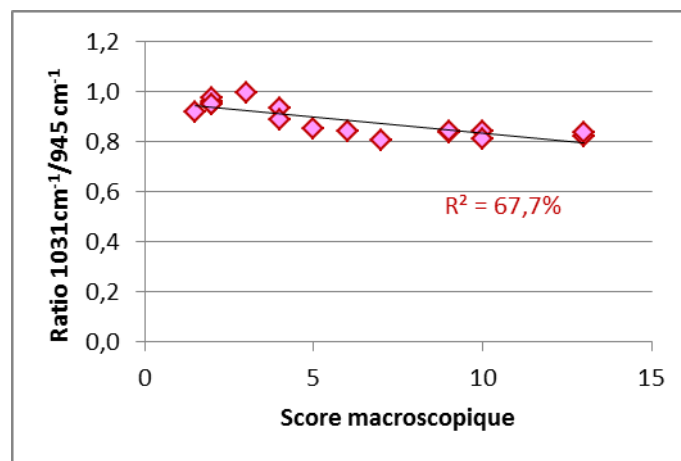
Des tests statistiques ont été réalisés entre les différents biomarqueurs montrant des différences entre 2 et 6 semaines étudiés dans ce chapitre : scores macroscopiques, surfaces et hauteurs de bourrelets périphériques des gouttes de LS séchées et ratios physico-chimiques.

De bonnes corrélations ont été constatées entre le score macroscopique global et des ratios Raman du LS : six ratios présentaient des coefficients de corrélation supérieurs à 65% (Tableau 4.13).

Ratios	Type	OA 2sem		OA 6sem		Mann-Whitney p	Tendance	Corrélation Score R ² (%)
		Moyenne	$\sigma(\pm)$	Moyenne	$\sigma(\pm)$			
945 cm ⁻¹ /852 cm ⁻¹	HA/Pr	0,72	0,07	0,91	0,04	1,6.10 ⁻⁴	↗	69,9
1031 cm ⁻¹ /945 cm ⁻¹	Pr/HA	0,94	0,03	0,83	0,01	8,2.10 ⁻⁵	↘	67,7
1317 cm ⁻¹ /1002 cm ⁻¹	Pr/Pr	0,37	0,01	0,40	0,01	1,6.10 ⁻⁴	↗	72,9
1448 cm ⁻¹ /1207 cm ⁻¹	Pr/Pr	2,34	0,07	2,00	0,13	8,2.10 ⁻⁵	↘	74,0
1448 cm ⁻¹ /1317 cm ⁻¹	Pr/Pr	1,43	0,03	1,28	0,04	8,2.10 ⁻⁵	↘	68,3
1448 cm ⁻¹ /1339 cm ⁻¹	Pr/Pr	1,47	0,03	1,35	0,04	8,2.10 ⁻⁵	↘	67,1

Tableau 4.13 | Liste des six ratios montrant un bon degré de corrélation avec le score global macroscopique Moyennes et écarts-types des ratios, valeurs p des tests de Mann-Whitney, tendances d'évolution, coefficients de corrélation avec le score. HA : acide hyaluronique, Pr : protéines.

On note dans cette liste le ratio 1031 cm⁻¹/945 cm⁻¹ qui avait également un haut degré de corrélation avec la surface des gouttes (R²=67,7%) et le ratio 1448 cm⁻¹/1317 cm⁻¹ qui présentait lui un bon degré de corrélation avec la hauteur des bourrelets périphériques (R²=63,6%) (Figure 4.31).



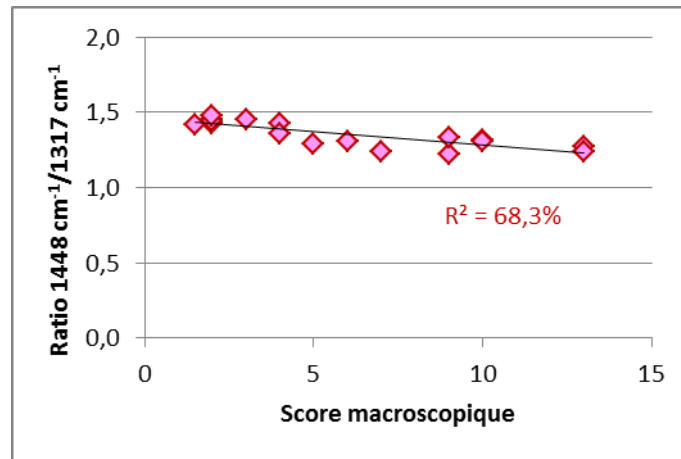


Figure 4.31 | Bonne corrélation entre les scores macroscopiques et des ratios physico-chimiques.

On peut également remarquer qu'il existe une corrélation plus modérée entre la surface des gouttes et le score macroscopique global (Figure 4.32).

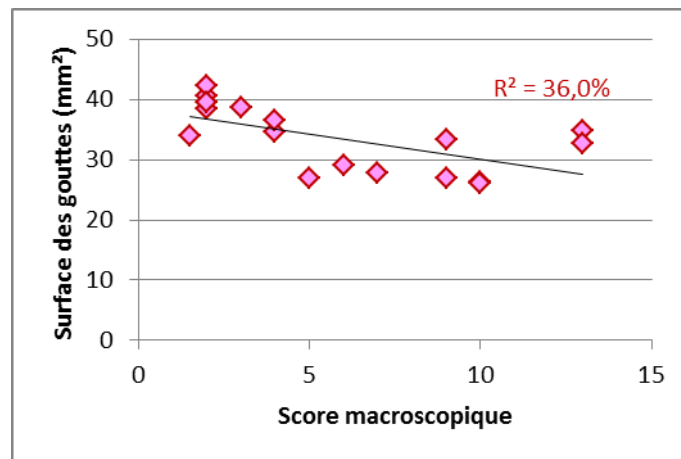


Figure 4.32 | Corrélation modérée entre les scores macroscopiques et la surface des gouttes de LS.

Synthèse

Ces résultats viennent renforcer ceux déjà obtenus sur le modèle spontané canin pour valider le protocole de caractérisation du LS en tant qu'outil de suivi de la pathologie arthrosique.

Plus globalement, à défaut de spectres de LS de lapins sains, et en se basant sur le spectre des LS de chiens sains, on a pu observer que la technique proposée permet de distinguer l'avancement de la pathologie et qu'elle est cohérente avec des dégradations macroscopiques explicitées dans la partie A. Par ailleurs, cette étude a permis de confirmer l'existence de relations entre les caractéristiques macroscopiques (surface des gouttes et hauteur des bourrelets) et physico-chimiques Raman.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre a finalement apporté plusieurs résultats complémentaires montrant la dégradation des tissus viscoélastiques, ménisque et cartilage, dès 2 semaines après l'induction de l'arthrose. A l'échelle macroscopique, on observe également une effusion synoviale dès 2 semaines, sans dégradations tissulaires, lésions méniscales et cartilagineuses ainsi que formation d'ostéophytes, qui ne sont visibles qu'à partir de 6 semaines.

La caractérisation du LS permet de confirmer l'inflammation dès 2 semaines, en lien avec la dégradation des propriétés mécaniques des tissus viscoélastiques et l'effusion synoviale, aussi bien par les marqueurs tribologiques, surfaces et hauteurs de bourrelets périphériques des gouttes de LS séchées, que par les marqueurs Raman qui attestent de la baisse de la concentration en acide hyaluronique et un afflux de protéines sériques dans le LS dans le groupe des lapins OA 2sem. Elle permet aussi de confirmer la sévérité de la pathologie à 6 semaines par une plus grande teneur en fibrine, ce qui est cohérent avec les évaluations macroscopiques.

La caractérisation du LS apporte aussi un outil de suivi du développement longitudinal de la pathologie, les résultats à 6 semaines étant significativement différents de ceux obtenus à 2 semaines, ce que les propriétés viscoélastiques n'ont pas pu mettre clairement en évidence.

Cette étude pourrait être complétée par des analyses histologiques des cartilages pour investiguer la teneur en protéoglycanes et étudier le lien potentiel avec les dégradations macroscopiques d'une part et les propriétés viscoélastiques d'autre part. Par ailleurs, avant d'être coupés pour l'acquisition des propriétés viscoélastiques des cartilages des condyles médiaux, les fémurs ont été entièrement imagés par tomographie à rayons X à haute résolution. Une analyse des paramètres de l'os trabéculaire sous-chondral permettrait de déterminer ses propriétés microstructurales. Notamment, elle permettrait de vérifier si les dégradations ont atteint l'os sous-chondral, alors qu'aucune différence en matière de produit de dégradation osseux n'a pas pu être mise en évidence en spectroscopie Raman.

Le chapitre suivant a pour objectif de vérifier la pertinence de ce protocole expérimental pour suivre et phénotyper la pathologie arthrosique chez des patients humains.

Chapitre 5

TRANSLATION CLINIQUE A L'HOMME

Introduction du chapitre

Les chapitres précédents ont montré que la méthodologie développée dans ces travaux a la capacité de distinguer des LS sains de LS pathologiques et de suivre l'évolution du processus arthrosique. Dans une perspective de translation clinique à l'homme, ce chapitre propose de vérifier si cette méthodologie est apte à différencier des échantillons de LS humains, et notamment de les phénotyper. Cette étude est basée sur la caractérisation de LS de patients soignés au service de Rhumatologie de l'Hôpital Universitaire de Genève. Les échantillons prélevés sont donc par définition tous issus de patients arthrosiques à des degrés divers. Malheureusement, il n'a pas été possible à ce stade de collecter des LS de patients sains. Des banques de tissus biologiques ont été contactées sur la base d'un cahier des charges précis : i) LS collecté dans des genoux de donneurs « sains, normaux » confirmé par radiographie, c'est-à-dire sans ostéophytes ni pincement articulaire (score KL 0) ; ii) LS sans hémolyse, ni additifs ; iii) donneurs de moins de 60 ans, avec un IMC (Indice de Masse Corporelle) compris entre 18,5 et 27. Il s'est avéré qu'aucune d'entre elles ne disposaient d'échantillons conformes à nos attentes. Cette étude clinique est donc uniquement basée sur des échantillons de LS arthrosiques, classés en première approche par leur grade radiographique, c'est-à-dire selon le score KL de Kellgren Lawrence (Kellgren and Lawrence, 1957).

L'objectif de cette étude est de vérifier si des biomarqueurs permettant de distinguer significativement les LS sains et arthrosiques chez le chien, peuvent efficacement classer les LS de patients arthrosiques.

1. Matériel et méthodes

1.1 Les échantillons

Dans cette étude, les échantillons de LS ont été prélevés par arthrocentèse chez des patients souffrants d'OA (n = 16) soignés à l'Hôpital Universitaire de Genève. L'apparence des LS variait de

jaune paille à orange (voir photos en Annexe 5). Les échantillons ont été fournis avec des informations cliniques, radiographiques et biochimiques sur les patients comme indiqué dans le Tableau 5.1.

Après collecte, les échantillons de LS ont été placés dans des tubes Eppendorf® non stériles hermétiques et correctement identifiés et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

N° LS	Score KL	Site	Sexe	Age (ans)	IMC	Dosage Leptine dans LS	Dosage IL-6 dans LS
HUG1	KL4	Genou	F	67	27,6	1,2	8,8
HUG2	KL4	Genou	F	77	26	13,6	13,7
HUG3	KL4	Genou	F	83	33,9	85,9	80,3
HUG4	KL4	Genou	F	77	48,3	103	95,9
HUG5	KL4	Genou	F	69	31,6	12,5	108
HUG6	KL4	Genou	F	83	28,4	9,6	410
HUG7	KL4	Genou	F	79	22,3	1,8	178
HUG8	KL4	Genou	F	80	34,7	34,6	312
HUG9	KL4	Genou	F	86	30,7	5	700
HUG10	KL4	Genou	F	73	42,5	80,6	5,7
HUG11	KL4	Genou	F	85	31,6	11,2	202
HUG12	KL2	Genou	F	61	22,1	2,2	31,8
HUG13	KL2	Hanche	F	68	33,3	44,6	396
HUG14	KL2	Hanche	F	42	25,7	7,3	1342
HUG15	KL2	Hanche	F	65	26,4	8,3	747
HUG16	KL2	Hanche	H	70	21,7	1,7	84,1

Tableau 5.1 | Liste des échantillons de LS prélevés sur patients arthrosiques avec informations cliniques (âge, IMC Indice de Masse Corporelle, sexe, site articulaire), radiographiques (score KL), biochimiques (dosage de la leptine et interleukine-6 dans le LS).

Des tests de Mann-Whitney réalisés sur les données mises à disposition montrent que les différences d'âge sont significatives entre patients de grades KL4 et KL2 ($p = 0,0064$) mais ce qui n'est pas le cas pour l'indice de masse corporelle (IMC) ($p = 0,053$). On note par ailleurs qu'une forte corrélation ($R^2 = 76,4\%$) relie logiquement le dosage en leptine, une adipokine produite par le tissu adipeux, dans le LS et l'IMC.

1.2 Les techniques expérimentales

Les LS des patients arthrosiques ont été caractérisés selon le protocole détaillé dans le Chapitre 2, à savoir une analyse tribologique des gouttes de LS séchées pour déterminer la surface des gouttes et la hauteur des bourrelets suivie d'une analyse physico-chimique par spectroscopie Raman pour identifier la composition des LS.

2. Résultats

2.1 Analyse tribologique des gouttes

Comme pour les modèles précédents, les gouttes ont été déposées sur des lames en verre standard et des images 2D des gouttes séchées ont été capturées. Toutes les images des gouttes des échantillons de LS humains (n=16) sont visibles en Annexe 6. Les surfaces des gouttes calculées dans ImageJ n'ont fait apparaître aucune différence entre les groupes classés d'après leur score radiographique (Figure 5.1a) :

- ➔ le groupe de score KL4 (n=11) avait une surface moyenne (écart-type) de $49,21 \text{ mm}^2 (\pm 4,83 \text{ mm}^2)$
- ➔ le groupe de score KL2 (n=5) avait une moyenne (écart-type) de $50,66 \text{ mm}^2 (\pm 4,40 \text{ mm}^2)$

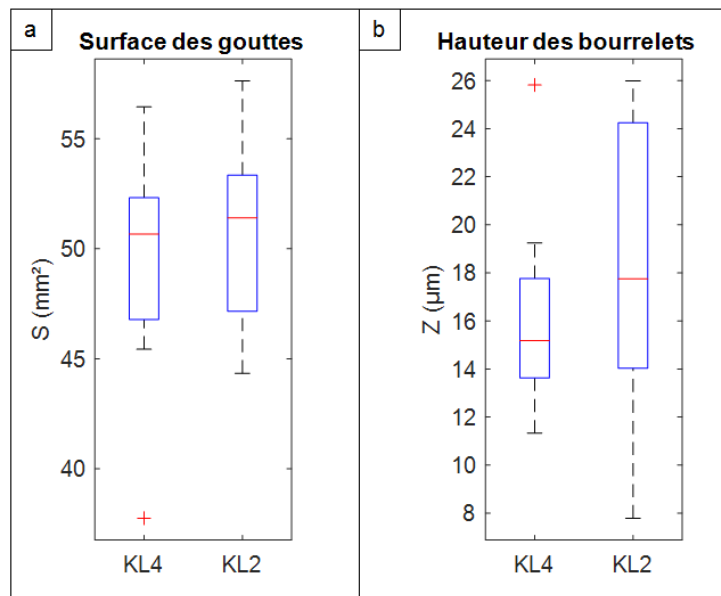


Figure 5.1 | Surface des gouttes et hauteurs des bourrelets des gouttes de LS classés par scores radiographiques. Les boîtes à moustache (ie. « box plot ») représentent médianes, quartiles et valeurs minimales et maximales (a) des surfaces des gouttes et (b) des hauteurs des bourrelets des gouttes séchées de LS de patients arthrosiques.

La périphérie des gouttes de LS de patients arthrosiques a également été mesurée par interférométrie. Les cartes topographiques sont visibles en Annexe 7. Là encore, les hauteurs des bourrelets calculées dans Matlab n'ont fait apparaître aucune différence entre les groupes classés d'après leur score radiographique (Figure 5.1b) :

- ➔ le groupe de score KL4 (n=11) avait une hauteur moyenne (écart-type) de $16,13 \text{ µm} (\pm 3,82 \text{ µm})$
- ➔ le groupe de score KL2 (n=5) avait une moyenne (écart-type) de $18,26 \text{ µm} (\pm 6,38 \text{ µm})$

2.2 Analyse physico-chimique

2.2.1 Répétabilité des mesures

Les écarts intra- et inter-zones ont été calculés et sont tous compatibles avec le seuil limite fixé au Chapitre 2. Il est cependant intéressant de noter que la moyenne (*écart-type*) des écarts intra-zone est de $0,13 (\pm 0,052)$ et de $0,09 (\pm 0,037)$ pour les écarts inter-zone, résultats plus élevés que pour les LS animaux, du fait de la présence aléatoire de deux nouvelles bandes Raman à 1156 cm^{-1} et 1517 cm^{-1} sans impact sur notre étude car ces bandes ne sont pas exploitées (Figure 5.2).

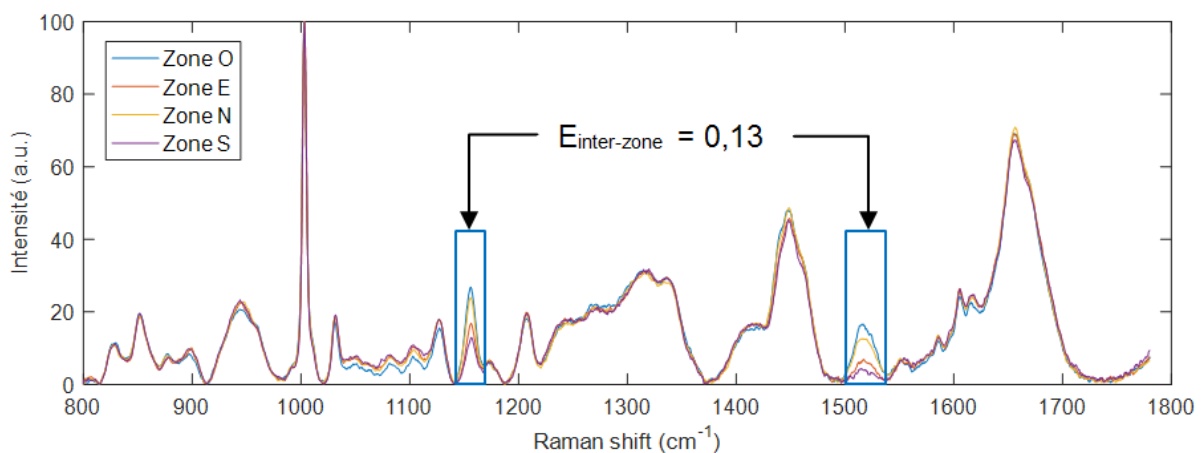


Figure 5.2 | Ecart inter-zone de l'échantillon HUG8 illustrant la présence aléatoire de bandes Raman attribuées à la caroténoïde sur certains échantillons.

2.2.2 Spectres classés par scores radiographiques

Les vingt et une bandes Raman étudiées dans les spectres du modèle canin au Chapitre 3 sont là aussi parfaitement reconnaissables. Néanmoins, un classement par scores radiographiques n'est pas en relation avec les variations d'intensité observées entre les échantillons. Ceci est confirmé par une analyse ACP qui montre clairement que les groupes KL2 et KL4 ne sont pas distincts (Figure 5.3).

Ces résultats sont en accord avec les études montrant que le score radiographique n'est pas corrélé avec le développement symptomatique de la pathologie, en particulier la douleur, et ne reflète donc pas de manière exhaustive son état d'avancement (Link et al., 2003; Loeser et al., 2012).

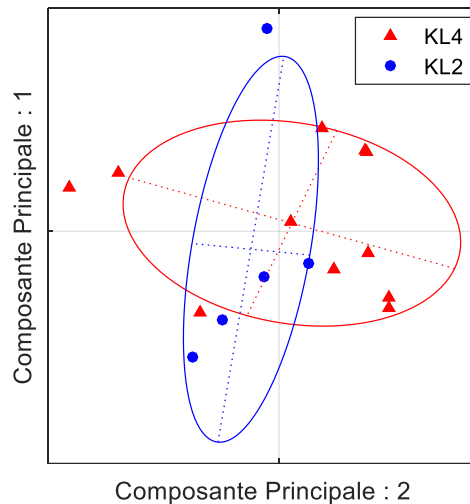


Figure 5.3 | Résultat ACP des patients arthrosiques classés par score radiographique.

2.3 Phénotypage de l'arthrose

L'étude préliminaire menée sur le modèle canin au Chapitre 3 a montré que les biomarqueurs tribologiques, surface des gouttes et hauteur des bourrelets, étaient liés aux biomarqueurs physico-chimiques Raman d'une part, et représentatifs de la présence de la pathologie d'autre part. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés sur le modèle d'OA induite par ACLT sur lapins, montrant la capacité du protocole à suivre l'avancement de la maladie.

Plus précisément, le modèle canin a montré que les gouttes de LS sains étaient typées petite surface (S-) et petite hauteur de bourrelet (H-), alors que les gouttes de LS OA étaient typées grande surface (S+) et grande hauteur de bourrelet (H+) (Figure 5.4).

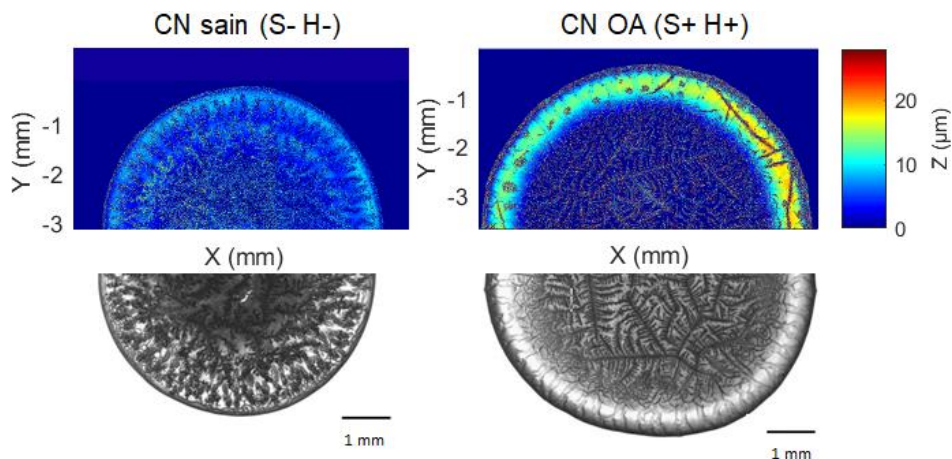


Figure 5.4 | Exemple de typage des gouttes de LS sur le modèle canin.

Il apparaît que les gouttes de LS des patients, tous arthrosiques à des degrés variables, montrent non seulement des types (S- H-) et (S+ H+) mais également des types (S- H+) et (S+ H-) (Figure 5.5).

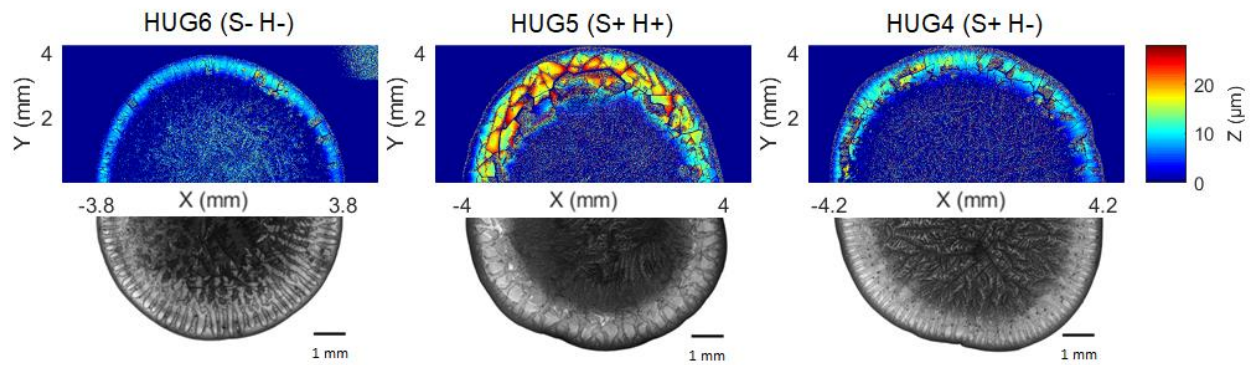


Figure 5.5 | Exemple de typage des gouttes de LS sur les patients arthrosiques.

Ces phénotypes sont confirmés sur les spectres Raman des LS montrant la composition physico-chimique des gouttes de LS de chiens : les LS sains (S- H-) présentait une teneur moindre en protéines alors que les LS OA (S+ H+) avaient une teneur moindre en acide hyaluronique (Figure 5.6 Figure 5.5).

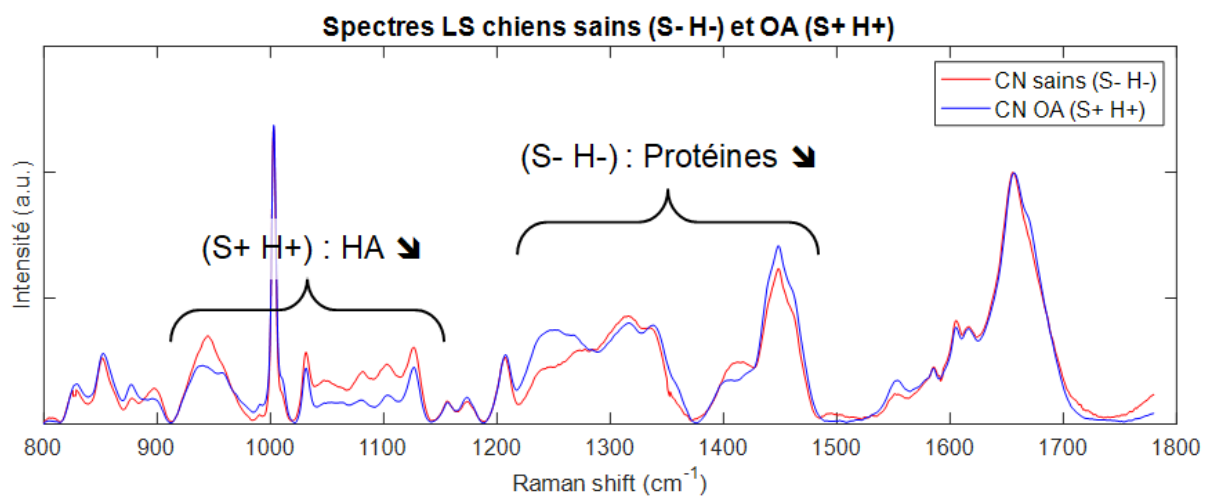


Figure 5.6 | Les phénotypes tribologique et physico-chimiques du modèle canin.

De la même façon, les spectres Raman des gouttes de LS de patients arthrosiques, illustrées Figure 5.5, sont cohérents avec les phénotypes tribologiques identifiés : les gouttes de plus grandes surfaces (S+ H+ et S+ H-) ont une teneur moindre en acide hyaluronique alors que les gouttes de plus petites hauteurs présentent une teneur moindre en protéines (Figure 5.7).

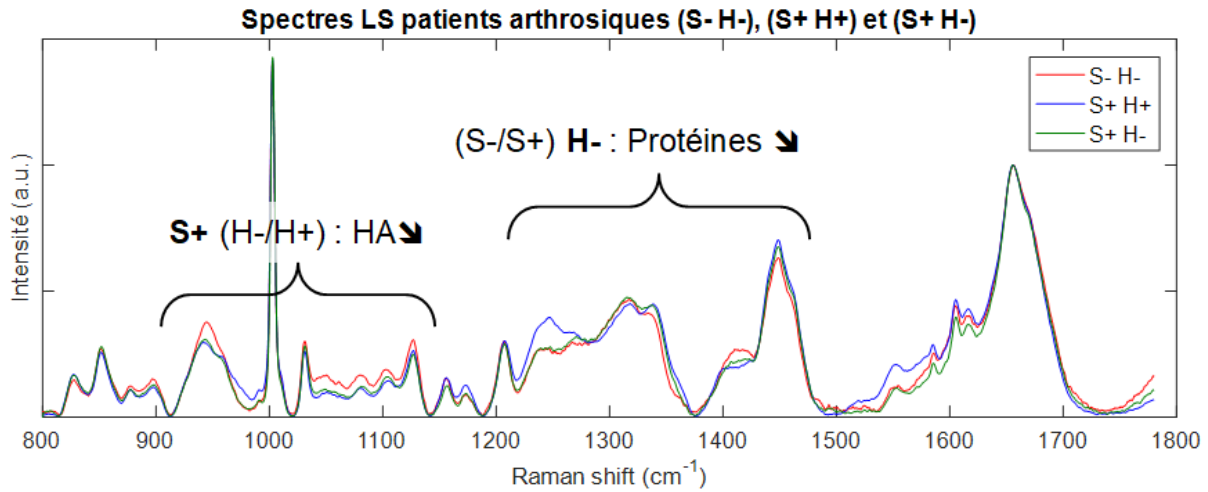


Figure 5.7 | Exemple de phénotypes tribologique et physico-chimiques des patients arthrosiques.

2.4 Analyse physico-tribologique par phénotypes

Afin de confirmer la pertinence de ces phénotypes, des analyses statistiques ont été réalisées en classant les échantillons non par leur score radiographique mais par leur phénotypage tribologique. Pour éviter les effets de bords et avoir la même puissance statistique que sur le modèle canin, des groupes de 6 échantillons ont été constitués (Tableau 5.2).

Les groupes (S-) et (S+) sont constitués respectivement des 6 échantillons de plus petites surfaces et des 6 échantillons de plus grandes surfaces ($p=0,002$). Les groupes (H-) et (H+) sont constitués respectivement des 6 échantillons de plus petites hauteurs de bourrelet et des 6 échantillons de plus grandes hauteurs de bourrelet ($p=0,002$).

n° LS	S [mm ²]	Groupe	Moyenne (± écart-type) [mm ²]	n° LS	H [μm]	Groupe	Moyenne (± écart-type) [μm]
HUG3	37,76	(S-)	44,85 (± 3,39)	HUG12	7,79	(H-)	12,29 (± 2,33)
HUG14	44,34			HUG2	11,33		
HUG1	45,32			HUG6	12,19		
HUG9	46,79			HUG11	13,51		
HUG6	46,81			HUG9	13,99		
HUG16	48,08			HUG4	14,97		
HUG13	51,41	(S+)	54,02 (± 2,31)	HUG1	16,97	(H+)	21,62 (± 3,67)
HUG15	51,92			HUG7	18,03		
HUG5	52,54			HUG8	19,24		
HUG2	54,26			HUG16	23,67		
HUG4	56,43			HUG5	25,82		
HUG12	57,58			HUG14	25,99		

Tableau 5.2 | Constitution des groupes de patients arthrosiques.

Des tests univariés de Mann Whitney ont été réalisés sur ces deux cent dix ratios pour comparer le groupe (S-) (n=6) et le groupe (S+) (n=6) : vingt-quatre d'entre eux se sont révélés être significativement différents parmi lesquels vingt-deux faisaient également partie des cent soixante-quatre ratios significatifs chez les chiens, incluant trois des quatre ratios qui présentaient une forte corrélation (supérieure à 70%) avec la surface des gouttes (Figure 5.8).

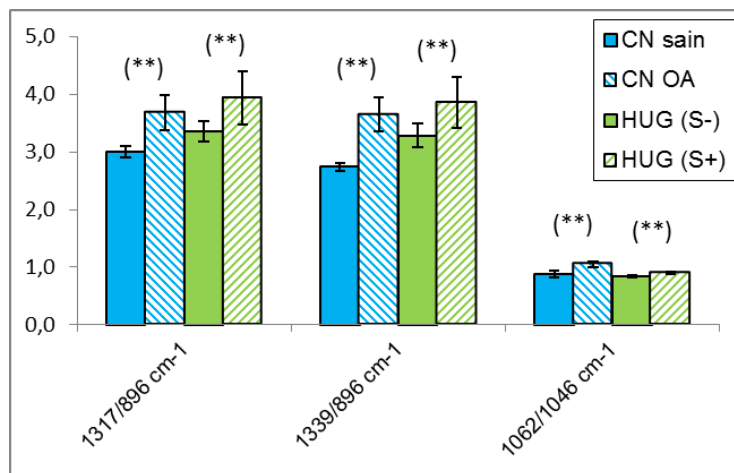


Figure 5.8 | Ratios discriminant les surfaces de gouttes de LS canins et humains. Ces trois ratios sont liés à la teneur en HA ; ** (p<0,01).

Ces trois ratios, tous liés à la teneur en acide hyaluronique (896 et 1046 cm⁻¹), présentent des tendances identiques entre CN sain / OA et HUG (S-)/(S+) et ont été retenus comme biomarqueurs pour séparer les deux groupes.

Une analyse ACP menée sur les deux groupes (S-)/(S+) chez l'homme et les deux groupes sains/OA chez le chien a montré que ces trois ratios avaient effectivement la capacité à distinguer les groupes (Figure 5.9).

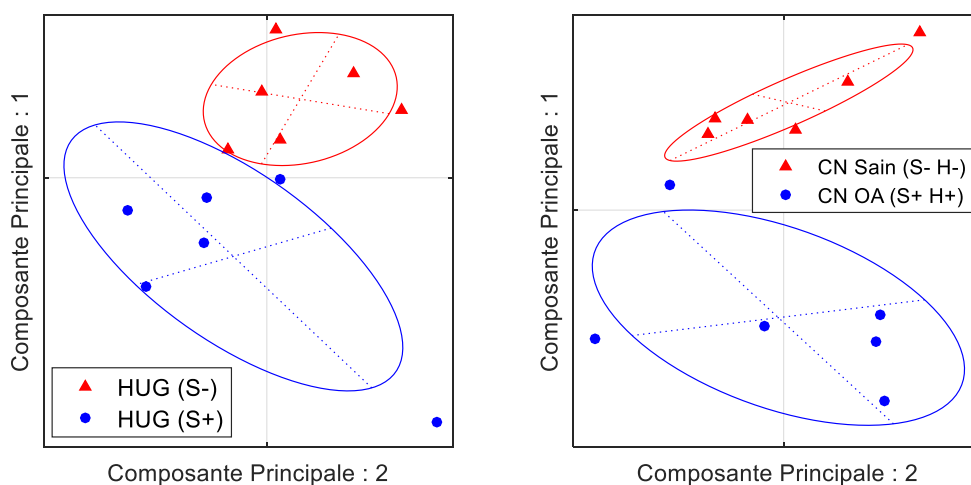


Figure 5.9 | Résultats ACP CN et HUG : groupes (S-) et (S+) les trois ratios sélectionnés liés à la teneur en acide hyaluronique permettent de séparer les groupes.

De la même façon, des tests univariés de Mann Whitney ont été réalisés sur ces deux cent dix ratios pour comparer le groupe (H-) (n=6) et le groupe (H+) (n=6) : quatre-vingt-onze d'entre eux se sont révélés être significativement différents, parmi lesquels quatre-vingt-un faisaient également partie des cent soixante-quatre ratios significatifs chez les chiens, incluant les huit ratios qui présentaient une excellente corrélation (supérieure à 85%) avec la hauteur des bourrelets (Figure 5.10).

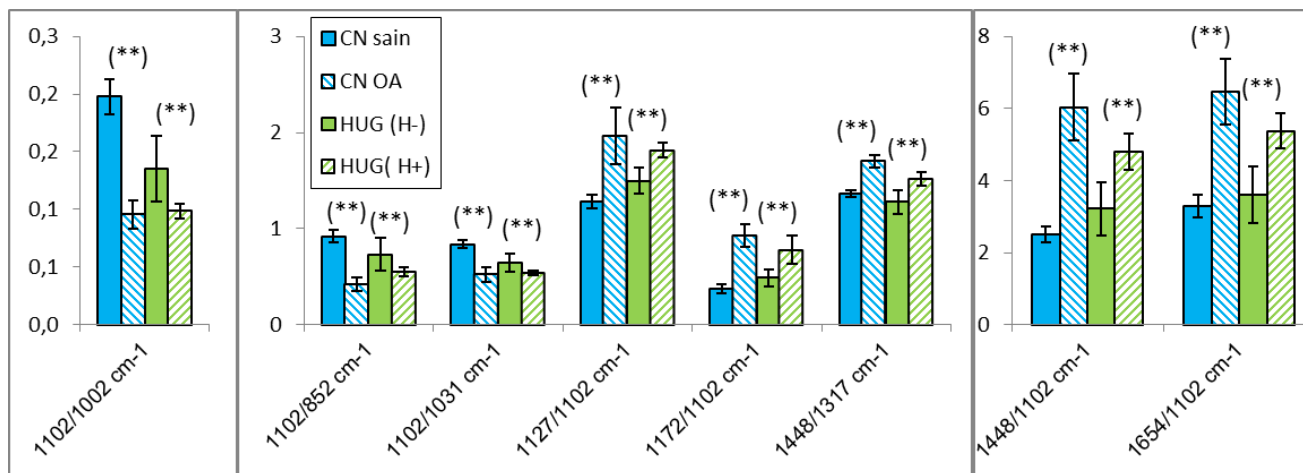


Figure 5.10 | Ratios discriminant les hauteurs de bourrelets des gouttes de LS canins et humains
Ces huit ratios sont liés à la teneur en protéines ; ** (p<0,01).

Ces huit ratios, majoritairement associés à la teneur et structure des protéines (852, 1002, 1031, 1317, 1448 et 1654 cm⁻¹), présentent des tendances identiques entre CN sain et OA et HUG (H-) et (H+) et ont été retenus comme biomarqueurs pour séparer les deux groupes.

Une analyse ACP menée sur les deux groupes (H-)/(H+) chez l'homme et les deux groupes sains/OA chez le chien a montré que ces huit ratios avaient effectivement la capacité à distinguer les groupes (Figure 5.11).

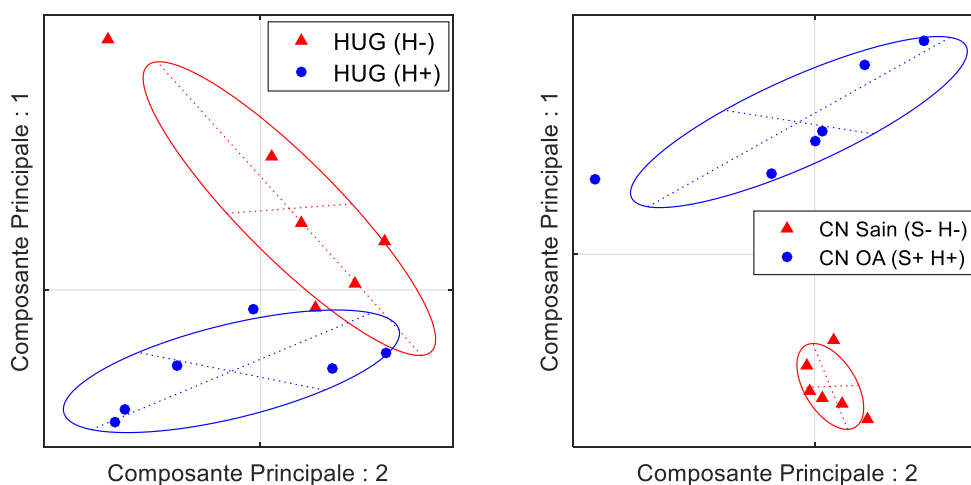


Figure 5.11 | Résultats ACP CN et HUG : groupes (H-) et (H+)
les huit ratios sélectionnés liés à la teneur et structure des protéines permettent de séparer les groupes.

Par ailleurs, des tests de corrélation de Pearson ont été menés sur les deux cent dix ratios pour trouver les corrélations pouvant exister chez l'homme (n=16) entre les ratios et les caractérisations tribologiques des gouttes (surface des gouttes et hauteur des bourrelets).

Aucune corrélation pertinente n'a été trouvée avec la surface des gouttes.

Douze ratios ont révélé une corrélation supérieure à 75% ($p < 10^{-4}$) avec la hauteur des bourrelets, tous en relation avec des bandes relatives aux protéines (Tableau 5.3). Parmi eux, trois étaient également le témoin d'une excellente corrélation ($R^2 > 85\%$) chez le chien.

Ratios	Type	HUG (H-)		HUG (H+)		Mann-Whitney p	Tendance	Corrélation Hauteur R ² (%)
		Moyenne	$\sigma(\pm)$	Moyenne	$\sigma(\pm)$			
1448 cm ⁻¹ /945 cm ⁻¹	Pr/HA	1,80	0,30	2,34	0,24	0,026	↗	85,0
1654 cm ⁻¹ /945 cm ⁻¹	Pr/HA	2,01	0,31	2,62	0,26	0,015	↗	83,6
1448 cm ⁻¹ /1002 cm ⁻¹	Pr/Pr	0,41	0,03	0,47	0,03	0,009	↗	77,7
1448 cm ⁻¹ /1031 cm ⁻¹	Pr/Pr	2,01	0,25	2,56	0,23	0,009	↗	84,8
1654 cm ⁻¹ /1031 cm ⁻¹	Pr/Pr	2,26	0,25	2,87	0,28	0,004	↗	75,9
1172 cm ⁻¹ /1046 cm ⁻¹	Pr/HA	0,64	0,17	1,11	0,29	0,041	↗	78,5
1172 cm ⁻¹ /1062 cm ⁻¹	Pr/C6S	0,73	0,20	1,31	0,32	0,009	↗	79,0
1448 cm ⁻¹ /1081 cm ⁻¹	Pr/Pr	4,04	1,01	6,13	0,65	0,009	↗	77,2
1654 cm ⁻¹ /1081 cm ⁻¹	Pr/Pr	4,53	1,06	6,85	0,49	0,002	↗	78,3
1448 cm⁻¹/1102 cm⁻¹	Pr/HA	3,22	0,75	4,80	0,49	0,009	↗	75,8
1654 cm⁻¹/1102 cm⁻¹	Pr/HA	3,61	0,78	5,38	0,50	0,002	↗	78,1
1448 cm⁻¹/1317 cm⁻¹	Pr/Pr	1,28	0,12	1,52	0,07	0,002	↗	83,0

Tableau 5.3 | Liste des douze ratios montrant un bon degré de corrélation avec la hauteur des bourrelets Moyennes et écarts-types des ratios, valeurs p des tests de Mann-Whitney, tendances d'évolution, coefficients de corrélation avec la surface des gouttes. Les valeurs en gras correspondent aux trois ratios qui présentent également un excellent degré de corrélation entre les surfaces des gouttes de LS de chiens sains et OA. HA : acide hyaluronique, Pr : protéines, C6S : chondroïtine 6-sulfate.

La Figure 5.12 montre par ailleurs que ces trois ratios ont une aptitude inter-espèces puisque les nuages de points sont confondus entre les LS canins et humains.

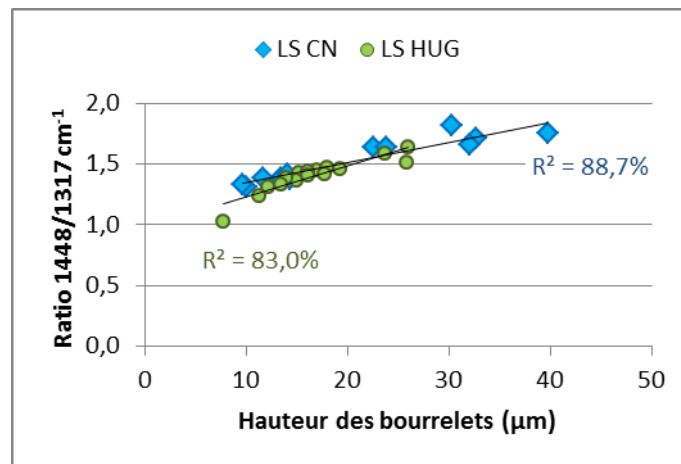
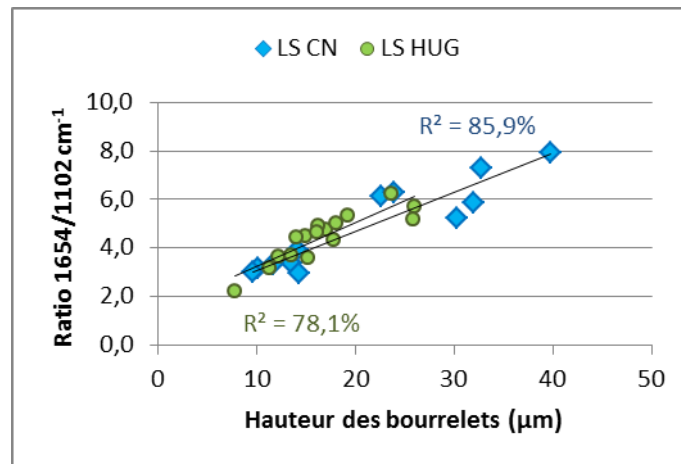
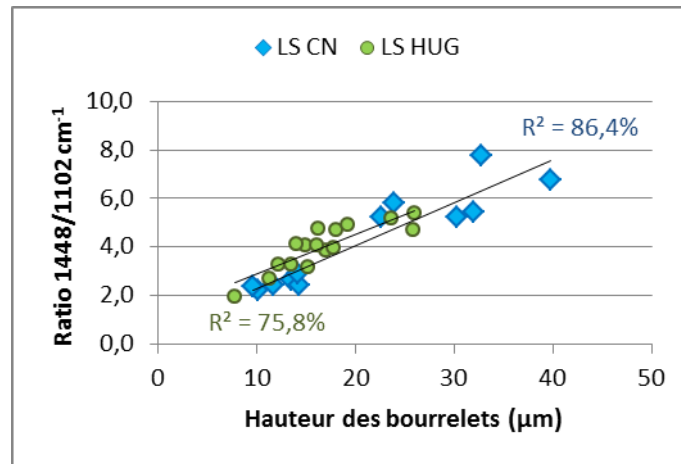


Figure 5.12 | Ratios communs CN et HUG montrant de fortes corrélations avec la hauteur des bourrelets.

2.5 Lien avec le degré d'inflammation

Des corrélations ont également été recherchées, chez l'homme (n=16), entre les caractéristiques physico-chimiques et tribologiques (ratios, surface des gouttes, hauteur des bourrelets) et les informations biochimiques disponibles. Ces informations biochimiques étaient issues du dosage de la leptine et de l'interleukine-6 dans le LS par HUG.

La leptine fait partie de la famille des adipokines, protéines produites par les tissus adipeux. Elle est liée au poids des patients. Elle traduit donc un risque d'une augmentation des forces mécaniques sur les articulations des membres inférieurs, pouvant conduire à une dégradation du cartilage. En outre, plusieurs études ont montré une relation entre l'obésité et le développement de l'OA dans les articulations non portantes, comme les doigts, mains, poignets (Visser et al., 2014). Aussi, des études sont menées pour comprendre l'influence systémique (plasma sanguin) et/ou locale (LS) des adipokines dans la dégradation du cartilage et l'inflammation synoviale (Calvet et al., 2016; Poonpet and Honsawek, 2014; Yusuf and Kloppenburg, 2013).

L'interleukine-6 (IL-6) est quant à elle une cytokine pro-inflammatoire, au même titre que IL-1 β ou TNF- α par exemple, dont la concentration dans le LS est aujourd'hui considérée comme un biomarqueur reflétant la gravité des dégradations articulaires et du processus inflammatoire (Attur et al., 2010; Benito et al., 2005b).

Ces tests ont mis en évidence une relation entre les ratios liés à la chondroïtine 6-sulfate (C6S à 1062 cm⁻¹) et le dosage en interleukine-6. Sept ratios présentaient une bonne corrélation (R^2 compris entre 46% et 59%) avec le dosage en interleukine-6, exprimé sous forme logarithme, dont six sont liés à la chondroïtine 6-sulfate : l'augmentation en interleukine-6 se traduit par une diminution en chondroïtine 6-sulfate. La Figure 5.13 montre les trois ratios ayant les meilleurs coefficients de corrélation.

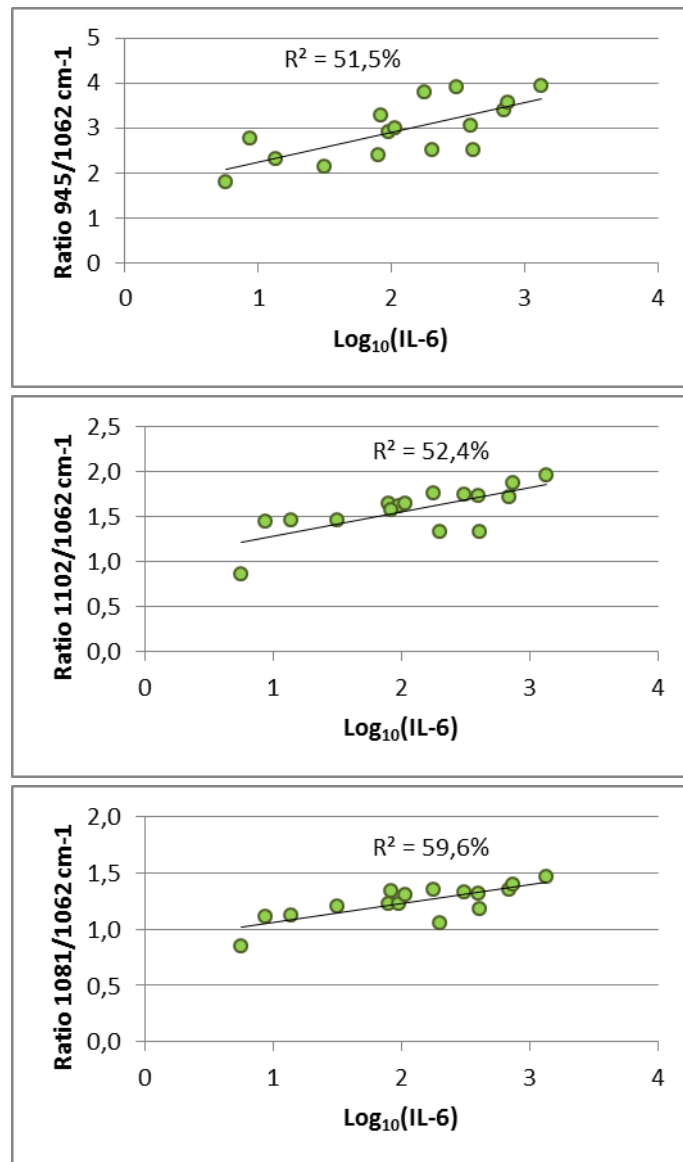


Figure 5.13 | Ratios HUG montrant de bonnes corrélations avec IL-6.

3. Discussion

Cette étude a permis la caractérisation de LS de patients souffrant d'arthrose, dont la sévérité, évaluée par le score radiographique de Kellgren-Lawrence, était classée en deux catégories : KL2 et KL4. Ici, ne disposant pas de LS sain, les différences observées entre les groupes de LS constitués présentent sans doute moins de différences que ce qui a pu être mis en évidence entre les LS de chiens sains et arthrosiques.

Comme nous nous y attendions, les premiers résultats confortent ce qui a été noté dans de nombreuses études à savoir que le score radiographique ne reflète pas le développement symptomatique de la pathologie (Link et al., 2003; Loeser et al., 2012).

Esmonde-White et al. avaient utilisé une technique proche en 2008 pour étudier des LS de patients arthrosiques dont la sévérité de l'OA était également gradée par les scores radiographiques (Esmonde-White et al., 2008a, 2009a, 2009b). Cette étude portait sur les LS du genou de quarante patients, composés d'hommes (n=29) et de femmes (n=11) de grades KL 0 à 4, classés en deux groupes : un groupe de faibles scores KL 0/1 (n=17) et un groupe de forts scores KL 2/4 (n=23). Des faibles volumes de LS avaient été déposés sur des lames de verre, mais de volume non constant, entre 2 et 10 μl . Aucune analyse d'étalement de la goutte sur le verre n'avait donc été effectuée et le bourrelet périphérique, visible sur les photos, n'avait pas été noté ni étudié. Les analyses des gouttes séchées s'étaient davantage focalisées sur la recherche de différences morphologiques globales. La présence de cristaux dendritiques au centre de la goutte n'était pas corrélée aux scores ($R^2 = 0,11$) et la présence de fissures radiales dans le bord de goutte, très modérément corrélée aux scores ($R^2 = 0,33$). Les analyses spectrales ont également été réalisées par la comparaison des ratios d'intensité de bandes Raman. Cette étude avait mis en évidence que les régions correspondant au squelette des protéines et aux liaisons Amide I dans les spectres Raman étaient sensibles aux dommages causés par l'OA : une augmentation des ratios $1080\text{ cm}^{-1}/1001\text{ cm}^{-1}$ et $1670\text{ cm}^{-1}/1655\text{ cm}^{-1}$ avait été constatée ($p < 0,01$) entre les groupes KL 0/1 et KL 2/4. Ces résultats mettaient en évidence une altération de l'environnement chimique du squelette des protéines et une augmentation du désordre dans la structure secondaire des protéines.

Ces résultats ne peuvent être comparés aux nôtres puisque, même si les ordres de grandeur des ratios sont les mêmes, nous ne disposons pas de référence à faible score radiographique. Dans notre étude, les ratios cités ci-dessus ne sont pas significativement différents entre scores KL4 et KL2.

Capacité du protocole à phénotyper les échantillons

L'OA est une maladie hétérogène et progressive qui affecte toutes les structures articulaires. Elle est caractérisée par une nature complexe et multifactorielle, contribuant à la variabilité des symptômes et des réponses aux traitements. Phénotyper les patients, c'est-à-dire pouvoir les classer en sous-

groupes homogènes de patients, constitue un défi pour la mise en place d'une médecine personnalisée et efficace (Dell'Isola et al., 2016). Les analyses ont donc été axées sur la recherche de marqueurs permettant de construire des groupes de patients ayant des caractéristiques physico-tribologiques communes pour pouvoir ainsi les distinguer et à terme leur proposer des traitements actuels ou futurs, préventifs ou curatifs, adaptés à chacun d'entre eux.

Pour cela, les échantillons ont été classés en séparant d'un côté les gouttes de LS de petites et grandes surfaces (S-)/(S+) et d'un autre côté les gouttes de LS de petites et grandes hauteurs de bourrelets périphériques (H-)/(H+).

Plusieurs ratios ont montré ici leur aptitude à séparer des sous-groupes de LS, de façon cohérente avec ce qui a été observé dans le modèle spontané canin pour lequel des LS sains ont été caractérisés. Les tests de corrélation ont par ailleurs confirmé les résultats observés chez le chien attestant de ratios liés aux protéines linéairement reliés aux hauteurs des bourrelets périphériques des gouttes séchées. Ces ratios sont donc les témoins de l'afflux de protéines dans le LS, induit par la perméabilité de la membrane synoviale elle-même provoquée par l'inflammation déclenchée par le processus arthrosique.

Capacité du protocole à suivre l'inflammation

La dernière corrélation démontrée est compatible avec des études montrant la propriété anti-inflammatoire de la chondroïtine sulfate (Henrotin et al., 2014; Volpi, 2011). L'inflammation est une réponse protectrice initiée après une blessure ou une infection par des microorganismes. Composée de réponses systémiques et locales, l'inflammation est un processus biologique essentiel visant à éliminer les facteurs nocifs et à favoriser les processus de réparation des tissus et de cicatrisation des plaies. Les chaînes de chondroïtine sulfate ont la capacité à interagir avec une grande variété de molécules, y compris les molécules matricielles, les facteurs de croissance, les inhibiteurs de protéase, les cytokines, les chimiokines. Cette faculté lui confère des fonctions biologiques importantes dans l'inflammation, la prolifération cellulaire, la différenciation, l'infection et la réparation des plaies, en plus de ses rôles structurels conventionnels (Volpi, 2011). Les propriétés anti-inflammatoires de la chondroïtine sulfate ont été observées dans différents modèles animaux. Dans ces modèles, la chondroïtine sulfate administrée a été capable de réduire de manière significative

l'inflammation et la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'interleukine-6 (Henrotin et al., 2014; Herrero-Beaumont et al., 2008; Volpi, 2011).

Conclusion du chapitre

L'objectif principal de cette étude était de vérifier le potentiel de la technique de caractérisation du LS pour phénotyper les LS de patients arthrosiques. De nombreuses recherches sont focalisées aujourd'hui sur cet objectif qui offrirait la possibilité d'adapter à chaque sous-groupe les traitements actuels ou futurs, préventifs ou curatifs (Cadet et al., 2015).

Dans cette étude, le protocole de caractérisation du LS a dans un premier temps confirmé que le classement par score radiographique n'était pas pertinent.

En revanche, elle a confirmé la possibilité de classer les échantillons de LS selon les paramètres de surface (S-)/(S+) et hauteur des bourrelets (H-)/(H+) des gouttes de LS. Ce classement, associé à des ratios pertinents, a permis de séparer en sous-groupes la population d'échantillons.

Il faut cependant préciser que les échantillons testés (n=16), principalement des genoux de patientes arthrosiques (n=12), contenaient également quelques échantillons issus de hanches de femmes (n=3) et d'homme (n=1), ce qui pourrait contribuer à une plus grande variabilité des résultats. Par ailleurs, il serait bon d'augmenter le nombre d'échantillons afin pouvoir étudier de manière plus complète les sous-groupes possibles : (S- H-), (S+ H+), (S- H+) et (S+ H-) afin de déterminer plus précisément des ratios pertinents pour les distinguer.

Enfin, cette étude a mis en évidence que ce protocole a également la possibilité de suivre l'état inflammatoire dans l'articulation, non seulement par les données qu'il fournit sur la teneur en acide hyaluronique et en protéines dans le LS, induit par la dégradation de la perméabilité de la membrane synoviale et de la qualité des synoviocytes, mais aussi par la teneur en chondroïtine 6-sulfate qui révèle un bon degré de corrélation avec le dosage en interleukine-6 réalisé sur le LS.

Chapitre 6

BILAN INTER-ESPECES : PROPOSITION DE BIOMARQUEURS DE L'ARTHROSE

Introduction du chapitre

Les trois chapitres précédents ont démontré la capacité du protocole proposé à discriminer différents types de LS. Les caractérisations tribologiques (surface des gouttes et hauteur des bourrelets) et les caractérisations Raman ont en effet prouvé leur cohérence par rapport au processus arthrosique.

Afin de converger vers des biomarqueurs pertinents pouvant servir à phénotyper les gouttes de LS séchées, des analyses inter-espèces ont été menées :

- ➔ chez le chien (OA spontanée par rupture naturelle du LCA),
- ➔ chez le lapin (PTOA induite par ACLT),
- ➔ chez l'Homme (OA spontanée dégénérative).

L'objectif de ce chapitre est de proposer des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques dans un contexte curatif et préventif de l'OA.

1. Biomarqueurs tribologiques

Le Tableau 6.1 recense les valeurs de surfaces des gouttes et hauteurs des bourrelets pour chaque modèle étudié permettant leur comparaison.

Groupes		CN		LP		HUG			
		Sain (n=6)	OA (n=6)	OA 2sem (n=8)	OA 6sem (n=9)	(S-) (n=6)	(S+) (n=6)	(H-) (n=6)	(H+) (n=6)
Surface (mm ²)	Moyenne	27,55	38,37	38,07	29,29	44,85	54,02		
	σ (\pm)	21,74	4,58	2,70	3,21	3,39	2,31		
Hauteur (μ m)	Moyenne	11,81	30,09	27,55	21,74			12,29	21,62
	σ (\pm)	1,71	5,80	1,52	4,58			2,33	3,67

Tableau 6.1 | Propriétés tribologiques des différents groupes des différentes espèces
Surfaces et hauteurs des bourrelets : moyennes et écarts-types.

On remarque que les valeurs de surfaces des gouttes des LS de chiens sains/OA et de lapins OA 2sem/OA 6sem varient dans les mêmes ordres de grandeur, alors que les surfaces des gouttes de LS de patients arthrosiques sont plus grandes. On peut supposer que ces différences de viscosité sont liées à la concentration et la distribution de la masse moléculaire propres à chaque espèce, comme cela a été montré au Chapitre 1. Les valeurs relatives à la concentration en acide hyaluronique et son poids moléculaire dans le LS des chiens et des lapins apparaissent finalement du même ordre de grandeur, ce qui pourrait justifier que les surfaces des gouttes le soit aussi. Les dispersions rapportées chez l'Homme dans diverses études sont importantes et ne permettent pas de conclure même si les valeurs mesurées par Praest *et al.* pourraient justifier la plus faible viscosité des LS des patients arthrosiques.

De la même façon, les hauteurs de bourrelet présentent une grande variabilité entre les espèces et pourraient être liées à des différences dans la teneur en protéines. Cependant, la littérature sur le sujet est insuffisante et aucune justification quantitative ne peut donc être apportée pour expliquer ces différences. On peut néanmoins préciser que chez le lapin, le groupe OA 2sem a montré plusieurs résultats attestant d'un épisode inflammatoire plus important (effusion synoviale, gonflement du cartilage notamment) pouvant expliquer une plus grande quantité de protéines. Il apparaît également que les modèles lapin et chien, liés à la rupture du LCA, induite ou naturelle, provoquent une instabilité dans l'articulation et induisent des hauteurs de bourrelets plus importantes.

On peut également présumer que les différences de durée de progression du processus arthrosique, propre à chaque espèce et modèle, ont une influence sur ces résultats.

Finalement, cette analyse amène à penser que ces biomarqueurs devront être accompagnés d'abaques relatifs à chaque espèce afin de définir les valeurs seuils de chacune, ce qui nécessitera d'augmenter le nombre d'échantillons.

2. Biomarqueurs physico-chimiques

Pour converger vers des ratios physico-chimiques biomarqueurs pertinents, des ratios significatifs communs ont été recherchés entre les différents modèles caractérisés dans cette étude. Au Chapitre 3, il a été observé que compte-tenu de la différence flagrante entre les spectres des LS sains, typés (S-H-), et les LS OA, typés (S+H+) chez le chien, l'intégralité des ratios permettent de distinguer les deux phénotypes (92,2% de la variance totale exprimée dans les composantes principales 1 à 4) (Figure 6.1a). Le modèle ACLT lapin présenté dans le Chapitre 4 a attesté de la capacité de la spectroscopie Raman a détecté les modifications liées à l'avancement de l'OA dans le LS 2 semaines post-ACLT, typé (S+H+), et 6 semaines post-ACLT, typé (S-H-). L'ACP réalisée sur les deux cent dix ratios permet de confirmer la différence entre les deux groupes sur les deux premières composantes principales (71% de la variance totale exprimée dans les composantes principales 1 à 2) (Figure 6.1b). Le chapitre 5 a montré que les gouttes de LS de patients arthrosiques présentent différents phénotypes que les deux cent dix ratios ne peuvent distinguer.

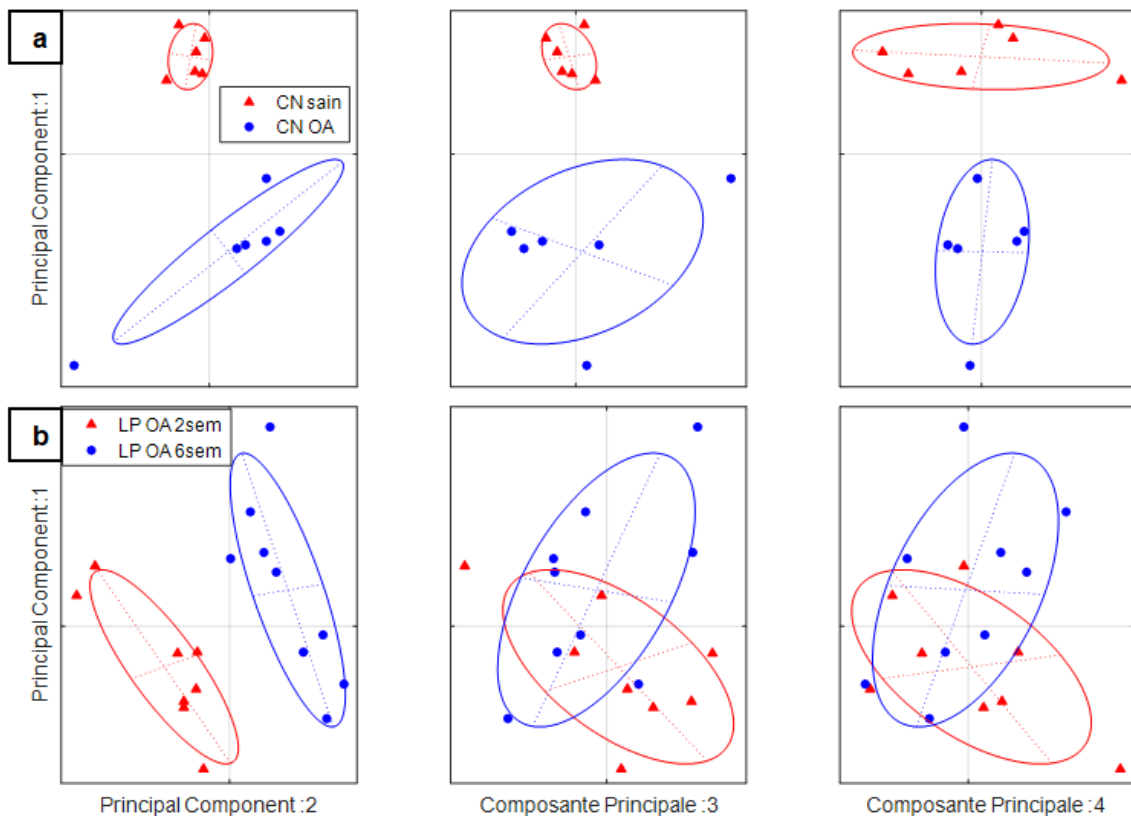


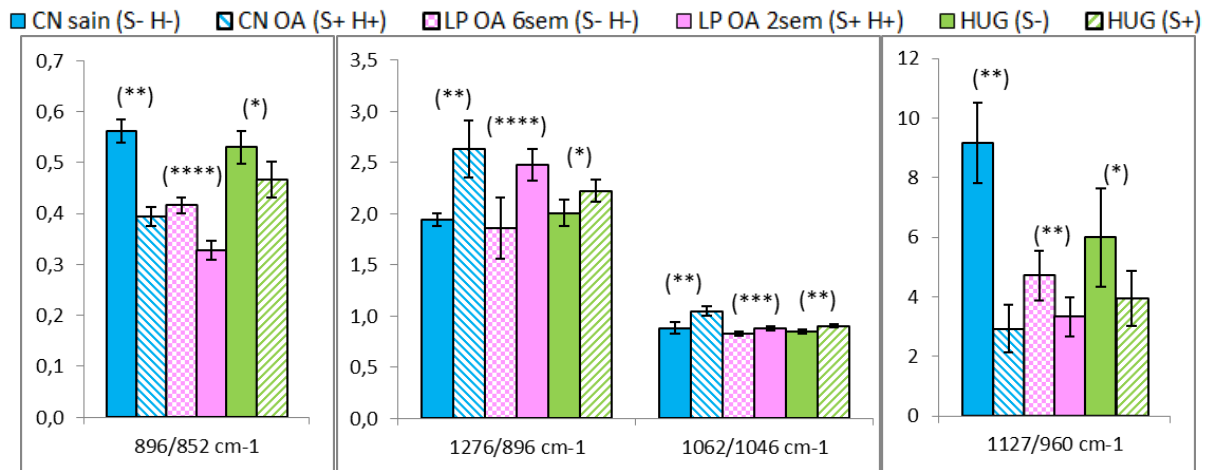
Figure 6.1 | Résultats bruts des ACP CN et LP

Les quatre premières composantes principales sont calculées à partir des deux cent dix ratios :

(a) modèle spontané canin groupes sain (typé S-H-) et OA (typé S+H+)

(b) modèle ACLT de lapin groupes OA 2sem (typé S+H+) et OA 6sem (typé S-H-).

Aussi pour affiner la comparaison, les ratios significatifs communs entre les trois études ont été recherchés. Parmi les cent soixante-quatre ratios significatifs dans le modèle canin, les quatre-vingt-douze ratios chez le lapin et les vingt-quatre ratios chez les patients arthrosiques classés par la surface des gouttes (S-)/(S+), quatre ratios sont communs, présentant des tendances identiques et tous étant en relation avec l'acide hyaluronique (896, 1046 et 1127 cm^{-1}) (Figure 6.2).



Une analyse ACP menée sur les groupes sains/OA chez le chien, les groupes (S-)/(S+) chez l'homme et les groupes OA 2sem/OA 6sem chez le lapin montre que ces quatre ratios ont effectivement la capacité à distinguer les groupes (Figure 6.3).

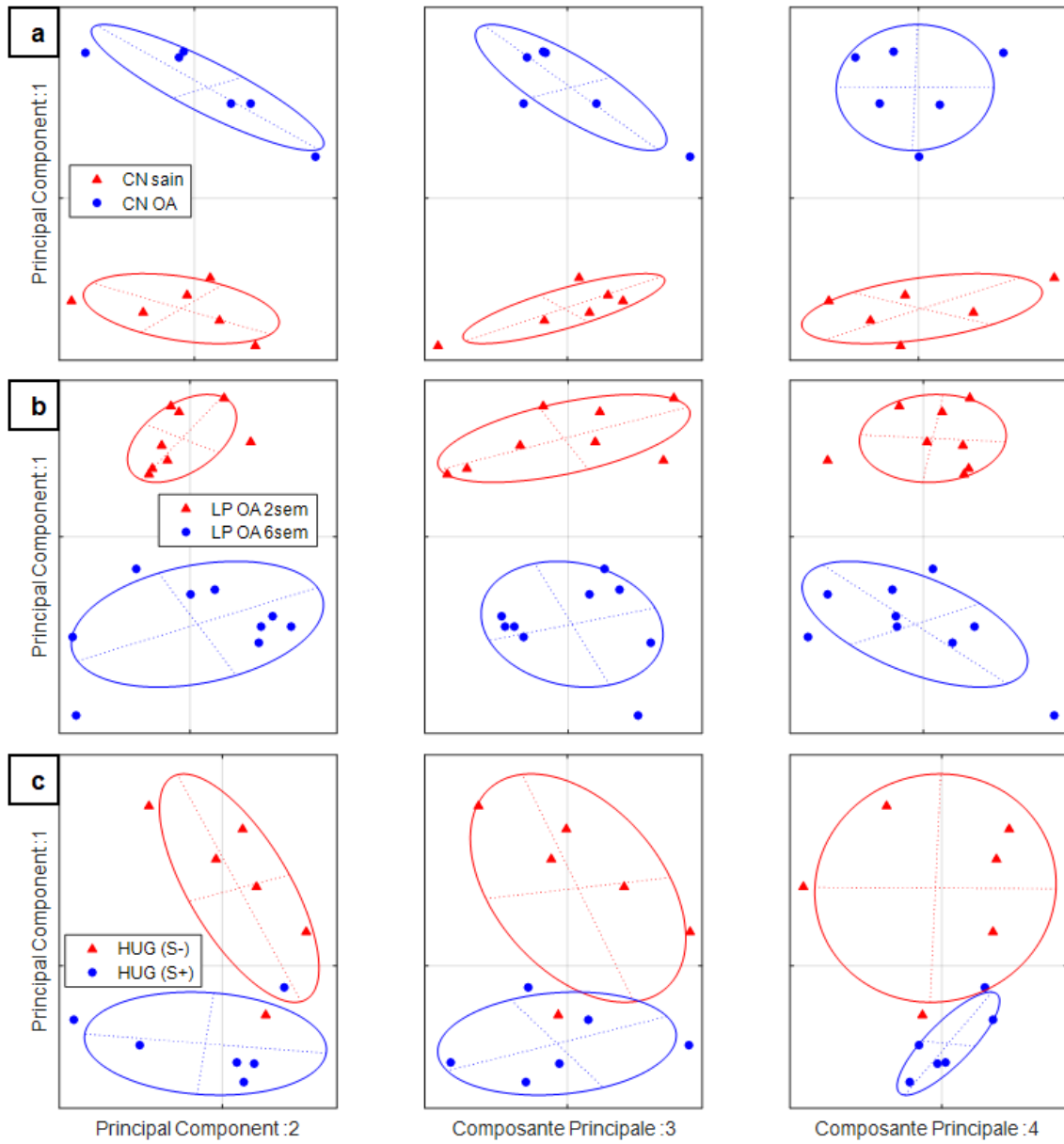


Figure 6.3 | Résultats ACP CN, HUG (S-)/(S+) et LP

Les quatre ratios liés à la teneur en HA permettent de séparer les groupes sur les quatre premières composantes principales :

- (a) modèle spontané canin groupes sain (typé S-H-) et OA (typé S+H+)
- (b) modèle ACLT de lapin groupes OA 2sem (typé S+H+) et OA 6sem (typé S-H-)
- (c) patients arthrosiques classés par surface de gouttes (S-) et (S+).

Parmi les cent soixante-quatre ratios significatifs dans le modèle canin, les quatre-vingt-douze ratios chez le lapin et les quatre-vingt-onze ratios significatifs chez les patients arthrosiques classés par la hauteur des bourrelets (H-)/(H+), trente et un ratios sont communs, incluant quatre des huit ratios retenus comme biomarqueurs pour séparer les groupes de patients arthrosiques (H-) et (H+) au Chapitre 4. Ces quatre ratios présentent des tendances identiques et tous étant en relation avec l'acide hyaluronique (852, 1002, 1317 et 1448 cm^{-1}) (Figure 6.4).

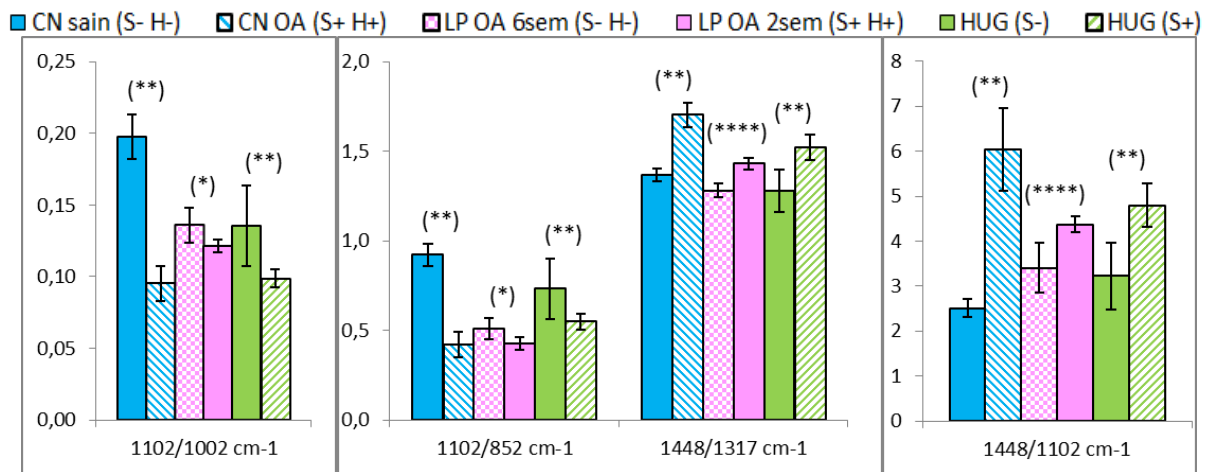


Figure 6.4 | Ratios discriminant les hauteurs des bourrelets des gouttes de LS de chiens, de patients arthrosiques triés par la hauteur des bourrelets et de lapins. Ces quatre ratios sont liés à la teneur en protéines ; * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), **** ($p < 0,0001$).

Une analyse ACP menée sur les groupes sains/OA chez le chien, les groupes (H-)/(H+) chez l'homme et les groupes OA 2sem/OA 6sem chez le lapin montre que ces quatre ratios ont effectivement la capacité à distinguer les groupes (Figure 6.5).

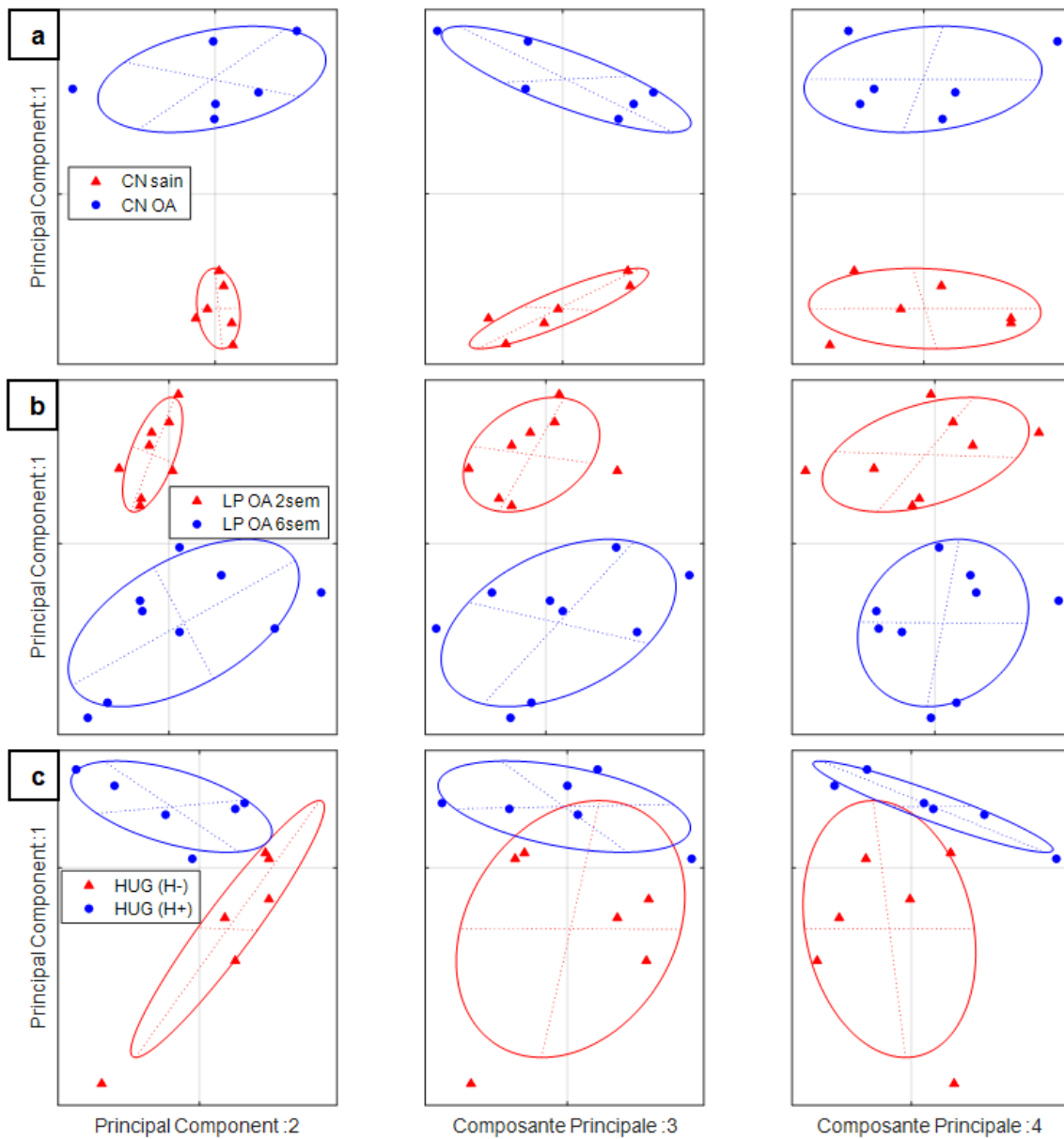


Figure 6.5 | Résultats ACP CN, HUG (H-)/(H+) et LP
 Les quatre ratios liés à la teneur en protéines permettent de séparer les groupes sur les quatre premières composantes principales :

- (a) modèle spontané canin groupes sain (typé S-H-) et OA (typé S+H+)
- (b) modèle ACLT de lapin groupes OA 2sem (typé S+H+) et OA 6sem (typé S-H-)
- (c) patients arthrosiques classés par hauteur de bourrelets (H-) et (H+).

Cette analyse comparative permet finalement de proposer des biomarqueurs, cohérents avec le processus arthrosique, et qui ont montré leur aptitude à séparer les populations d'échantillons.

Conclusion du chapitre

Finalement, à ce stade de l'étude, des biomarqueurs physico-chimiques et tribologiques peuvent être proposés.

A l'échelle macroscopique, il est acquis que la surface des gouttes séchées et de la hauteur du bourrelet périphérique sont aptes à séparer les populations d'échantillons. Ces biomarqueurs ont démontré leur pertinence par la relation qu'ils ont prouvée avec les phénomènes physiques associés au processus arthrosique : l'inflammation, l'augmentation de la perméabilité de la membrane synoviale et la dégradation de la synthèse de l'acide hyaluronique par les synoviocytes.

A l'échelle moléculaire, deux séries de quatre biomarqueurs ont permis d'expliquer les différences de surface et les différences de hauteurs de bourrelets. Cependant, il ne faut pas oublier que le modèle lapin a été induit par un geste opératoire et que les résultats obtenus sur ce modèle sont donc les conséquences de la réaction systémique à l'intervention chirurgicale et de la réaction locale liée à la progression de l'OA. Un plus grand nombre d'échantillons seront donc nécessaires pour aboutir à un choix pertinent de biomarqueurs physico-chimiques relatifs uniquement au monitoring de l'OA.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse était de proposer des biomarqueurs de l'arthrose par une analyse offrant une caractérisation complète du LS grâce à la mise en place de méthodes simples, reproductibles et mini-invasives s'appuyant sur des mesures tribologiques et la spectroscopie Raman. Le protocole détaillé de ces méthodes a été explicité dans le Chapitre 2. Il offre une analyse en deux temps :

- ➔ Caractérisation macroscopique du LS par la détermination de la surface des gouttes séchées et de la hauteur du bourrelet périphérique.
- ➔ Caractérisation globale de la composition physico-chimique du LS.

Ce protocole a fait l'objet d'une demande de brevet, déposée le 05/12/16, n°1661956, « Procédé de détection des maladies articulaires ».

A ce stade, les différentes études de ce travail de thèse ont permis de mettre en évidence des résultats complémentaires. Le modèle spontané canin (Chapitre 3) a permis pour la première fois de disposer d'une signature spectrale de LS sains et de prouver la capacité de ce protocole à distinguer le LS sain du LS arthrosique, en mesurant des phénomènes liés au processus arthrosique comme la perte de concentration en acide hyaluronique, l'afflux de protéines sériques dans le LS ou encore la présence de produits de dégradation des tissus intra-capsulaires dans le LS.

L'étude d'un modèle induit d'OA par une opération chirurgicale, l'ACLT, sur plusieurs groupes de lapins (Chapitre 4) avait deux objectifs : i) vérifier la capacité de ce protocole à suivre le développement de la pathologie arthrosique longitudinalement dans le temps avec des tissus prélevés 2 semaines et 6 semaines post-ACLT ; ii) vérifier le potentiel de ce protocole à distinguer les effets d'une thérapie par injection intra-articulaire d'un viscosupplément, le Synvisc-One®, sur l'évolution arthrosique. En outre, ce modèle animal a offert l'opportunité de prélever tous les tissus articulaires des pattes opérées et de disposer d'un groupe contrôle de lapins sains. Les dégradations macroscopiques des tissus ont été évaluées selon l'échelle développée par Laverty et al. (Laverty et

al., 2010). Les propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages des compartiments médiaux ont été mesurées et identifiées à partir d'une méthode développée précédemment dans le laboratoire (Levillain, 2016). Les LS pathologiques ont été caractérisés selon notre protocole, en l'absence de contrôles sains, le volume disponible dans ces articulations étant insuffisant. Les résultats ont mis en évidence les liens, cohérents avec le processus arthrosique, entre les propriétés physico-tribologiques du LS et la dégradation des tissus viscoélastiques dans le temps d'une part et les scores macroscopiques d'autre part.

L'étude des LS de patients arthrosiques (Chapitre 5), prélevés chez des patients radiographiés de score KL2 et KL4 à l'Hôpital Universitaire de Genève a témoigné de la capacité du protocole développé dans cette thèse à différencier des sous-groupes d'échantillons arthrosiques.

Le dernier chapitre a permis de proposer des biomarqueurs qui semblent pertinents de l'évolution de la pathologie arthrosique.

A l'échelle macroscopique, la surface des gouttes séchées et la hauteur du bourrelet périphérique ont montré leur aptitude à séparer les populations d'échantillons. Ces biomarqueurs ont prouvé leur pertinence avec les phénomènes physiques associés au processus arthrosique : l'inflammation, la diminution de la perméabilité de la membrane synoviale et la dégradation de la synthèse de l'acide hyaluronique par les synoviocytes.

A l'échelle moléculaire, deux séries de quatre biomarqueurs ont permis d'expliquer les différences de surface et les différences de hauteurs de bourrelets. Cependant, un plus grand nombre d'échantillons sera nécessaire pour aboutir à un choix pertinent de biomarqueurs physico-chimiques permettant de phénotyper efficacement les groupes (S-H-), (S+H+), (S+H-) et (S-H). Par ailleurs, d'autres ratios d'intérêt ont pu être mis en évidence, qui demanderont aussi à être confirmés par des études complémentaires :

- ➔ des ratios permettant de suivre la dégradation des tissus articulaires (os sous-chondral & phosphate minéral osseux, cartilage et ménisque & chondroïtine sulfate) ont été identifiés chez le chien,
- ➔ des ratios liés à la présence de fibrine en tant que témoin de la sévérité de la pathologie chez le lapin,

- des ratios liés à la chondroïtine sulfate témoignant de l'état inflammatoire de l'articulation par son lien avec l'interleukine-6 chez l'humain.

Perspectives

Plusieurs perspectives s'offrent à nous à l'issu de ce travail de thèse.

A court terme, les résultats obtenus sur les tissus prélevés sur les lapins pourraient être complétés par l'analyse de la teneur en glycosaminoglycanes dans les ménisques à 2 semaines post-ACLT et dans les cartilages à 2 et 6 semaines post-ACLT. Cela permettrait de vérifier la balance entre dégradation et synthèse des glycosaminoglycanes, ainsi que l'action de la viscosupplémentation sur leur régulation. Par ailleurs, les fémurs ayant été entièrement scannés avant la caractérisation des cartilages, il serait intéressant d'analyser les paramètres de l'os trabéculaire sous-chondral pour déterminer ses propriétés microstructurales en fonction de l'avancement de la pathologie et du traitement. Pour compléter cette étude, un groupe composé de cinq lapins euthanasiés 12 semaines post-ACLT a également été caractérisé. Il serait pertinent de vérifier le comportement des tissus viscoélastiques et des LS en fonction de l'avancement de la pathologie en comparaison des groupes 2 et 6 semaines post-ACLT.

A moyen terme, une nouvelle étude pré-clinique sur modèle spontané canin a été initiée. Elle aura pour objectif la caractérisation du LS conformément au protocole établi afin d'étudier les effets de la rupture du LCA, du traitement chirurgical associé (TPLO : ostéotomie de nivellement du plateau tibial, traitement de référence en médecine vétérinaire en cas de maladie du LCA), et d'un traitement par une biothérapie, le PRP (Plasma Riche en Plaquettes). L'étude sera menée dans un contexte clinique, de manière mini invasive, donc sans avoir à réaliser d'euthanasie, sur des chiens de moyenne et grande taille, afin de disposer de chiens de gabarits comparables. Deux groupes de quinze chiens, Opéré (TPLO) et Opéré Traité (TPLO+PRP) sont prévus, ainsi qu'un groupe contrôle de douze chiens non arthrosiques pour confirmer la signature spectrale du LS de chiens sains. Cette étude permettra le suivi longitudinal de la pathologie et du traitement injecté grâce à quatre temps de prélèvements : T0 le jour de l'intervention, 1 mois, 2 mois puis 1 an après l'intervention. Enfin, le chien souffrant de rupture de LCA unilatérale présente également un risque de rupture contralatérale élevé, jusqu'à 50%

dans les 6 mois après la première rupture (Buote et al., 2009). Aussi, une attention particulière sera portée au caractère prédictif d'une rupture contralatérale du LCA.

Dans le même temps, d'autres échantillons de LS de patients arthrosiques vont être mis à disposition par le service de Rhumatologie de l'Hôpital Universitaire de Genève. Il s'agit de LS de femmes souffrant de gonarthrose, de scores radiographiques KL3. Ces échantillons vont permettre d'augmenter le nombre d'échantillons afin d'étudier de manière plus complète les sous-groupes possibles : (S- H-), (S+ H+), (S- H+) et (S+ H-) et de vérifier la pertinence des biomarqueurs identifiés pour les distinguer et la capacité de notre protocole à suivre l'inflammation. Par ailleurs, des LS de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde seront également caractérisés pour déterminer si notre protocole est apte à distinguer d'autres affections articulaires.

Par ailleurs, dans l'idée de rendre notre technologie applicative et accessible facilement au monde de la Santé, d'autres actions sont programmées à plus long terme.

Dans un premier temps, un travail spécifique d'optimisation du protocole existant sera réalisé pour rendre la mesure de la surface des gouttes et de la hauteur des bourrelets la plus rapide possible (idéalement ~20 minutes pour la rendre compatible avec visite chez un médecin rhumatologue) et fournir un cahier des charges pour le développement d'un prototype.

Dans le même temps, des patients arthrosiques et non arthrosiques seront recrutés. Les LS humains non arthrosiques (n~6) permettront d'avoir des caractéristiques de référence et proviendront de cas très spécifiques de patients jeunes souffrant d'ostéosarcome et nécessitant une opération du genou. Le prélèvement de LS, sans impact pour le patient, sera réalisé au cours de cette intervention. Des patients arthrosiques, traités par viscosupplémentation ou corticothérapie (n~60) seront inclus dans l'étude. Un suivi sera prévu pour identifier les patients répondants ou non aux traitements de viscosupplémentation ou de corticothérapie injecté en termes de gradation de la douleur et de temps. Des dossiers de soumission au CPP (Comité de Protection des Personnes) sont en cours de rédaction dans ce but.

Dans un deuxième temps, la caractérisation des LS prélevés sera réalisée selon le protocole optimisé et une étude comparative entre les caractéristiques macroscopiques des gouttes (surface et hauteur

de bourrelet) et la composition chimique des LS (acide hyaluronique et en protéines) sera menée pour confirmer les relations identifiées. Un intérêt particulier sera porté sur la mise en regard des caractéristiques des LS et le caractère répondant ou non du patient au traitement intra-articulaire injecté.

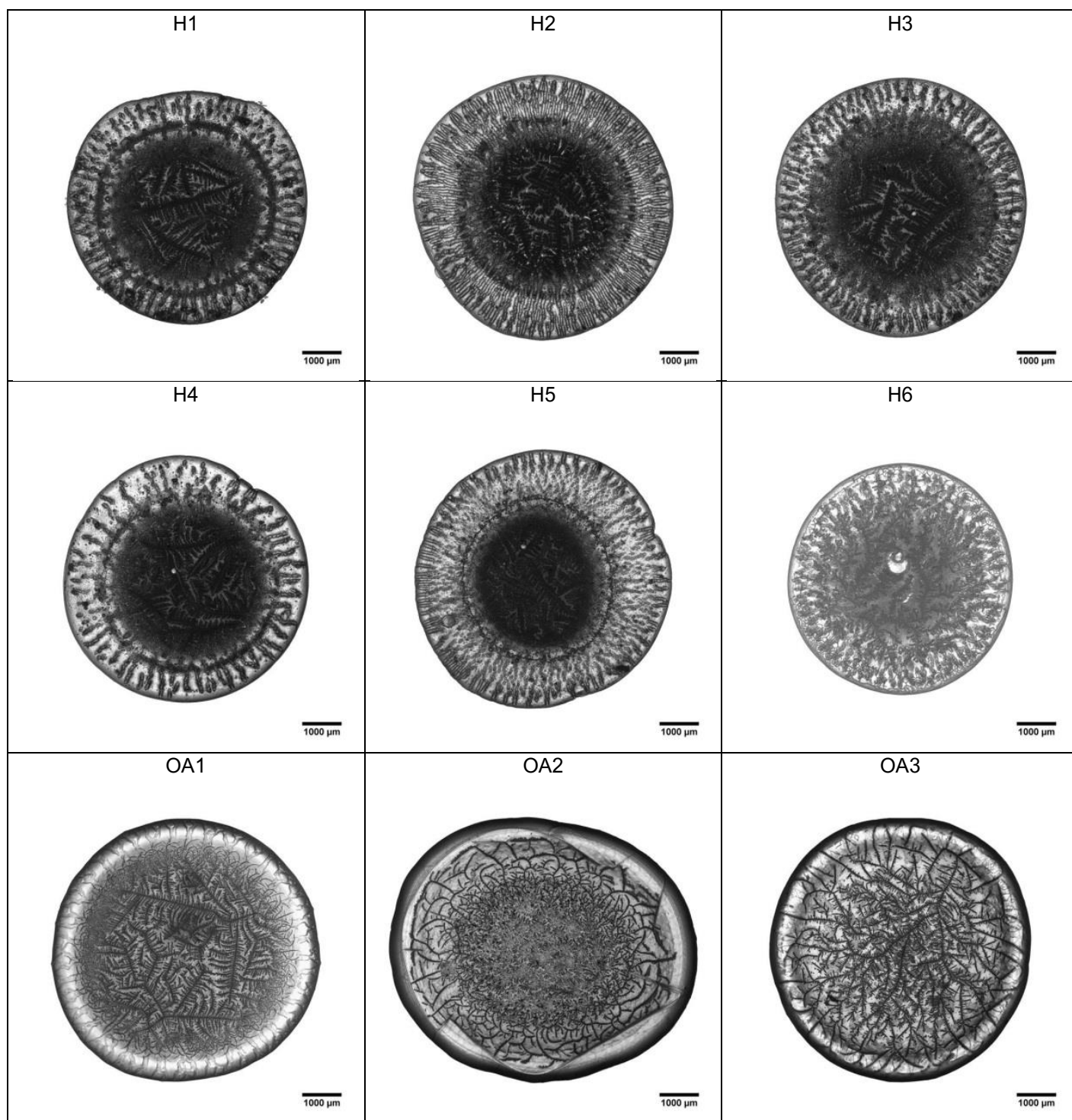
A l'issue de ce travail, les capacités et limites du protocole seront connues et des biomarqueurs pourraient être proposés pour répondre à différentes problématiques selon les secteurs visés :

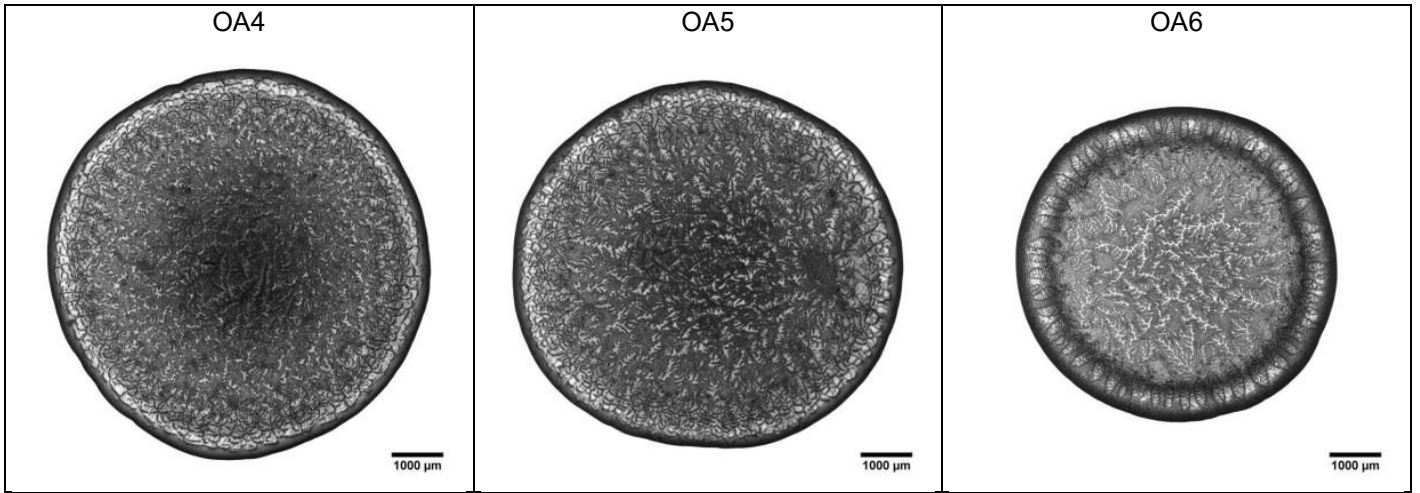
- ➔ Dans le cadre d'essais cliniques d'efficacité des traitements de l'arthrose pour stratifier et identifier les patients répondants,
- ➔ En santé humaine, pour le pronostic d'évolution de la pathologie et de réponses aux traitements,
- ➔ En santé animale, pour le pronostic et le diagnostic précoce durant une arthroscopie, notamment dans le cadre de la prévention de la rupture contralatérale chez le chien.

ANNEXE 1

Images 2D des gouttes séchées de chiens

Toutes les images sont représentées à la même échelle.

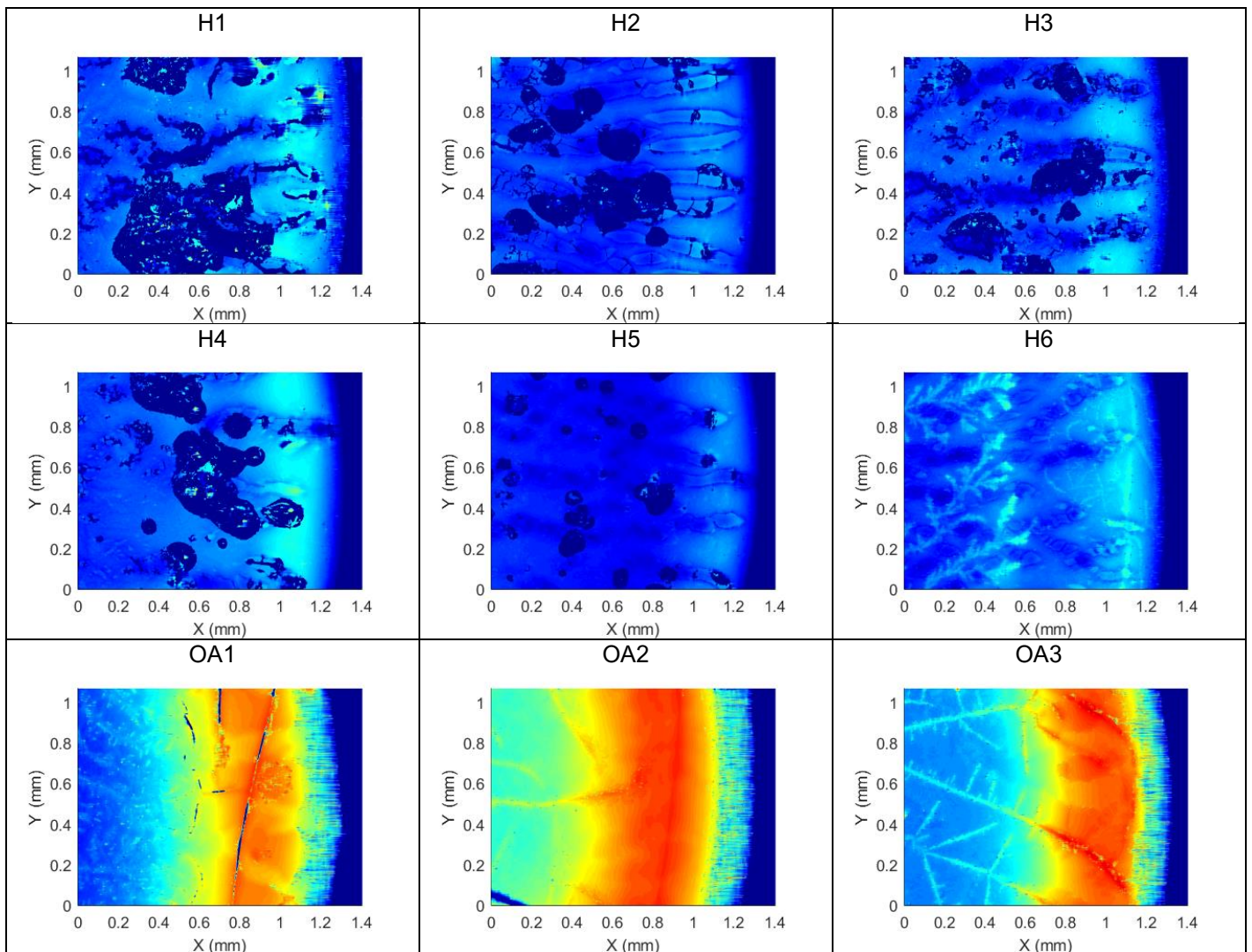
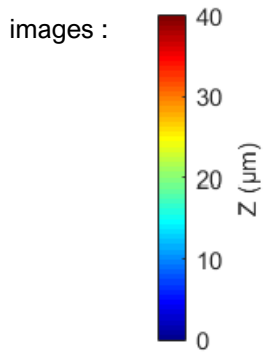


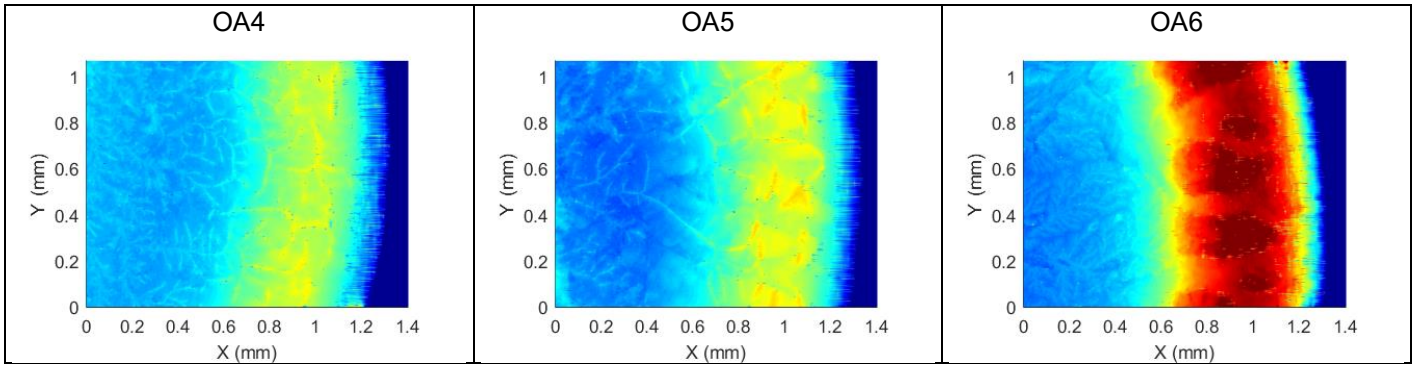


ANNEXE 2

Images 3D des gouttes séchées de chiens

Toutes les images XY sont de la même taille (1.4 mm x 1.07 mm). L'échelle Z est également identique pour toutes les images :

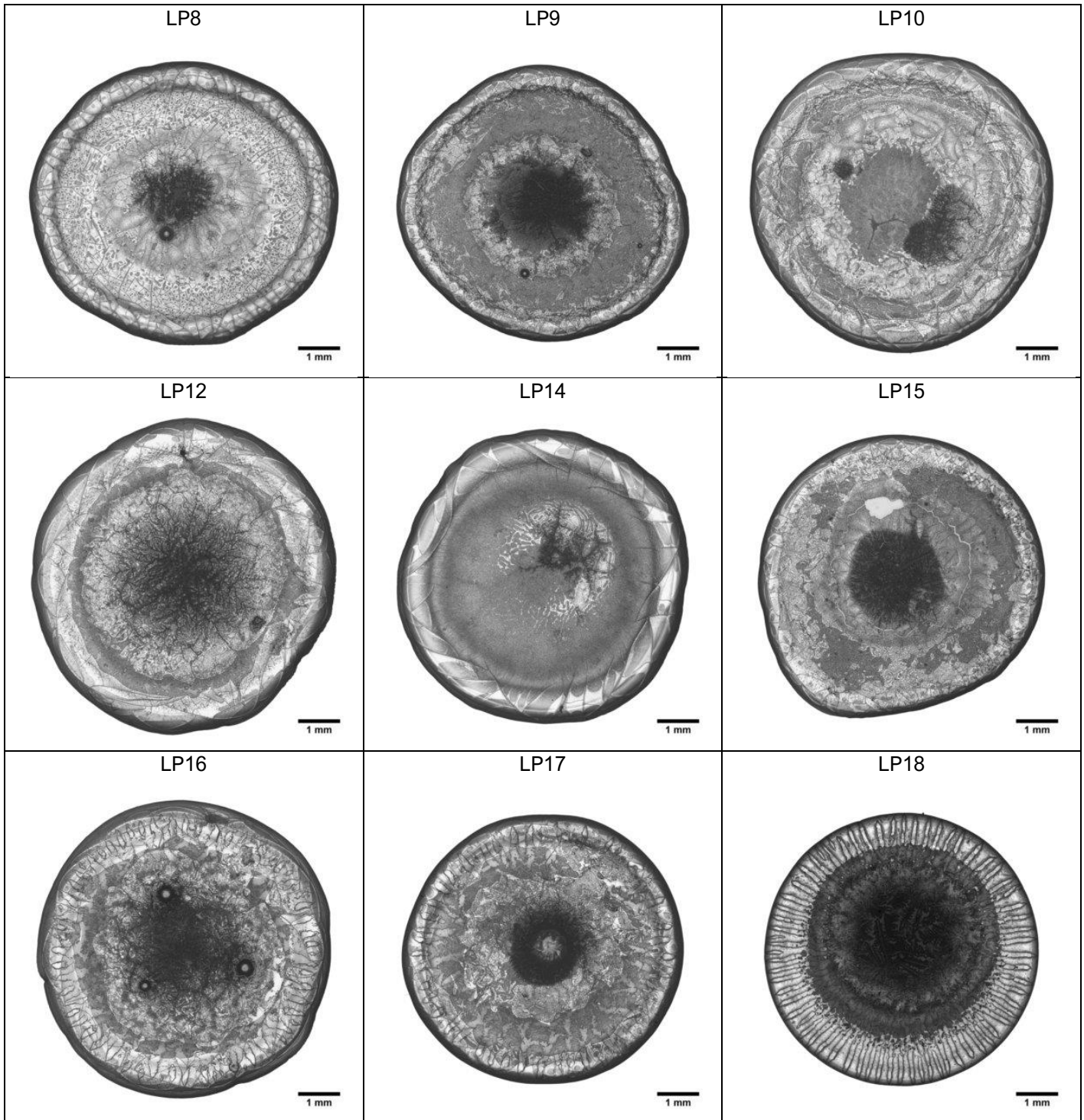


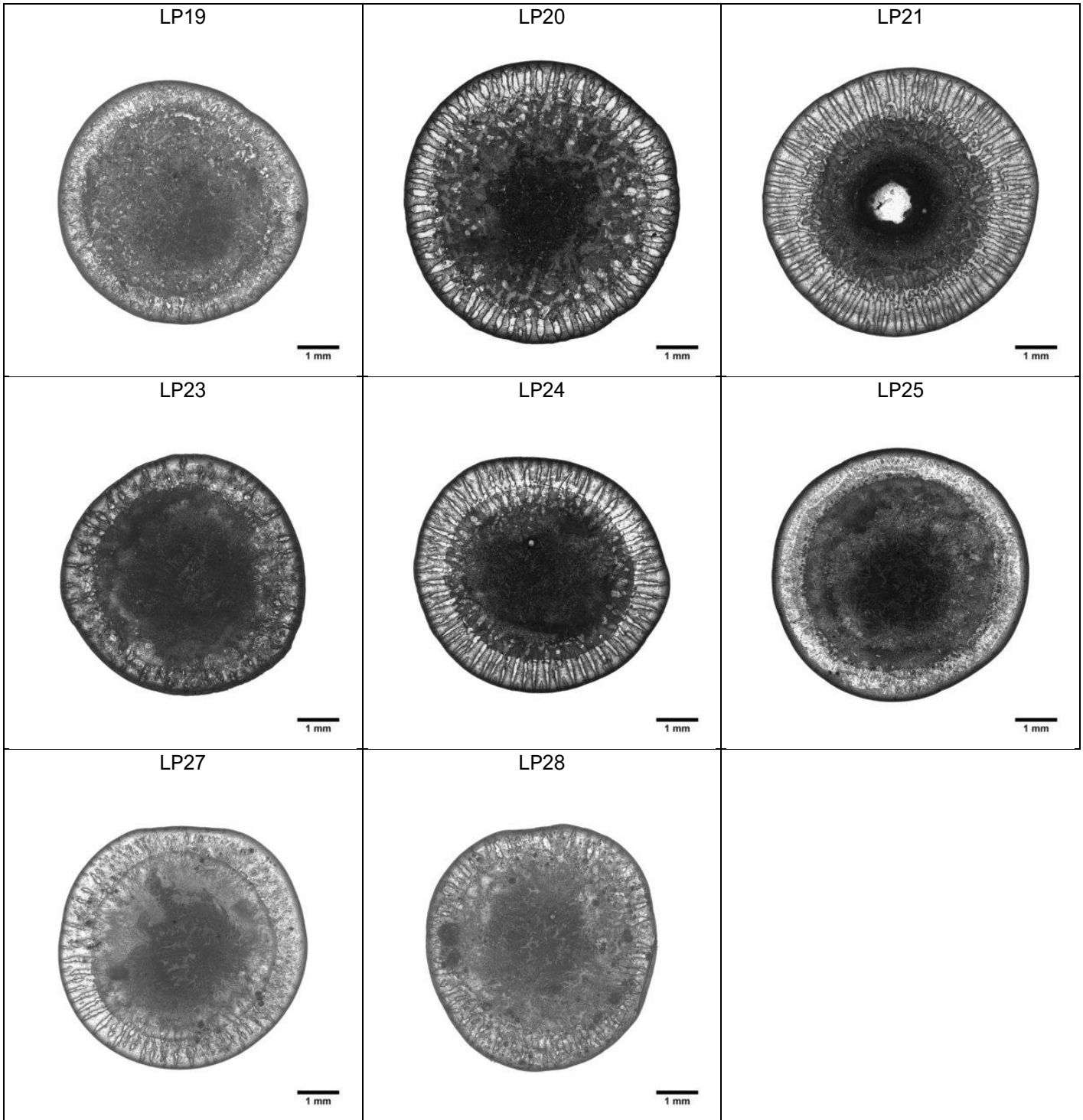


ANNEXE 3

Images 2D des gouttes séchées de lapins

Toutes les images sont représentées à la même échelle.



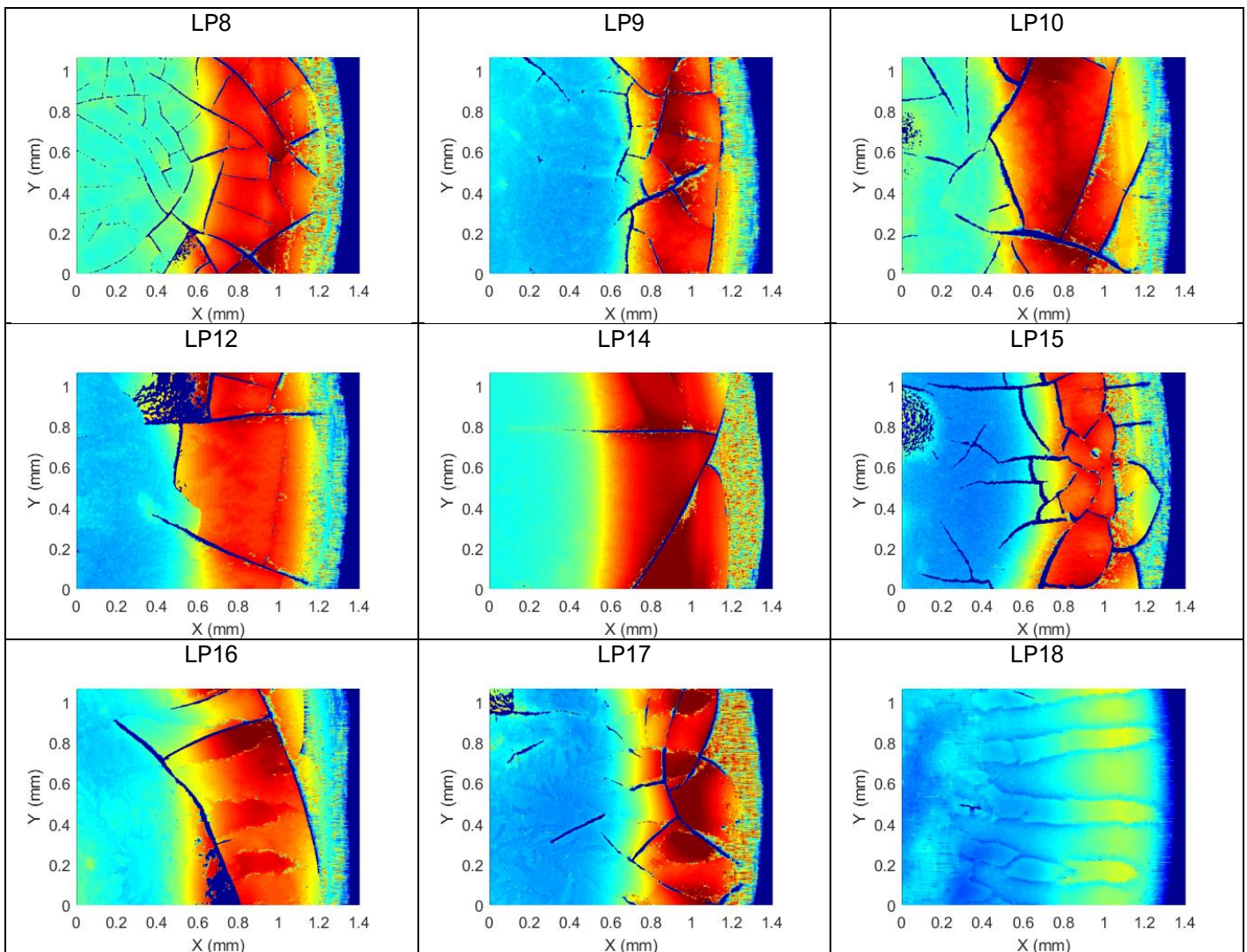
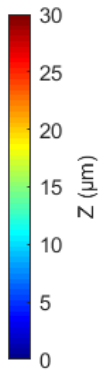


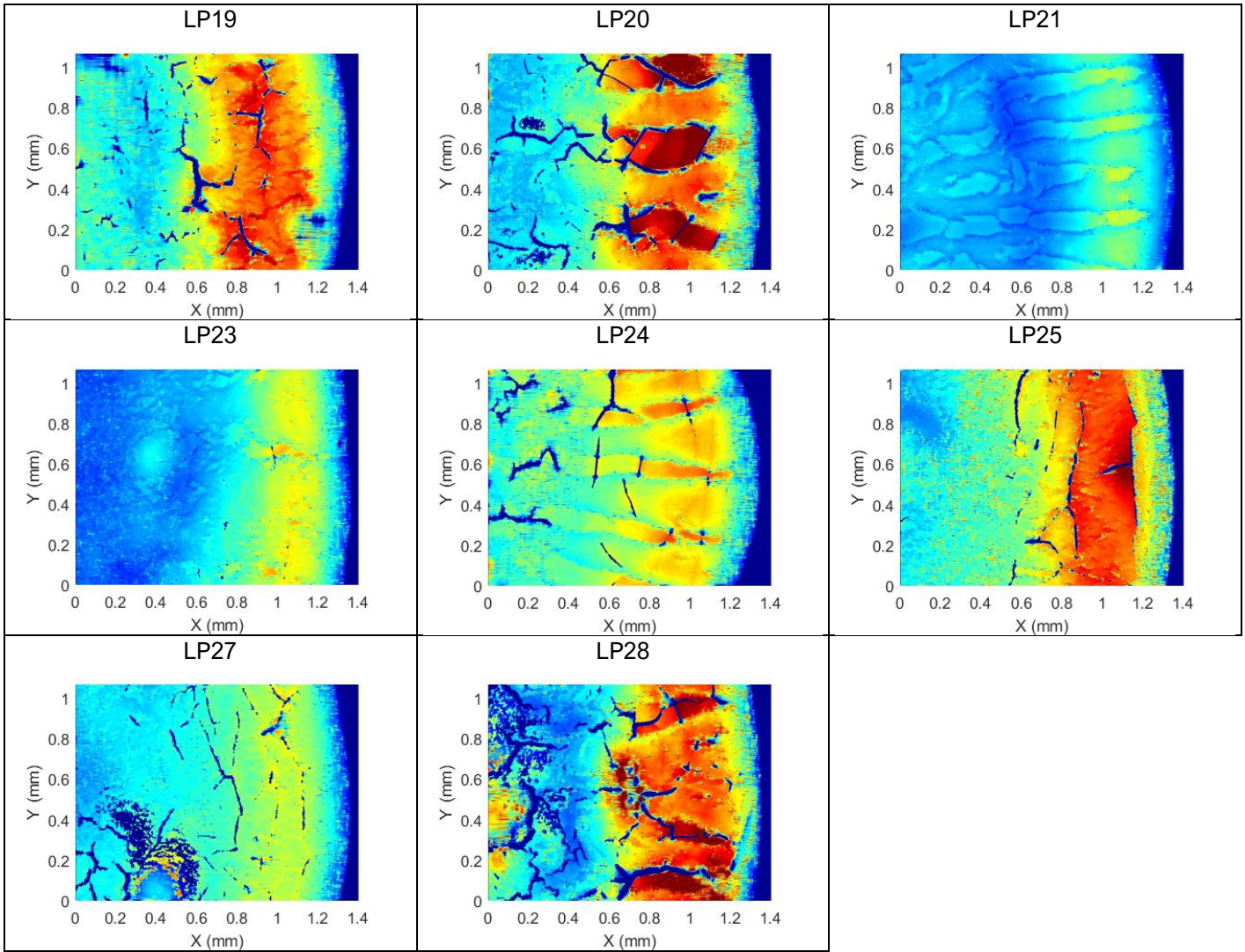
ANNEXE 4

Images 3D des gouttes séchées de lapins

Toutes les images XY sont de la même taille (1.4 mm x 1.07 mm). L'échelle Z est également identique pour toutes les images :







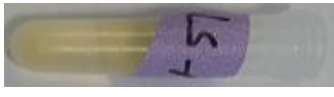




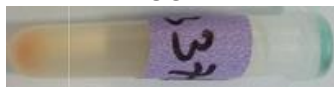
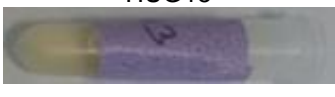
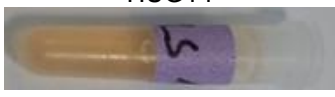
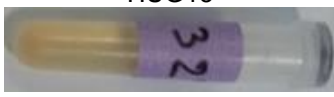
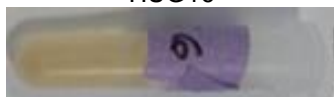
images :





ANNEXE 5

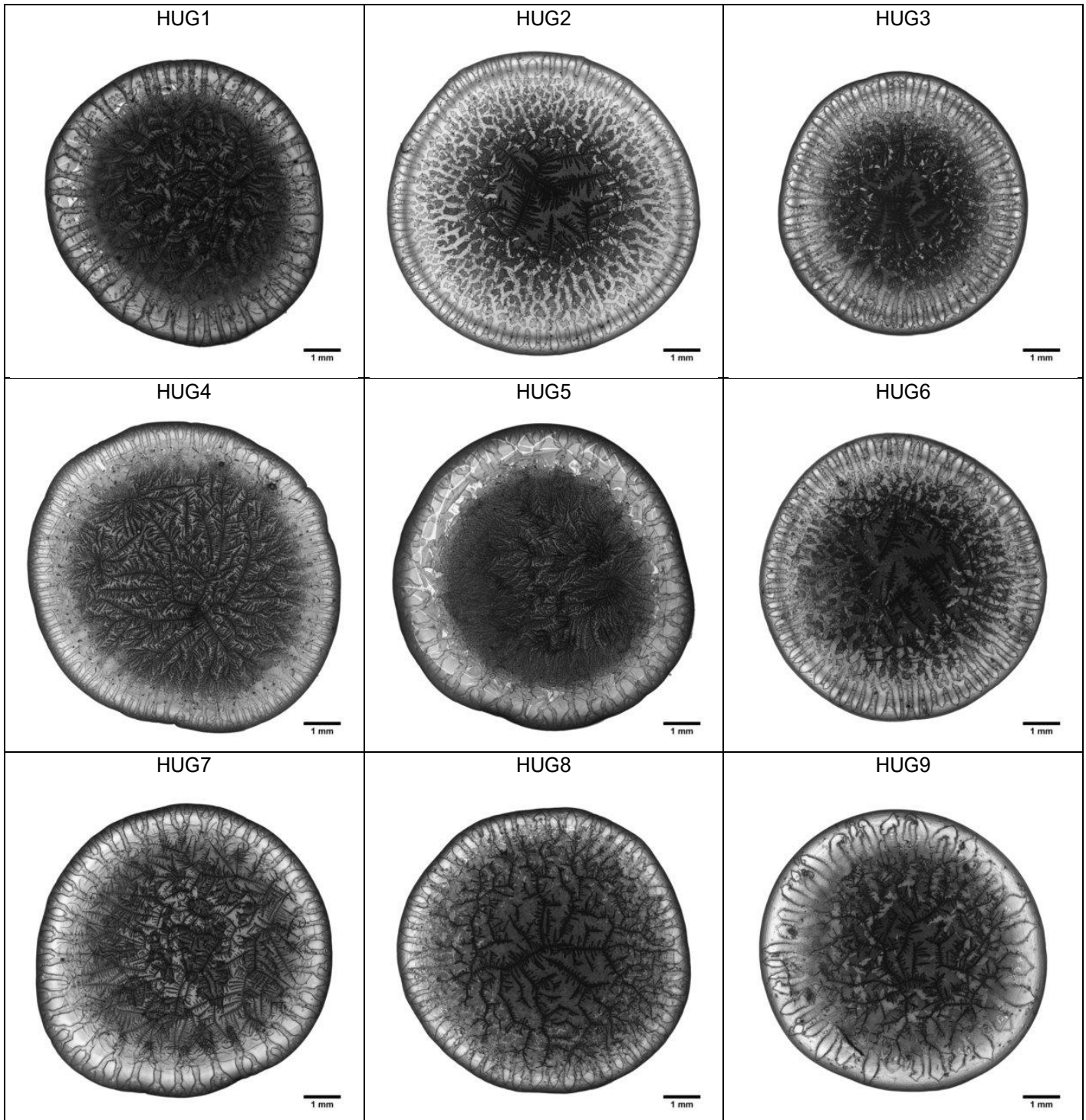
Photos des échantillons de LS de patients

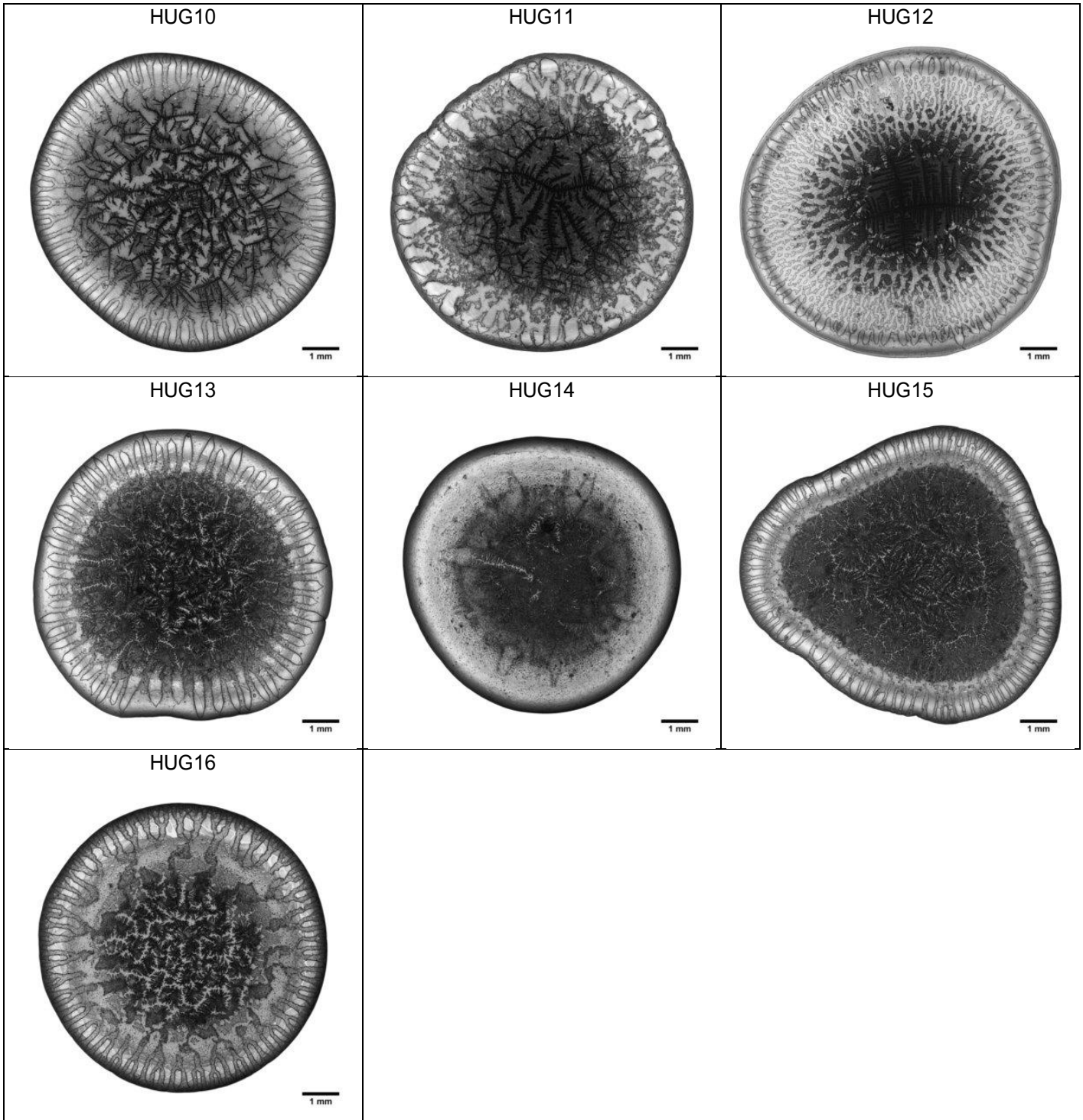
HUG1 	HUG2 	HUG3 	HUG4 
HUG5 	HUG6 	HUG7 	HUG8 
HUG9 	HUG10 	HUG11 	HUG12 
HUG13 	HUG14 	HUG15 	HUG16 

ANNEXE 6

Images 2D des gouttes séchées de patients

Toutes les images sont représentées à la même échelle.



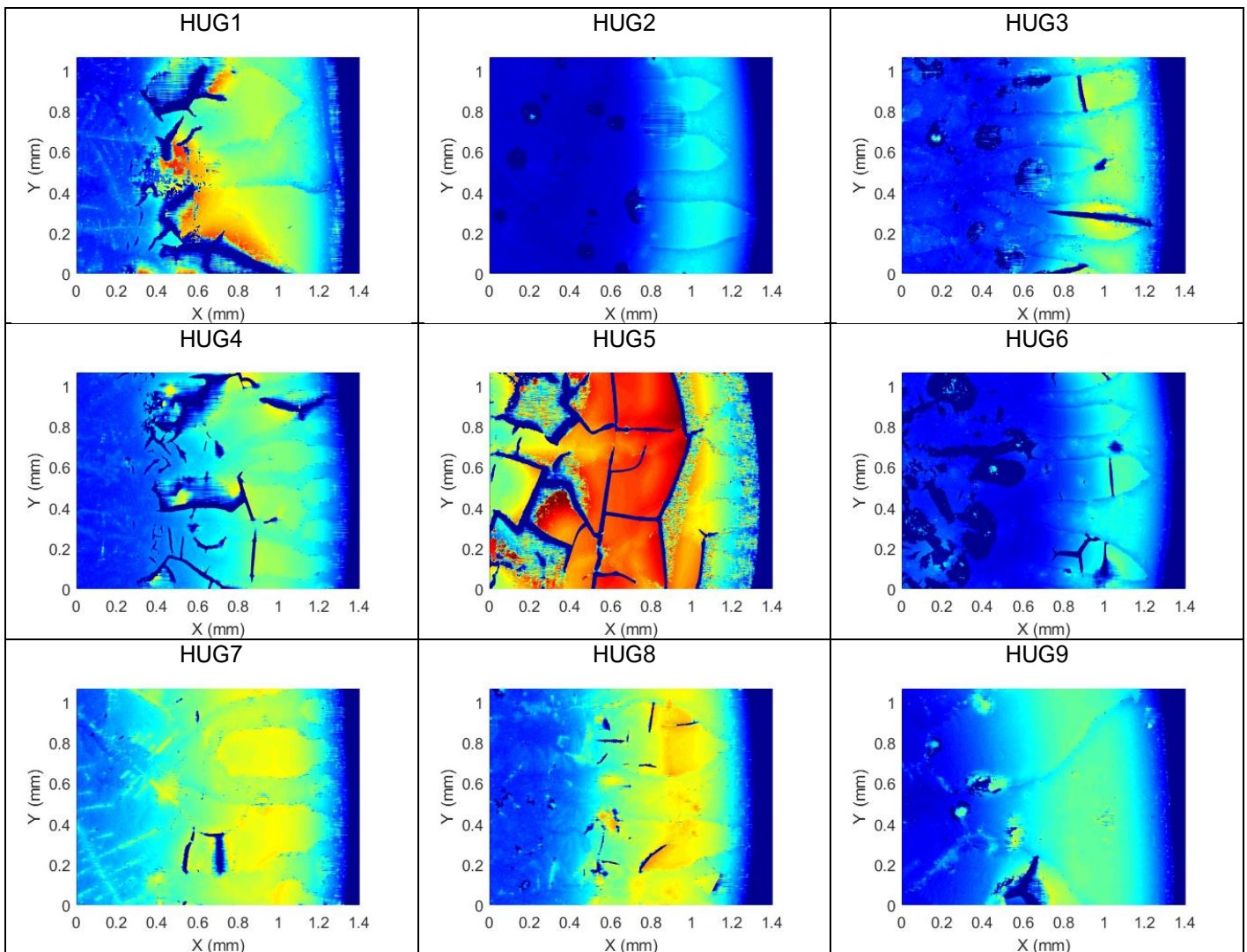
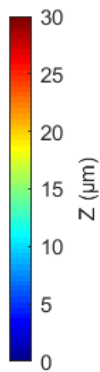


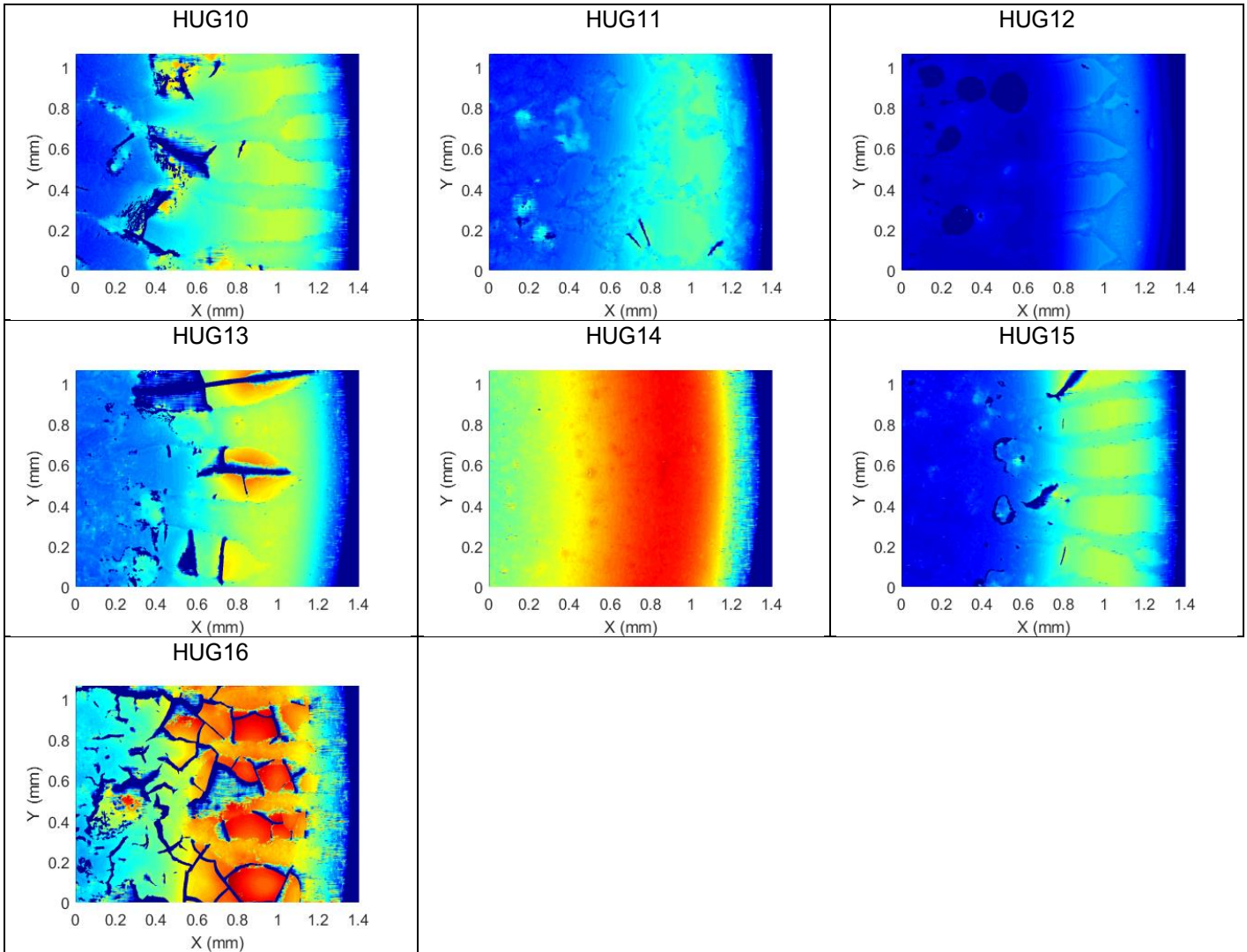
ANNEXE 7

Images 3D des gouttes séchées de patients

Toutes les images XY sont de la même taille (1.4 mm x 1.07 mm). L'échelle Z est également identique pour toutes les images :

images :





Bibliographie

- Abramson, S.B., and Attur, M. (2009). Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11, 227.
- Adams, M.E., and Muir, H. (1981). The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem. J.* 197, 385–389.
- Alkrad, J.A., Mrestani, Y., Stroehli, D., Wartewig, S., and Neubert, R. (2003). Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, 545–550.
- Allen, A.A., Caldwell, G.L., and Fu, F.H. (1995). Anatomy and biomechanics of the meniscus. *Oper. Tech. Orthop.* 5, 2–9.
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T.D., Greenwald, R., Hochberg, M., et al. (1986). Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 29, 1039–1049.
- Amin, S., LaValley, M.P., Guermazi, A., Grigoryan, M., Hunter, D.J., Clancy, M., Niu, J., Gale, D.R., and Felson, D.T. (2005). The relationship between cartilage loss on magnetic resonance imaging and radiographic progression in men and women with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 3152–3159.
- Annarelli, C.C., Fornazero, J., Bert, J., and Colombani, J. (2001). Crack patterns in drying protein solution drops. *Eur. Phys. J. E* 5, 599–603.
- Arican, M., Carter, S.D., May, C., and Bennett, D. (1994). Hyaluronan in canine arthropathies. *J. Comp. Pathol.* 111, 185–195.
- Attur, M., Samuels, J., Krasnokutsky, S., and Abramson, S.B. (2010). Targeting the synovial tissue for treating osteoarthritis (OA): where is the evidence? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 24, 71–79.
- Attur, M., Krasnokutsky-Samuels, S., Samuels, J., and Abramson, S.B. (2013). Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 136–144.
- Ayhan, E., Kesmezacar, H., and Akgun, I. (2014). Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* 5, 351–361.
- Bachy, M., Sherifi, I., Zadegan, F., Petrover, D., Petite, H., and Hannouche, D. (2013). Anterior cruciate ligament surgery in the rabbit. *J. Orthop. Surg.* 8, 27.
- de Bakker, E., Stroobants, V., VanDael, F., Van Ryssen, B., and Meyer, E. (2017). Canine synovial fluid biomarkers for early detection and monitoring of osteoarthritis. *Vet. Rec.* 180, 328–329.
- Balazs, E.A. (1974). The Physical Properties of Synovial Fluid and the Special Role of Hyaluronic Acid. In *Disorders of the Knee*, pp. 63–75.
- Balazs, E.A. (2009). The role of hyaluronan in the structure and function of the biomatrix of connective tissues. *Struct. Chem.* 20, 233–243.
- Balazs, E.A., and Denlinger, J.L. (1993). Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* 39, 3–9.
- Bansil, R., Yannas, I.V., and Stanley, H.E. (1978). Raman spectroscopy: a structural probe of glycosaminoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* 541, 535–542.
- Batiste, D.L., Kirkley, A., Laverty, S., Thain, L.M.F., Spouge, A.R., and Holdsworth, D.W. (2004). Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 986–996.
- Bay-Jensen, A.C., Reker, D., Kjølgaard-Petersen, C.F., Mobasheri, A., Karsdal, M.A., Ladel, C., Henrotin, Y., and Thudium, C.S. (2016). Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 9–20.

- Bazin, D., Chappard, C., Combes, C., Carpentier, X., Rouzière, S., André, G., Matzen, G., Allix, M., Thiaudière, D., Reguer, S., et al. (2009). Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise bones. *Osteoporos. Int.* 20, 1065–1075.
- Belcher, C., Yaqub, R., Fawthrop, F., Bayliss, M., and Doherty, M. (1997). Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann. Rheum. Dis.* 56, 299–307.
- Bellamy, N. (2005). The WOMAC Knee and Hip Osteoarthritis Indices: Development, validation, globalization and influence on the development of the AUSCAN Hand Osteoarthritis Indices. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23, S148–S153.
- Bellamy, N., Buchanan, W.W., Goldsmith, C.H., Campbell, J., and Stitt, L.W. (1988). Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol.* 15, 1833–1840.
- Bendele, A.M. (2001). Animal models of osteoarthritis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 1, 363–376.
- Benito, M.J., Veale, D.J., FitzGerald, O., Berg, W.B. van den, and Bresnihan, B. (2005a). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1263–1267.
- Benito, M.J., Veale, D.J., FitzGerald, O., Berg, W.B. van den, and Bresnihan, B. (2005b). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1263–1267.
- Berenbaum, F., and Auger, J. (2016). *Le grand livre de l'arthrose: Le guide indispensable pour soulager efficacement les douleurs liées à l'arthrose* (Editions Eyrolles).
- Bertin, P., Rannou, F., Grange, L., Dachicourt, J.-N., Bruel, P., Emery, C., Grandfils, N., and Taieb, C. (2014). Annual Cost of Patients with Osteoarthritis of the Hip and Knee in France. *J. Musculoskelet. Pain* 22, 356–364.
- Bhuanantanondh, P., Grecov, D., and Kwok, E. (2010). Rheology of Synovial Fluid From Patients With Osteoarthritis and the Effects of Viscosupplements on the Rheology of Synovial Fluid. 237–238.
- Biewener, A.A. (2008). Tendons and Ligaments: Structure, Mechanical Behavior and Biological Function. In *Collagen*, (Springer, Boston, MA), pp. 269–284.
- Bin, L., Bennacer, R., Sefiane, K., and Steinchen, A. (2016). Transient Effects in Evaporating Sessile Drops: With and Without Heating. *J. Heat Transf.* 138, 091009–091009.
- Binette, and Schmid (1965). The proteins of synovial fluid : A study od the alpha1/alpha2 globulin ratio.
- Bispo, J.A.M., de Sousa Vieira, E.E., Silveira, L., and Fernandes, A.B. (2013). Correlating the amount of urea, creatinine, and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. *J. Biomed. Opt.* 18, 87004.
- Blewis, M., Nugent-Derfus, G., Schmidt, T.A., Schumacher, B.L., and Sah, R.L. (2007). A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *Eur. Cell. Mater.* 13, 26–38.
- Bonifacio, A., Dalla Marta, S., Spizzo, R., Cervo, S., Steffan, A., Colombatti, A., and Sergio, V. (2014). Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 2355–2365.
- Bonifacio, A., Beleites, C., and Sergio, V. (2015). Application of R-mode analysis to Raman maps: a different way of looking at vibrational hyperspectral data. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1089–1095.
- Bosser, C., Ogier, A., Imbert, L., and Hoc, T. (2016). Raman Spectroscopy as a Biomarker-Investigative Tool in Bone Metabolism. In *Biomarkers in Bone Disease*, V.R. Preedy, ed. (Springer Netherlands), pp. 1–27.
- Bou Zeid, W., and Brutin, D. (2013). Influence of relative humidity on spreading, pattern formation and adhesion of a drying drop of whole blood. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 430, 1–7.
- Bouchgua, M., Alexander, K., André d'Anjou, M., Girard, C.A., Carmel, E.N., Beauchamp, G., Richard, H., and Laverty, S. (2009a). Use of routine clinical multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis – part I. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 188–196.

- Bouchgua, M., Alexander, K., Carmel, E.N., d'Anjou, M.A., Beauchamp, G., Richard, H., and Laverty, S. (2009b). Use of routine clinical multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis – part II: bone mineral density assessment. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 197–204.
- Brannan, S.R., and Jerrard, D.A. (2006). Synovial fluid analysis. *J. Emerg. Med.* 30, 331–339.
- Bray, R.C., Salo, P.T., Lo, I.K., Ackermann, P., Rattner, J.B., and Hart, D.A. (2005). Normal ligament structure, physiology and function. *Sports Med. Arthrosc. Rev.* 13, 127–135.
- Breinlinger, T., and Kraft, T. (2014). A simple method for simulating the coffee stain effect. *Powder Technol.* 256, 279–284.
- Brown, M.P., Trumble, T.N., Sandy, J.D., and Merritt, K.A. (2007). A simplified method of determining synovial fluid chondroitin sulfate chain length. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 1443–1445.
- Brutin, D., Sobac, B., Loquet, B., and Sampol, J. (2011). Pattern formation in drying drops of blood. *J. Fluid Mech.* 667, 85–95.
- Buckwalter, J.A., and Felson, D.T. (2015). Post-Traumatic Arthritis: Definitions and Burden of Disease. In *Post-Traumatic Arthritis*, S.A.O. MD, and F. Guilak, eds. (Springer US), pp. 7–15.
- Buote, N., Fusco, J., and Radasch, R. (2009). Age, tibial plateau angle, sex, and weight as risk factors for contralateral rupture of the cranial cruciate ligament in Labradors. *Vet. Surg. VS* 38, 481–489.
- Burr, D.B., and Gallant, M.A. (2012). Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 665–673.
- Cadet, C., Maheu, E., Breville, P., Jeandel, C., Quintrec, J.-L.L., Lévy-Reynaud, O., Verlhac, B., Vetel, J.-M., and (agr/Agrhum), A. *gériatrie et rhumatologie* (2015). Phénotypes cliniques : arthroses plutôt qu'arthrose. Comorbidités. *Cah. Année Gérontologique* 7, 52–57.
- Calvet, J., Orellana, C., Gratacós, J., Berenguer-Llargo, A., Caixàs, A., Chillarón, J.J., Pedro-Botet, J., García-Manrique, M., Navarro, N., and Larrosa, M. (2016). Synovial fluid adipokines are associated with clinical severity in knee osteoarthritis: a cross-sectional study in female patients with joint effusion. *Arthritis Res. Ther.* 18, 207.
- Calvo, E., Palacios, I., Delgado, E., Sánchez-Pernaute, O., Largo, R., Egido, J., and Herrero-Beaumont, G. (2004). Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 878–886.
- Castañeda, S., Roman-Blas, J.A., Largo, R., and Herrero-Beaumont, G. (2012). Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem. Pharmacol.* 83, 315–323.
- Chakrabarti, B., and Park, J.W. (1980). Glycosaminoglycans: structure and interaction. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8, 225–313.
- Charron, J. (2004). *Mesures Sans Contact* (Ed. Techniques Ingénieur).
- Chevalier, X., and Richette, P. (2005). *Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement*. EMC - Rhumatol.-Orthopédie 2, 41–58.
- Chinas-Castillo, F., and Spikes, H.A. (2000). Film Formation by Colloidal Overbased Detergents in Lubricated Contacts. *Tribol. Trans.* 43, 357–366.
- Cibere, J., Zhang, H., Garnerio, P., Poole, A.R., Lobanok, T., Saxne, T., Kraus, V.B., Way, A., Thorne, A., Wong, H., et al. (2009). Association of biomarkers with pre-radiographically defined and radiographically defined knee osteoarthritis in a population-based study. *Arthritis Rheum.* 60, 1372–1380.
- Cimino, F., Volk, B.S., and Setter, D. (2010). Anterior cruciate ligament injury: Diagnosis, management, and prevention. *Am. Fam. Physician* 82, 917–922.
- Coatney, G.A., Abraham, A.C., Fischenich, K.M., Button, K.D., Haut, R.C., and Haut Donahue, T.L. (2015). Efficacy of P188 on lapine meniscus preservation following blunt trauma. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 47, 57–64.
- Coleman, P.J., Scott, D., Mason, R.M., and Levick, J.R. (2000). Role of hyaluronan chain length in buffering interstitial flow across synovium in rabbits. *J. Physiol.* 526, 425–434.
- Conrad (2003). Can synovial fluid viscosity be used as a physical marker for osteoarthritis severity.

- Cotofana, S., Buck, R., Wirth, W., Roemer, F., Duryea, J., Nevitt, M., and Eckstein, F. (2012). Cartilage Thickening in Early Radiographic Human Knee Osteoarthritis –Within-Person, Between-Knee Comparison. *Arthritis Care Res.* 64, 1681–1690.
- Dahl, L.B., Dahl, I.M., Engström-Laurent, A., and Granath, K. (1985). Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* 44, 817–822.
- Dahlberg, L., Ryd, L., Heinegård, D., and Lohmander, L.S. (1992). Proteoglycan fragments in joint fluid. *Acta Orthop. Scand.* 63, 417–423.
- Damiano, J., and Bardin, T. (2005). *Liquide synovial normal et pathologique.* EMC - Podol. 1, 65–79.
- Darwish, A.F., Abdel-Ghany, H.S., and El-Sherbini, Y.M. (2012). Diagnostic and prognostic value of some biochemical markers in early knee osteoarthritis. *Egypt. Rheumatol.* 34, 1–8.
- Decker, B., McGuckin, W.F., McKenzie, B.F., and Slocumb, C.H. (1959). Concentration of Hyaluronic Acid in Synovial Fluid. *Clin. Chem.* 5, 465–469.
- Deegan, R.D. (2000). Pattern formation in drying drops. *Phys. Rev. E* 61, 475–485.
- Deegan, R.D., Bakajin, O., Dupont, T.F., Huber, G., Nagel, S.R., and Witten, T.A. (1997). Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* 389, 827–829.
- Deegan, R.D., Bakajin, O., Dupont, T.F., Huber, G., Nagel, S.R., and Witten, T.A. (2000). Contact line deposits in an evaporating drop. *Phys. Rev. E* 62, 756–765.
- DeGroot, J., Bank, R.A., Tchetverikov, I., Verzijl, N., and TeKoppele, J.M. (2002). Molecular markers for osteoarthritis: the road ahead. 585–589.
- Dehring, K.A., Crane, N.J., Smukler, A.R., McHugh, J.B., Roessler, B.J., and Morris, M.D. (2006a). Identifying Chemical Changes in Subchondral Bone Taken from Murine Knee Joints Using Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 60, 1134–1141.
- Dehring, K.A., Smukler, A.R., Roessler, B.J., and Morris, M.D. (2006b). Correlating Changes in Collagen Secondary Structure with Aging and Defective Type II Collagen by Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 60, 366–372.
- Dell’Isola, A., Allan, R., Smith, S.L., Marreiros, S.S.P., and Steultjens, M. (2016). Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *BMC Musculoskelet. Disord.* 17, 425.
- Dingari, N.C., Horowitz, G.L., Kang, J.W., Dasari, R.R., and Barman, I. (2012). Raman Spectroscopy Provides a Powerful Diagnostic Tool for Accurate Determination of Albumin Glycation. *PLoS ONE* 7, e32406.
- Ellis, R., Green, E., and Winlove, C.P. (2009). Structural Analysis of Glycosaminoglycans and Proteoglycans by Means of Raman Microspectrometry. *Connect. Tissue Res.* 50, 29–36.
- Erbil, H.Y. (2012). Evaporation of pure liquid sessile and spherical suspended drops: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 170, 67–86.
- Escofier, B., and Pagès, J. (2008). *Analyses factorielles simples et multiples: objectifs, méthodes et interprétation* (Paris, France: Dunod, impr. 2008).
- Esmonde-White, K. (2014). Raman Spectroscopy of Soft Musculoskeletal Tissues. *Appl. Spectrosc.* 68, 1203–1218.
- Esmonde-White, K.A., Mandair, G.S., Raaij, F., Roessler, B.J., and Morris, M.D. (2008a). Raman spectroscopy of dried synovial fluid droplets as a rapid diagnostic for knee joint damage. A. Mahadevan-Jansen, W. Petrich, R.R. Alfano, and A. Katz, eds. p. 68530Y.
- Esmonde-White, K.A., Le Clair, S.V., Roessler, B.J., and Morris, M.D. (2008b). Effect of Conformation and Drop Properties on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Dried Biopolymer Drops. *Appl. Spectrosc.* 62, 503–511.
- Esmonde-White, K.A., Mandair, G.S., Raaij, F., Jacobson, J.A., Miller, B.S., Urquhart, A.G., Roessler, B.J., and Morris, M.D. (2009a). Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis. *J. Biomed. Opt.* 14, 34013.

- Esmonde-White, K.A., Mandair, G.S., Esmonde-White, F.W.L., Raaij, F., Roessler, B.J., and Morris, M.D. (2009b). Osteoarthritis screening using Raman spectroscopy of dried human synovial fluid drops. p. 71660J–71660J–8.
- Esmonde-White, K.A., Esmonde-White, F.W.L., Morris, M.D., and Roessler, B.J. (2014). Characterization of biofluids prepared by sessile drop formation. *The Analyst* 139, 2734–2741.
- Evans, C.H., Kraus, V.B., and Setton, L.A. (2014). Progress in intra-articular therapy. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 11–22.
- Fam, H., Bryant, J.T., and Kontopoulou, M. (2007). Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 44, 59–74.
- Fautrel, B., Hilliquin, P., Rozenberg, S., Allaert, F.-A., Coste, P., Leclerc, A., and Rossignol, M. (2005). Impact of osteoarthritis: Results of a nationwide survey of 10 000 patients consulting for OA. *Rev. Rhum. Ed. Fr.* 72, 404–410.
- Felson, D.T. (2010). Identifying Different Osteoarthritis Phenotypes through Epidemiology. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 18, 601–604.
- Filik, J., and Stone, N. (2007). Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures. *The Analyst* 132, 544.
- Filik, J., and Stone, N. (2008). Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 616, 177–184.
- Fischenich, K.M., Coatney, G.A., Haverkamp, J.H., Button, K.D., DeCamp, C., Haut, R.C., and Haut Donahue, T.L. (2014). Evaluation of Meniscal Mechanics and Proteoglycan Content in a Modified Anterior Cruciate Ligament Transection Model. *J. Biomech. Eng.* 136, 71001–071001–071008.
- Fischenich, K.M., Lewis, J., Kindsfater, K.A., Bailey, T.S., and Donahue, T.L.H. (2015a). Effects of degeneration on the compressive and tensile properties of human meniscus. *J. Biomech.* 48, 1407–1411.
- Fischenich, K.M., Button, K.D., Coatney, G.A., Fajardo, R.S., Leikert, K.M., Haut, R.C., and Haut Donahue, T.L. (2015b). Chronic changes in the articular cartilage and meniscus following traumatic impact to the lapine knee. *J. Biomech.* 48, 246–253.
- Florea, C., Malo, M.K.H., Rautiainen, J., Mäkelä, J.T.A., Fick, J.M., Nieminen, M.T., Jurvelin, J.S., Davidescu, A., and Korhonen, R.K. (2015). Alterations in subchondral bone plate, trabecular bone and articular cartilage properties of rabbit femoral condyles at 4 weeks after anterior cruciate ligament transection. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 414–422.
- Frank, C.B. (2004). Ligament structure, physiology and function. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 4, 199–201.
- Frobell, R.B., Nevitt, M.C., Hudelmaier, M., Wirth, W., Wyman, B.T., Benichou, O., Dreher, D., Davies, R., Lee, J.H., Baribaud, F., et al. (2010). Femorotibial subchondral bone area and regional cartilage thickness: A cross-sectional description in healthy reference cases and various radiographic stages of osteoarthritis in 1,003 knees from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res.* 62, 1612–1623.
- Fu, X., Lin, L., Zhang, J., and Yu, C. (2009). Assessment of the efficacy of joint lavage in rabbits with osteoarthritis of the Knee. *J. Orthop. Res.* 27, 91–96.
- Furey, M.J., and Burkhardt, B.M. (1997). Biotribology: Friction, wear, and lubrication of natural synovial joints. *Lubr. Sci.* 9, 255–271.
- Gamsjaeger, S., Klaushofer, K., and Paschalis, E.P. (2014). Raman analysis of proteoglycans simultaneously in bone and cartilage: Proteoglycans by Raman analysis. *J. Raman Spectrosc.* 45, 794–800.
- Gobezie, R., Kho, A., Krastins, B., Sarracino, D.A., Thornhill, T.S., Chase, M., Millett, P.J., and Lee, D.M. (2007). High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 9, R36.
- Goldring, M.B., and Goldring, S.R. (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 230–237.

- Gorr, H.M., Zueger, J.M., McAdams, D.R., and Barnard, J.A. (2013). Salt-induced pattern formation in evaporating droplets of lysozyme solutions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 103, 59–66.
- Gorr, H.M., Xiong, Z., and Barnard, J.A. (2014). Pattern recognition for identification of lysozyme droplet solution chemistry. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 115, 170–175.
- Grange, L. (2016). Stop à l'arthrose.
- Gregory, M.H., Capito, N., Kuroki, K., Stoker, A.M., Cook, J.L., and Sherman, S.L. (2012). A Review of Translational Animal Models for Knee Osteoarthritis. *Arthritis* 2012, 1–14.
- Grosjean, F., Dommergues, J.-Y., and Macagno, G. (2011). *La statistique en clair* (Paris, France: Ellipses).
- Guay, M. (2005). *Anatomie fonctionnelle de l'appareil locomoteur: os, articulations, muscles* (PUM).
- Haq, I., Murphy, E., and Dacre, J. (2003). Osteoarthritis. *Postgrad. Med. J.* 79, 377–383.
- Heard, B.J., Martin, L., Rattner, J.B., Frank, C.B., Hart, D.A., and Krawetz, R. (2012). Matrix metalloproteinase protein expression profiles cannot distinguish between normal and early osteoarthritic synovial fluid. *BMC Musculoskelet. Disord.* 13.
- Hegemann, N., Kohn, B., Brunberg, L., and Schmidt, M.F. (2002). Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 714–721.
- Hellio Le Graverand, M.-P., Ou, Y., Schield-Yee, T., Barclay, L., Hart, D., Natsume, T., and Rattner, J.B. (2000). The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J. Anat.* 198, 525–535.
- Hellio Le Graverand, M.-P., Vignon, E., Otterness, I.G., and Hart, D.A. (2001). Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part I: Cellular and matrix alterations. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 56–64.
- Henrotin, Y., Sanchez, C., and Balligand, M. (2005). Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *Vet. J.* 170, 113–123.
- Henrotin, Y., Addison, S., Kraus, V., and Deberg, M. (2007). Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 444–450.
- Henrotin, Y., Pesesse, L., and Sanchez, C. (2012). Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporos. Int.* 23, 847–851.
- Henrotin, Y., Pesesse, L., and Lambert, C. (2014). Targeting the synovial angiogenesis as a novel treatment approach to osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 6, 20–34.
- Henrotin, Y., Sanchez, C., Bay-Jensen, A.C., and Mobasheri, A. (2016). Osteoarthritis biomarkers derived from cartilage extracellular matrix: Current status and future perspectives. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 59, 145–148.
- Herrero-Beaumont, G., Guerrero, R., Sánchez-Pernaute, O., Acebes, C., Palacios, I., Mas, S., Rodriguez, I., Egido, J., and Vivanco, F. (2001). Cartilage and bone biological markers in the synovial fluid of osteoarthritic patients after hyaluronan injections in the knee. *Clin. Chim. Acta* 308, 107–115.
- Herrero-Beaumont, G., Marcos, M.E., Sánchez-Pernaute, O., Granados, R., Ortega, L., Montell, E., Vergés, J., Egido, J., and Largo, R. (2008). Effect of chondroitin sulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. *Br. J. Pharmacol.* 154, 843–851.
- Herwig, J., Egner, E., and Buddecke, E. (1984). Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann. Rheum. Dis.* 43, 635–640.
- Hu, H., and Larson, R.G. (2006). Marangoni Effect Reverses Coffee-Ring Depositions. *J. Phys. Chem. B* 110, 7090–7094.
- Huang, Z., Sun, Y., Wang, J., Du, S., Li, Y., Lin, J., Feng, S., Lei, J., Lin, H., Chen, R., et al. (2013). Rapid and nondestructive method for evaluation of embryo culture media using drop coating deposition Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 18, 127003.
- Huber, M., Trattig, S., and Lintner, F. (2000). Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest. Radiol.* 35, 573–580.

- Hui, A.Y., McCarty, W.J., Masuda, K., Firestein, G.S., and Sah, R.L. (2012). A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 15–37.
- Hunter, D.J., and Felson, D.T. (2006). Osteoarthritis. *Br. Med. J.* 332, 639–642.
- Johnson, V.L., and Hunter, D.J. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 28, 5–15.
- Karampas, I.A., Orkoulas, M.G., and Kontoyannis, C.G. (2013). A quantitative bioapatite/collagen calibration method using Raman spectroscopy of bone. *J. Biophotonics* 6, 573–586.
- Kellgren, J.H., and Lawrence, J.S. (1957). Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 16, 494–502.
- Knox, P., Levick, J.R., and McDonald, J.N. (1988). Synovial Fluid - Its Mass, Macromolecular Content and Pressure in Major Limb Joints of the Rabbit. *Q. J. Exp. Physiol.* 73, 33–45.
- Ko, F.C., Dragomir, C., Plumb, D.A., Goldring, S.R., Wright, T.M., Goldring, M.B., and van der Meulen, M.C.H. (2013). In vivo cyclic compression causes cartilage degeneration and subchondral bone changes in mouse tibiae. *Arthritis Rheum.* 65, 1569–1578.
- Kočišová, E., Vodáková, A., and Procházka, M. (2012). DCDR Spectroscopy as Efficient Tool for Liposome Studies: Aspect of Preparation Procedure Parameters. *Spectrosc. Int. J.* 27, 349–353.
- Kočišová, E., Antalík, A., and Procházka, M. (2013). Drop coating deposition Raman spectroscopy of liposomes: role of cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* 172–173, 1–5.
- Kopecký, V., and Baumruk, V. (2006). Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules. *Vib. Spectrosc.* 42, 184–187.
- Krafft, C., Steiner, G., Beleites, C., and Salzer, R. (2009). Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *J. Biophotonics* 2, 13–28.
- Kumashashi, N., Swärd, P., Larsson, S., Lohmander, L.S., Frobell, R., and Struglics, A. (2015). Type II collagen C2C epitope in human synovial fluid and serum after knee injury – associations with molecular and structural markers of injury. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1506–1512.
- Kumar, R., Grønhaug, K.M., Afseth, N.K., Isaksen, V., de Lange Davies, C., Drogset, J.O., and Lilledahl, M.B. (2015a). Optical investigation of osteoarthritic human cartilage (ICRS grade) by confocal Raman spectroscopy: a pilot study. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 8067–8077.
- Kumar, R., Singh, G., Grønhaug, K., Afseth, N., de Lange Davies, C., Drogset, J., and Lilledahl, M. (2015b). Single Cell Confocal Raman Spectroscopy of Human Osteoarthritic Chondrocytes: A Preliminary Study. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9341–9353.
- Kushner (1971). Permeability of human synovial membrane to plasma proteins.
- Kuyinu, E.L., Narayanan, G., Nair, L.S., and Laurencin, C.T. (2016). Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J. Orthop. Surg.* 11.
- Lamcharfi, E., Cohen-Solal, C., Parquet, M., Lutton, C., Dupré, J., and Meyer, C. (1997). Determination of molecular associations of some hydrophobic and hydrophilic bile acids by infrared and Raman spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 25, 285–291.
- Lampropoulou-Adamidou, K., Lelovas, P., Karadimas, E.V., Liakou, C., Triantafillopoulos, I.K., Dontas, I., and Papaioannou, N.A. (2013). Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 24, 263–271.
- Landreau, P., Christel, P., and Djian, P. (2003). Caractéristiques biomécaniques des ligaments et des ménisques du genou. In *Pathologie ligamentaire du genou*, (Springer Science & Business Media), p.
- Larkin, J.G., Lowe, G.D.O., Sturrock, R.D., and Forbes, C.D. (1984). THE CORRELATION OF CLINICAL ASSESSMENT OF SYNOVIAL FLUID WITH ITS MEASURED VISCOSITY. *Rheumatology* 23, 195–197.
- Larson, R.G. (2014). Transport and deposition patterns in drying sessile droplets. *AIChE J.* 60, 1538–1571.
- Lasch, P. (2012). Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 117, 100–114.

- Laverty, S., Girard, C.A., Williams, J.M., Hunziker, E.B., and Pritzker, K.P.H. (2010). The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage* 18, S53–S65.
- Legré-Boyer, V. (2015). Viscosupplementation: Techniques, indications, results. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 101, S101–S108.
- Levick, J.R. (1981). Permeability of Rheumatoid and Normal Human Synovium to Specific Plasma Proteins. *Arthritis Rheum.* 24, 1550–1560.
- Levick, J.R., and McDonald, J.N. (1995). Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules. *Ann. Rheum. Dis.* 54, 417–423.
- Levillain, A. (2016). Caractérisation multi-échelle des ménisques du genou : effet de l'arthrose. Lyon.
- Levillain, A., Boulocher, C., Kaderli, S., Viguier, E., Hannouche, D., Hoc, T., and Magoariec, H. (2015). Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1186–1193.
- Levillain, A., Magoariec, H., Boulocher, C., Decambron, A., Viateau, V., and Hoc, T. (2017a). Viscoelastic properties of rabbit osteoarthritic menisci: A correlation with matrix alterations. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 65, 1–10.
- Levillain, A., Magoariec, H., Boulocher, C., Decambron, A., Viateau, V., and Hoc, T. (2017b). Effects of a viscosupplementation therapy on rabbit menisci in an anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *J. Biomech.* 58, 147–154.
- Li, G., Yin, J., Gao, J., Cheng, T.S., Pavlos, N.J., Zhang, C., and Zheng, M.H. (2013). Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res. Ther.* 15, 223.
- Li, P., Raitcheva, D., Hawes, M., Moran, N., Yu, X., Wang, F., and Matthews, G.L. (2012). Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 1336–1346.
- Lieber, C.A., and Mahadevan-Jansen, A. (2003). Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Appl. Spectrosc.* 57, 1363–1367.
- Lim, N.S.J., Hamed, Z., Yeow, C.H., Chan, C., and Huang, Z. (2011). Early detection of biomolecular changes in disrupted porcine cartilage using polarized Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 16, 17003.
- Link, T.M., Steinbach, L.S., Ghosh, S., Ries, M., Lu, Y., Lane, N., and Majumdar, S. (2003). Osteoarthritis: MR Imaging Findings in Different Stages of Disease and Correlation with Clinical Findings. *Radiology* 226, 373–381.
- Lipowitz, A.J., Wong, P.L., and Stevens, J.B. (1985). Synovial membrane changes after experimental transection of the cranial cruciate ligament in dogs. *Am. J. Vet. Res. USA.*
- Litwic, A., Edwards, M.H., Dennison, E.M., and Cooper, C. (2013a). Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br. Med. Bull.* 105, 185–199.
- Litwic, A., Edwards, M.H., Dennison, E.M., and Cooper, C. (2013b). Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br. Med. Bull.* 105, 185–199.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R., and Goldring, M.B. (2012). Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum.* 64, 1697–1707.
- Loeuille, D., Chary-Valckenaere, I., Champigneulle, J., Rat, A.-C., Toussaint, F., Pinzano-Watrin, A., Goebel, J.C., Mainard, D., Blum, A., Pourel, J., et al. (2005). Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: Correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 52, 3492–3501.
- Lohmander, S. (1988). Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 2, 37–62.
- Lohmander, L.S., Hoerrner, L.A., and Lark, M.W. (1993). Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 36, 181–189.
- Lotz, M., and Loeser, R.F. (2012). Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* 51, 241–248.

- Madry, H., Dijk, C.N. van, and Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 18, 419–433.
- Madry, H., Kon, E., Condello, V., Peretti, G.M., Steinwachs, M., Seil, R., Berruto, M., Engebretsen, L., Filardo, G., and Angele, P. (2016). Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 24, 1753–1762.
- Maheu, E. (2015). Les nouvelles recommandations 2014 de l'OARSI pour le traitement non chirurgical de la gonarthrose. Lecture et point de vue critiques: The New 2014 OARSI guidelines for the non-surgical treatment of gonarthrosis critical analysis and summary. *Cah. Année Gériatologique* 7, 74–77.
- Mainreck, N., Brézillon, S., Sockalingum, G.D., Maquart, F.-X., Manfait, M., and Wegrowski, Y. (2011). Rapid Characterization of Glycosaminoglycans Using a Combined Approach by Infrared and Raman Microspectroscopies. *J. Pharm. Sci.* 100, 441–450.
- Majumder, M., Rendall, C.S., Eukel, J.A., Wang, J.Y.L., Behabtu, N., Pint, C.L., Liu, T.-Y., Orbaek, A.W., Mirri, F., Nam, J., et al. (2012). Overcoming the “Coffee-Stain” Effect by Compositional Marangoni-Flow-Assisted Drop-Drying. *J. Phys. Chem. B* 116, 6536–6542.
- Mäkelä, J.T.A., Rezaeian, Z.S., Mikkonen, S., Madden, R., Han, S.-K., Jurvelin, J.S., Herzog, W., and Korhonen, R.K. (2014). Site-dependent changes in structure and function of lapine articular cartilage 4 weeks after anterior cruciate ligament transection. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 869–878.
- Makris, E.A., Hadidi, P., and Athanasiou, K.A. (2011). The knee meniscus: Structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* 32, 7411–7431.
- Mandair, G.S., and Morris, M.D. (2015). Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *BoneKEY Rep.* 4.
- Mandair, G.S., Dehring, K.A., Roessler, B.J., and Morris, M.D. (2006). Detection of potential osteoarthritis biomarkers using surface enhanced Raman spectroscopy in the near-infrared. A. Mahadevan-Jansen, and W.H. Petrich, eds. p. 60930H.
- Männicke, N., Schöne, M., Gottwald, M., Göbel, F., Oelze, M.L., and Raum, K. (2014). 3-D High-Frequency Ultrasound Backscatter Analysis of Human Articular Cartilage. *Ultrasound Med. Biol.* 40, 244–257.
- Mansour, J.M., Wentorf, F.A., and DeGoede, K.M. (1998). In Vivo Kinematics of the Rabbit Knee in Unstable Models of Osteoarthrosis. *Ann. Biomed. Eng.* 26, 353–360.
- Marini, S., Francesco Fasciglione, G., Monteleone, G., Maiotti, M., Tarantino, U., and Coletta, M. (2003). A correlation between knee cartilage degradation observed by arthroscopy and synovial proteinases activities. *Clin. Biochem.* 36, 295–304.
- Mazzucco, D., McKinley, G., Scott, R.D., and Spector, M. (2002). Rheology of joint fluid in total knee arthroplasty patients. *J. Orthop. Res.* 20, 1157–1163.
- McCarty, W.J., Cheng, J.C., Hansen, B.C., Yamaguchi, T., Firestein, G.S., Masuda, K., and Sah, R.L. (2012). The biophysical mechanisms of altered hyaluronan concentration in synovial fluid after anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 64, 3993–4003.
- McCoy, A.M. (2015). Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet. Pathol.* 52, 803–818.
- Migliore, A., Giovannangeli, F., Granata, M., and Laganà, B. (2010). Hylan G-F 20: Review of its Safety and Efficacy in the Management of Joint Pain in Osteoarthritis. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* 2010, 55–68.
- Moreland, L.W. (2003). Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 5, 54.
- Morris, M.D., and Mandair, G.S. (2011). Raman Assessment of Bone Quality. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469, 2160–2169.
- Muehlethaler, C., Massonnet, G., and Esseiva, P. (2011). The application of chemometrics on Infrared and Raman spectra as a tool for the forensic analysis of paints. *Forensic Sci. Int.* 209, 173–182.

- Mundt, L.A., and Shanahan, K. (2010). Chapter 11 - Synovial fluid. In *Graff's Textbook of Routine Urinalysis and Body Fluids*, (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 253–262.
- Nakano, T., Dodd, C.M., and Scott, P.G. (1997). Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *J. Orthop. Res.* *15*, 213–220.
- Noble, P., Collin, B., Lecomte-Beckers, J., Magnée, A., Denoix, J.M., and Serteyn, D. (2010). The synovial joint: A perfect tribological system [L'articulation synoviale: Un système tribologique parfait]. *Ann. Med. Veterinaire* *154*, 83–93.
- Nyman, J.S., Makowski, A.J., Patil, C.A., Masui, T.P., O'Quinn, E.C., Bi, X., Guelcher, S.A., Nicollela, D.P., and Mahadevan-Jansen, A. (2011a). Measuring differences in compositional properties of bone tissue by confocal Raman spectroscopy. *Calcif. Tissue Int.* *89*, 111–122.
- Nyman, J.S., Makowski, A.J., Patil, C.A., Masui, T.P., O'Quinn, E.C., Bi, X., Guelcher, S.A., Nicollela, D.P., and Mahadevan-Jansen, A. (2011b). Measuring Differences in Compositional Properties of Bone Tissue by Confocal Raman Spectroscopy. *Calcif. Tissue Int.* *89*, 111–122.
- Oei, E.H.G., van Tiel, J., Robinson, W.H., and Gold, G.E. (2014). Quantitative Radiologic Imaging Techniques for Articular Cartilage Composition: Toward Early Diagnosis and Development of Disease-Modifying Therapeutics for Osteoarthritis. *Arthritis Care Res.* *66*, 1129–1141.
- Ornetti, P., Nourissat, G., Berenbaum, F., Sellam, J., Richette, P., and Chevalier, X. (2014). Quelle place pour les PRP (plasma riche en plaquettes) dans l'arthrose ? *Rev. Rhum.* *81*, 466–471.
- Ortiz, C., Zhang, D., Xie, Y., Ribbe, A.E., and Ben-Amotz, D. (2006). Validation of the drop coating deposition Raman method for protein analysis. *Anal. Biochem.* *353*, 157–166.
- Panula, H.E., Lohmander, L.S., Rönkkö, S., Agren, U., Helminen, H.J., and Kiviranta, I. (1998). Elevated levels of synovial fluid PLA₂, stromelysin (MMP-3) and TIMP in early osteoarthritis after tibial valgus osteotomy in young beagle dogs. *Acta Orthop. Scand.* *69*, 152–158.
- Pascual, E., and Jovaní, V. (2005). Synovial fluid analysis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *19*, 371–386.
- Pauchard, L., Parisse, F., and Allain, C. (1999). Influence of salt content on crack patterns formed through colloidal suspension desiccation. *Phys. Rev. E* *59*, 3737–3740.
- Pavelka, K., Forejtová, š., Olejárová, M., Gatterová, J., Šenolt, L., Špaček, P., Braun, M., Hulejová, M., Štovíčková, J., and Pavelková, A. (2004). Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *12*, 277–283.
- Pernelle, K., Imbert, L., Bosser, C., Auregan, J.-C., Cruel, M., Ogier, A., Jurdic, P., and Hoc, T. (2017). Microscale mechanical and mineral heterogeneity of human cortical bone governs osteoclast activity. *Bone* *94*, 42–49.
- Peters, J., Luczak, A., Ganesh, V., Park, E., and Kalyanaraman (2016). Protein Secondary Structure Determination Using Drop Coat Deposition Confocal Raman Spectroscopy. *Spectrosc. St. Monica* *31*, 31–39.
- Petersen, W., and Tillmann, B. (1998). Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat. Embryol. (Berl.)* *197*, 317–324.
- Petersen, W., and Tillmann, B. (1999). Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat. Embryol. (Berl.)* *200*, 325–334.
- Petsko, G.A., Ringe, D., and Charnot, M.D. (2008). Chapitre 1. In *Structure et fonction des protéines*, (De Boeck Supérieur), p.
- Pichardo-Molina, J.L., Frausto-Reyes, C., Barbosa-García, O., Huerta-Franco, R., González-Trujillo, J.L., Ramírez-Alvarado, C.A., Gutiérrez-Juárez, G., and Medina-Gutiérrez, C. (2007). Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers Med. Sci.* *22*, 229–236.
- Plickert, H.D., Bondzio, A., Einspanier, R., Tichy, A., and Brunnberg, L. (2013). Hyaluronic acid concentrations in synovial fluid of dogs with different stages of osteoarthritis. *Res. Vet. Sci.* *94*, 728–734.
- Poole, A.R. (2003). Biochemical/immunochemical biomarkers of osteoarthritis: utility for prediction of incident or progressive osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* *29*, 803–818.

- Poole, A.R., Ionescu, M., Swan, A., and Dieppe, P.A. (1994). Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J. Clin. Invest.* *94*, 25–33.
- Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., and Lavery, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop.* S26-33.
- Poonpet, T., and Honsawek, S. (2014). Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World J. Orthop.* *5*, 319–327.
- Praest, B.M., Greiling, H., and Kock, R. (1997). Assay of synovial fluid parameters: hyaluronan concentration as a potential marker for joint diseases. *Clin. Chim. Acta* *266*, 117–128.
- Pudlas, M., Brauchle, E., Klein, T.J., Hutmacher, D.W., and Schenke-Layland, K. (2013). Non-invasive identification of proteoglycans and chondrocyte differentiation state by Raman microspectroscopy. *J. Biophotonics* *6*, 205–211.
- Raggatt, L.J., and Partridge, N.C. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J. Biol. Chem.* *285*, 25103–25108.
- Ralphs, J.R., and Benjamin, M. (1994). The joint capsule: structure, composition, ageing and disease. *J. Anat.* *184 (Pt 3)*, 503–509.
- Rengel, Y., Ospelt, C., and Gay, S. (2007). Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res. Ther.* *9*, 221.
- Rizkalla, G., Reiner, A., Bogoch, E., and Poole, A.R. (1992). Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J. Clin. Invest.* *90*, 2268–2277.
- Rodrigues Júnior, P.H., de Sá Oliveira, K., Almeida, C.E.R. de, De Oliveira, L.F.C., Stephani, R., Pinto, M. da S., Carvalho, A.F. de, and Perrone, Í.T. (2016). FT-Raman and chemometric tools for rapid determination of quality parameters in milk powder: Classification of samples for the presence of lactose and fraud detection by addition of maltodextrin. *Food Chem.* *196*, 584–588.
- Roemer, F.W., Crema, M.D., Trattnig, S., and Guermazi, A. (2011). Advances in Imaging of Osteoarthritis and Cartilage. *Radiology* *260*, 332–354.
- Roughley (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans.
- Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K.M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., and Baranska, M. (2013). Raman spectroscopy of proteins: a review: Raman spectroscopy of proteins. *J. Raman Spectrosc.* *44*, 1061–1076.
- Sabaratnam, S., Arunan, V., Coleman, P.J., Mason, R.M., and Levick, J.R. (2005). Size selectivity of hyaluronan molecular sieving by extracellular matrix in rabbit synovial joints. *J. Physiol.* *567*, 569–581.
- Sah, R.L., Yang, A.S., Chen, A.C., Hant, J.J., Halili, R.B., Yoshioka, M., Amiel, D., and Coutts, R.D. (1997). Physical properties of rabbit articular cartilage after transection of the anterior cruciate ligament. *J. Orthop. Res.* *15*, 197–203.
- Sandell, L.J. (2012). Biomarkers in Osteoarthritis. *HSS J.* *8*, 33–34.
- Schmidt, T.A., Gastelum, N.S., Nguyen, Q.T., Schumacher, B.L., and Sah, R.L. (2007). Boundary lubrication of articular cartilage: Role of synovial fluid constituents. *Arthritis Rheum.* *56*, 882–891.
- Schmidt-Rohlfing, B., Thomsen, M., Niedhart, C., Wirtz, D.C., and Schneider, U. (2002). Correlation of bone and cartilage markers in the synovial fluid with the degree of osteoarthritis. *Rheumatol. Int.* *21*, 193–199.
- Sefiane, K. (2014). Patterns from drying drops. *Adv. Colloid Interface Sci.* *206*, 372–381.
- Setton, L.A., Mow, V.C., Müller, F.J., Pita, J.C., and Howell, D.S. (1994). Mechanical Properties of Canine Articular Cartilage Are Significantly Altered Following Transection of the Anterior Cruciate Ligament. *J. Orthop. Res.* *12*, 451–463.
- Setton, L.A., Mow, V.C., and Howell, D.S. (1995). Mechanical behavior of articular cartilage in shear is altered by transection of the anterior cruciate ligament. *J. Orthop. Res.* *13*, 473–482.

- Setton, L.A., Elliott, D.M., and Mow, V.C. (1999). Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 2–14.
- Shabalin, V.N., and Shatokhina, S.N. (2007). Diagnostic markers in the structures of human biological liquids. *Singapore Med. J.* 48, 440–446.
- Shane Anderson, A., and Loeser, R.F. (2010). Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 24, 15–26.
- Shin, C.S., and Lee, J.H. (2012). Arthroscopic Treatment for Osteoarthritic Knee. *Knee Surg. Relat. Res.* 24, 187–192.
- Shriver, D.F., and Atkins, M.P.W. (2001). Chapitre 4 - Les symétries des vibrations moléculaires. In *Chimie inorganique, (De Boeck Supérieur)*, p.
- Sikirzhyski, V., Virkler, K., and Lednev, I.K. (2010). Discriminant Analysis of Raman Spectra for Body Fluid Identification for Forensic Purposes. *Sensors* 10, 2869–2884.
- Simkin, P.A. (2015). The human knee: A window on the microvasculature. *Tissue Barriers* 3, e970465.
- Simkin, P.A., and Bassett, J.E. (2011). Pathways of Microvascular Permeability in the Synovium of Normal and Diseased Human Knees. *J. Rheumatol.* 38, 2635–2642.
- Smith, M.D. (2011). The Normal Synovium. *Open Rheumatol. J.* 5, 100–106.
- Smith, G.N., Mickler, E.A., Myers, S.L., and Brandt, K.D. (2001). Effect of intraarticular hyaluronan injection on synovial fluid hyaluronan in the early stage of canine post-traumatic osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 28, 1341–1346.
- Sobac, B., and Brutin, D. (2014). Desiccation of a sessile drop of blood: Cracks, folds formation and delamination. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 448, 34–44.
- Sohn, D.H., Sokolove, J., Sharpe, O., Erhart, J.C., Chandra, P.E., Lahey, L.J., Lindstrom, T.M., Hwang, I., Boyer, K.A., Andriacchi, T.P., et al. (2012). Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res. Ther.* 14, R7.
- Sokolove, J., and Lopus, C.M. (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 5, 77–94.
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health Multidiscip. Approach* 1, 461–468.
- de Souza, R.A., Xavier, M., Manguiera, N.M., Santos, A.P., Pinheiro, A.L.B., Villaverde, A.B., and Silveira, L. (2014). Raman spectroscopy detection of molecular changes associated with two experimental models of osteoarthritis in rats. *Lasers Med. Sci.* 29, 797–804.
- Stachowiak, G., and Batchelor, A.W. (2004). Chapter 6 - Characterization of test specimens. In *Experimental Methods in Tribology, (Elsevier)*, pp. 115–164.
- Strauss, E.J., Hart, J.A., Miller, M.D., Altman, R.D., and Rosen, J.E. (2009). Hyaluronic Acid Viscosupplementation and Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* 37, 1636–1644.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., and Mobasheri, A. (2009). The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet. J.* 179, 10–24.
- Sweigart, M.A., Zhu, C.F., Burt, D.M., DeHoll, P.D., Agrawal, C.M., Clanton, T.O., and Athanasiou, K.A. (2004). Intraspecies and interspecies comparison of the compressive properties of the medial meniscus. *Ann. Biomed. Eng.* 32, 1569–1579.
- Tadokoro, C., and Nakano, K. (2012). Spontaneous Change in Effective Viscosity of a Liquid Crystal by Surface Anchoring in an EHD Contact. 139–141.
- Takahashi, M., Naito, K., Abe, M., Sawada, T., and Nagano, A. (2004). Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6, R208.

- Taleb, I., Thiéfin, G., Gobinet, C., Untereiner, V., Bernard-Chabert, B., Heurgué, A., Truntzer, C., Hillon, P., Manfait, M., Ducoroy, P., et al. (2013). Diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a proof-of-concept study using serum micro-Raman spectroscopy. *The Analyst* *138*, 4006.
- Tanaka, Y., Nakayamada, S., and Okada, Y. (2005). Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* *4*, 325–328.
- Tchetverikov, I. (2005). MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 694–698.
- Teeple, E., Jay, G.D., Elsaid, K.A., and Fleming, B.C. (2013). Animal Models of Osteoarthritis: Challenges of Model Selection and Analysis. *AAPS J.* *15*, 438–446.
- Tiwari, N., Chabra, S., Mehdi, S., Sweet, P., Krasieva, T.B., Pool, R., Andrews, B., and Peavy, G.M. (2010). Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool. *J. Biomed. Opt.* *15*, 56001-056001–056010.
- Tuma, R. (2005). Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. *J. Raman Spectrosc.* *36*, 307–319.
- Uesaka, S., Nakayama, Y., Shirai, Y., and Yoshihara, K. (2001). Serum and synovial fluid levels of chondroitin sulfate in patients with osteoarthritis of the knee joint. *J. Nippon Med. Sch. Nippon Ika Daigaku Zasshi* *68*, 165–170.
- Uthman, I., Raynauld, J.-P., and Haraoui, B. (2003). Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgrad. Med. J.* *79*, 449–453.
- Vardaki, M.Z. (2013). Chemical Mapping of Human Osteoarthritic Femoral Head Section Using micro-Raman spectroscopy. p.
- Vignon, E., Arlot, M., Hartmann, D., Moyen, B., and Ville, G. (1983). Hypertrophic repair of articular cartilage in experimental osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* *42*, 82–88.
- Virkler, K., and Lednev, I.K. (2010). Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification. *Anal. Bioanal. Chem.* *396*, 525–534.
- Visser, A.W., Ioan-Facsinay, A., de Mutsert, R., Widya, R.L., Loef, M., de Roos, A., le Cessie, S., den Heijer, M., Rosendaal, F.R., and Kloppenburg, M. (2014). Adiposity and hand osteoarthritis: the Netherlands Epidemiology of Obesity study. *Arthritis Res. Ther.* *16*, R19.
- Volpi, N. (2011). Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. *Inflammopharmacology* *19*, 299–306.
- Waller, K.A., Zhang, L.X., Elsaid, K.A., Fleming, B.C., Warman, M.L., and Jay, G.D. (2013). Role of lubricin and boundary lubrication in the prevention of chondrocyte apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 5852–5857.
- Watson, P.J., Carpenter, T.A., Hall, L.D., and Tyler, J.A. (1996). Cartilage swelling and loss in a spontaneous model of osteoarthritis visualized by magnetic resonance imaging. *Osteoarthritis Cartilage* *4*, 197–207.
- Watterson, J.R., and Esdaile, J.M. (2000). Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* *8*, 277–284.
- Wei, F., Zhang, D., Halas, N.J., and Hartgerink, J.D. (2008). Aromatic Amino Acids Providing Characteristic Motifs in the Raman and SERS Spectroscopy of Peptides. *J. Phys. Chem. B* *112*, 9158–9164.
- Wheatley, B.B., Fischenich, K.M., Button, K.D., Haut, R.C., and Donahue, T.L.H. (2015). An optimized transversely isotropic, hyper-poro-viscoelastic finite element model of the meniscus to evaluate mechanical degradation following traumatic loading. *J. Biomech.* *48*, 1454–1460.
- Wieland, H.A., Michaelis, M., Kirschbaum, B.J., and Rudolphi, K.A. (2005). Osteoarthritis — an untreatable disease? *Nat. Rev. Drug Discov.* *4*, 331–344.
- Williams, F.M., and Spector, T.D. (2008). Biomarkers in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* *10*, 101.
- Wyant, J.C. (2002). White light interferometry. pp. 98–107.
- Yakhno, T.A., and Yakhno, V.G. (2009). Structural evolution of drying drops of biological fluids. *Tech. Phys.* *54*, 1219–1227.

- Yakhno, T.A., Sanin, A.A., Ilyazov, R.G., Vildanova, G.V., Khamzin, R.A., Astascheva, N.P., Markovsky, M.G., Bashirov, V.D., and Yakhno, V.G. (2015). Drying Drop Technology as a Possible Tool for Detection Leukemia and Tuberculosis in Cattle. *J. Biomed. Sci. Eng.* 8, 1–23.
- Yamada, H., Miyauchi, S., Hotta, H., Morita, M., Yoshihara, Y., Kikuchi, T., and Fujikawa, K. (1999). Levels of chondroitin sulfate isomers in synovial fluid of patients with hip osteoarthritis. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* 4, 250–254.
- Yang, S., Li, B., Slipchenko, M.N., Akkus, A., Singer, N.G., Yeni, Y.N., and Akkus, O. (2013). Laser wavelength dependence of background fluorescence in Raman spectroscopic analysis of synovial fluid from symptomatic joints: Analysis of synovial fluid from symptomatic joints. *J. Raman Spectrosc.* 44, 1089–1095.
- Yoshida, H., Kojima, T., Kurokouchi, K., Takahashi, S., Hanamura, H., Kojima, M., Poole, A.R., and Ishiguro, N. (2013). Relationship between pre-radiographic cartilage damage following anterior cruciate ligament injury and biomarkers of cartilage turnover in clinical practice: a cross-sectional observational study. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 831–838.
- Yoshioka, M., Coutts, R.D., Amiel, D., and Hacker, S.A. (1996). Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 4, 87–98.
- Yusuf, E., and Kloppenburg, M. (2013). Epidemiological studies on adipokines and osteoarthritis. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 8, 327–334.
- Zhang, D., Mrozek, M.F., Xie, Y., and Ben-Amotz, D. (2004). Chemical Segregation and Reduction of Raman Background Interference Using Drop Coating Deposition. *Appl. Spectrosc.* 58, 929–933.
- Zhang, W., Moskowitz, R.W., Nuki, G., Abramson, S., Altman, R.D., Arden, N., Bierma-Zeinstra, S., Brandt, K.D., Croft, P., Doherty, M., et al. (2007). 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 Cartilage* 15, 981–1000.
- Zhou, Q., Wei, B., Liu, S., Mao, F., Zhang, X., Hu, J., Zhou, J., Yao, Q., Xu, Y., and Wang, L. (2015). Cartilage matrix changes in contralateral mobile knees in a rabbit model of osteoarthritis induced by immobilization. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16, 224.
- <http://www.blog-elsevier-masson.fr/2016/10/paces-ue-5-organisation-appareils-systemes-systeme-articulaire>. (s.d.). Consulté le 06 01, 2017
- <http://www.centre-orthopedique-santy.com/site/patients/fiches/arthrose-je-m-informe-sur-la-viscosupplementation.htm>. (s.d.). Consulté le 07 24, 2017
- <https://www.mon-arthrose.com/arthrose-du-genou/les-articulations/>. (s.d.). Consulté le 09 08, 2017

Liste des figures

Figure 1 Illustration des effets de l'arthrose sur l'articulation.....	13
Figure 1.1 Schéma d'une articulation synoviale saine.....	18
Figure 1.2 Propriétés physiques de l'acide hyaluronique.....	21
Figure 1.3 Structure de la membrane synoviale (Tiwari et al., 2010).	22
Figure 1.4 Fonctionnement de la barrière synoviale.....	24
Figure 1.5 Le phénomène « d'imperméabilisation dynamique ».....	25
Figure 1.6 Structure du cartilage, de la surface jusqu'à l'os sous-chondral.....	27
Figure 1.7 Les agrécans de protéoglycanes.....	28
Figure 1.8 Représentation schématique de la structure générale du cartilage articulaire.....	30
Figure 1.9 Transition cartilage / os-sous chondral dans une articulation humaine saine.....	32
Figure 1.10 Anatomie du genou.....	33
Figure 1.11 Anatomie des ménisques.....	34
Figure 1.12 Les différentes localisations du ménisque.....	34
Figure 1.13 Architecture des fibres de collagène dans le ménisque.....	35
Figure 1.14 Illustration des effets de l'arthrose sur l'articulation.....	45
Figure 1.15 Hiérarchie des traitements recommandés en fonction de la sévérité des symptômes.....	47
Figure 1.16 Cercle vicieux du processus catabolique de l'OA.....	54
Figure 1.17 Radiographies de face du genou montrant le système de score KL.....	57
Figure 1.18 Comparaison radiographie / IRM.....	58
Figure 1.19 Estimation de la viscosité du LS par « String test » et « Thumb test ».....	59
Figure 1.20 Catégories des modèles d'OA existants.....	67
Figure 1.21 Deux régimes d'évaporation.....	70
Figure 1.22 La mouillabilité d'une goutte reposant sur un substrat solide.....	71
Figure 1.23 L'évaporation d'une goutte de liquide basée sur des transferts de chaleur et de masse.....	71
Figure 1.24 Le flux d'évaporation n'est pas uniforme et augmente en périphérie de la goutte.....	72
Figure 1.25 Flux de circulation internes.....	72
Figure 1.26 Différents motifs de gouttes séchées.....	73
Figure 1.27 Principe de la diffusion Raman (raies Stokes).....	74
Figure 1.28 Spectre Raman : signature des molécules et liaisons présentes dans l'échantillons.....	75
Figure 1.29 Les différents modes de vibration moléculaires observables en Raman.....	77
Figure 1.30 Formation d'une liaison peptidique.....	77
Figure 1.31 Exemple de protéine, le collagène.....	78
Figure 1.32 Les liaisons Amide en spectroscopie Raman.....	78
Figure 2.1 Protocole de caractérisation tribologique et physico-chimique du LS.....	85

Figure 2.2 Représentation schématique du protocole de dépôt de gouttes.....	86
Figure 2.3 Principe de l'interférométrie.....	89
Figure 2.4 Microscope confocal Raman LabRam HR.....	90
Figure 2.5 Localisation des ROI.....	90
Figure 2.6 Spectre Raman type obtenu sur du LS.	92
Figure 2.7 Spectre Raman type de l'os.....	93
Figure 2.8 Spectres moyens normalisés de gouttes séchées d'HA seul	94
Figure 2.9 Spectre moyen normalisé de gouttes séchées de chondroïtine sulfate.....	95
Figure 2.10 Calcul des écarts intra- et inter-zones.....	97
Figure 2.11 Exemple de « fitting » d'une bande selon les trois fonctions	98
Figure 2.12 Matrices des ratios d'amplitudes (A_i).....	99
Figure 2.13 Organigramme de post-traitement des spectres Raman pour chaque LS.	100
Figure 2.14 Analyse en Composante Principale : Organisation des données.....	102
Figure 2.15 Analyse en Composante Principale : Représentation des résultats.....	103
Figure 3.1 Localisation de la zone de prélèvement de LS : les genoux.	106
Figure 3.2 Images 2D des gouttes de LS de chiens sains et OA	108
Figure 3.3 Images 3D entières de gouttes de LS de chiens sains et OA	109
Figure 3.4 Images 3D périphériques des gouttes de LS de chiens sains et OA	109
Figure 3.5 Profils périphériques des gouttes de LS de chiens sains et OA.....	110
Figure 3.6 Répétabilité des mesures spectrales	111
Figure 3.7 Reproductibilité des spectres moyens normalisés des LS de chiens sains.....	111
Figure 3.8 Ecart entre les spectres des LS sains et OA	112
Figure 3.9 Spectres moyens normalisés des LS de chiens arthrosiques	113
Figure 3.10 Régions spectrales d'intérêt	113
Figure 3.11 Bandes Raman sélectionnées pour analyses quantitatives.....	114
Figure 3.12 Exemples de ratios significativement différents entre LS sains et OA.....	115
Figure 3.13 Résultats ACP : scores des composantes principales 1 à 4	115
Figure 3.14 Régression linéaire des quatre ratios corrélés avec la surface des gouttes.....	117
Figure 3.15 Régression linéaire de deux ratios corrélés avec la hauteur des bourrelets.....	118
Figure 4.1 L'acide hyaluronique est injecté directement dans l'articulation	128
Figure 4.2 Photographies de ménisques et cartilages des condyles fémoraux, trochlée fémorale et plateau tibial	134
Figure 4.3 Scores macroscopiques significatifs.....	135
Figure 4.4 Schéma représentant le modèle de Maxwell généralisé à N branches.....	141
Figure 4.5 Préparation du ménisque pour caractérisation	143
Figure 4.6 Préparation du cartilage pour caractérisation	144
Figure 4.7 Effet du nombre de branches dans le modèle viscoélastique.....	146

Figure 4.8 Propriétés viscoélastiques des ménisques sains et opérés non traités	148
Figure 4.9 Propriétés viscoélastiques des ménisques sains et opérés traités.....	149
Figure 4.10 Propriétés viscoélastiques des ménisques	151
Figure 4.11 Propriétés viscoélastiques des cartilages sains et opérés non traités	152
Figure 4.12 Propriétés viscoélastiques des cartilages sains et opérés traités	153
Figure 4.13 Propriétés viscoélastiques des cartilages fonction de l'évolution de la pathologie	155
Figure 4.14 ACP des scores macroscopiques et des propriétés mécaniques.....	156
Figure 4.15 ACP des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages sains et opérés non traités.....	157
Figure 4.16 ACP des propriétés viscoélastiques des cartilages sains et opérés non traités.....	157
Figure 4.17 ACP des propriétés viscoélastiques des ménisques sains et opérés non traités.	160
Figure 4.18 ACP des propriétés viscoélastiques des ménisques et cartilages sains et opérés traités.	162
Figure 4.19 ACP des propriétés viscoélastiques de tous les ménisques et cartilages.....	162
Figure 4.20 ACP des scores macroscopiques des ménisques et cartilages opérés et opérés traités.	164
Figure 4.21 ACP des propriétés mécaniques des ménisques et cartilages opérés et opérés traités.	165
Figure 4.22 Surface des gouttes des deux groupes de LS	167
Figure 4.23 Profils périphériques des gouttes des deux groupes de LS	167
Figure 4.24 Spectres des quatre groupes de LS.....	169
Figure 4.25 ACP des quatre groupes de LS.....	169
Figure 4.26 Spectres des LS de lapins	170
Figure 4.27 Régions spectrales d'intérêt	171
Figure 4.28 Exemples de ratios significativement différents entre groupes OA 2sem et OA 6sem ...	172
Figure 4.29 Régression linéaire des deux ratios corrélés avec la surface des gouttes.....	173
Figure 4.30 Régression linéaire des deux ratios corrélés avec la hauteur des bourrelets	174
Figure 4.31 Bonne corrélation entre les scores macroscopiques et des ratios physico-chimiques. .	179
Figure 4.32 Corrélation modérée entre les scores macroscopiques et la surface des gouttes de LS.	179
Figure 5.1 Surface des gouttes et hauteurs des bourrelets des gouttes de LS classés par scores radiographiques.....	183
Figure 5.2 Ecart inter-zone de l'échantillon HUG8	184
Figure 5.3 Résultat ACP des patients arthrosiques classés par score radiographique.....	185
Figure 5.4 Exemple de typage des gouttes de LS sur le modèle canin.	185
Figure 5.5 Exemple de typage des gouttes de LS sur les patients arthrosiques.	186
Figure 5.6 Les phénotypes tribologique et physico-chimiques du modèle canin.	186
Figure 5.7 Exemple de phénotypes tribologique et physico-chimiques des patients arthrosiques....	187
Figure 5.8 Ratios discriminant les surfaces de gouttes de LS canins et humains	188
Figure 5.9 Résultats ACP CN et HUG : groupes (S-) et (S+)	188

Figure 5.10 Ratios discriminant les hauteurs de bourrelets des gouttes de LS canins et humains ...	189
Figure 5.11 Résultats ACP CN et HUG : groupes (H-) et (H+).....	189
Figure 5.12 Ratios communs CN et HUG	191
Figure 5.13 Ratios HUG montrant de bonnes corrélations avec IL-6.....	193
Figure 6.1 Résultats bruts des ACP CN et LP	199
Figure 6.2 Ratios discriminant les surfaces des gouttes de LS	200
Figure 6.3 Résultats ACP CN, HUG (S-)/(S+) et LP.....	201
Figure 6.4 Ratios discriminant les hauteurs des bourrelets des gouttes de LS	202
Figure 6.5 Résultats ACP CN, HUG (H-)/(H+) et LP	203

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Types de GAG et origine	21
Tableau 1.2 Composition du LS sain	22
Tableau 1.3 Résumé des principales caractéristiques des zones des ménisques.	36
Tableau 1.4 Evolution de la composition du LS selon l'état de l'articulation	56
Tableau 1.5 Caractéristiques du LS.....	59
Tableau 1.6 Résumé des principaux biomarqueurs moléculaires.....	61
Tableau 1.7 Avantages et inconvénients des modèles humains et animaux pour l'étude de l'OA.....	64
Tableau 1.8 Tableau comparatif des concentrations et poids moléculaire de l'HA selon les espèces.	69
Tableau 2.1 Bandes Raman des gouttes séchées de LS.	92
Tableau 2.2 Caractéristiques des deux viscopléments choisis.	94
Tableau 2.3 Principales bandes Raman de l'HA, assignées à partir de la littérature.....	94
Tableau 2.4 Principales bandes Raman de la CS, assignées à partir de la littérature.....	95
Tableau 3.1 Liste des échantillons de LS prélevés sur les chiens arthrosiques	107
Tableau 3.2 Liste des quatre ratios montrant un fort degré de corrélation avec la surface des gouttes	116
Tableau 3.3 Liste des huit ratios montrant un excellent degré de corrélation avec la hauteur des bourelets.....	117
Tableau 4.1 Liste des groupes et des lapins utilisés dans cette étude.....	131
Tableau 4.2 Scores utilisés pour l'évaluation macroscopique de la gonarthrose	132
Tableau 4.3 Volumes de LS prélevés.	133
Tableau 4.4 Scores macroscopiques des ménisques, cartilages et de la formation d'ostéophytes ..	134
Tableau 4.5 Propriétés viscoélastiques des cinq groupes de ménisques.....	147
Tableau 4.6 Propriétés viscoélastiques des ménisques en fonction de l'évolution de la pathologie .	150
Tableau 4.7 Propriétés viscoélastiques des cinq groupes de cartilages articulaires.....	152
Tableau 4.8 Propriétés viscoélastiques cartilages en fonction de l'évolution de la pathologie	154
Tableau 4.9 Propriétés tribologiques des quatre groupes de LS	166
Tableau 4.10 Propriétés tribologiques des deux groupes de LS	166
Tableau 4.11 Liste des cinq ratios montrant un bon degré de corrélation avec la surface des gouttes	173
Tableau 4.12 Liste des deux ratios montrant un bon degré de corrélation avec la hauteur des bourelets.....	174
Tableau 4.13 Liste des six ratios montrant un bon degré de corrélation avec le score global macroscopique	178

Tableau 5.1 Liste des échantillons de LS prélevés sur patients arthrosiques	182
Tableau 5.2 Constitution des groupes de patients arthrosiques.	187
Tableau 5.3 Liste des douze ratios montrant un bon degré de corrélation avec la hauteur des bourrelets.....	190
Tableau 6.1 Propriétés tribologiques des différents groupes des différentes espèces	197

Résumé

L'arthrose est la plus commune des maladies articulaires dans le monde. Elle induit des charges physiques, psychologiques, sociétales et économiques majeures. Selon les Nations Unies, en 2050, 315 millions de personnes souffriront d'arthrose symptomatique et 105 millions d'entre elles seront fortement handicapées par la maladie.

Les symptômes cliniques et les techniques d'imagerie constituent les éléments principaux pour le diagnostic et le suivi de l'arthrose aujourd'hui. En dépit de progrès technologiques et des recherches intensives de nouveaux biomarqueurs, aucun outil ne permet de détecter précocement la maladie, de classer les patients selon le pronostic d'évolution de la maladie ou encore de quantifier l'effet des traitements. Ce manque de biomarqueurs sensibles, spécifiques et reproductibles limite les progrès thérapeutiques dans la perspective d'une médecine personnalisée.

Dans les articulations synoviales, l'homéostasie est assurée par le maintien de la composition physiologique du liquide synovial, fluide visqueux et lubrifiant. Au cours du processus arthrosique, des changements de composition du liquide synovial interviennent en même temps que la dégradation des tissus articulaires.

Dans ce travail, une technique mini-invasive a été mise au point pour caractériser l'état arthrosique du liquide synovial, dans le cadre du suivi de la pathologie et de l'effet de traitements, chez les animaux et les patients. Le dépôt de quelques microlitres de liquide synovial sur une lame en verre forme une goutte circulaire qui, en séchant, concentre dans un anneau périphérique les solutés, dont les caractéristiques tribologiques renseignent sur la présence d'une pathologie articulaire. La spectroscopie Raman fournit des informations précises sur la composition chimique du liquide synovial et permet de suivre les altérations biomoléculaires et structurales des solutés de l'anneau périphérique de la goutte de liquide synovial séchée. Cette thèse aboutit à la proposition de biomarqueurs synoviaux représentatifs du processus arthrosique articulaire.

Abstract

Osteoarthritis is the most common joint disorder worldwide. Symptomatic osteoarthritis is a painful and debilitating disease which is associated with a large physical, psychological, societal and economic burden. According to the United Nations, by 2050, 315 million people will suffer from symptomatic osteoarthritis worldwide, of whom 105 million will be severely disabled by the disease.

Osteoarthritis has traditionally been diagnosed and followed-up based on clinical symptoms and imaging modalities. However, these techniques and molecular biomarker developments are insensitive and identification of patients at risk to disease progression remains a challenge. They also fail to subgroup the heterogenous osteoarthritis population while this would allow a better scrutiny of diagnosis and treatment options. A surrogate biomarker with prognostic and/or diagnostic capabilities able to identify potential responders is much needed in osteoarthritis care and therapy.

In diarthrodial joints, homeostasis is based on physiological composition and function of synovial fluid, a viscous fluid that lubricates joints. During osteoarthritis, synovial fluid biochemical properties are modified simultaneously to other joint tissues damages.

In this work, a minimally invasive technique has been developed to characterize synovial fluid osteoarthritic state in order to diagnose, predict and follow-up joint diseases in patients and animals. Deposition of only a few microliters of synovial fluid on fused silica slide forms a circular dried drop with a ring-like deposit of concentrated solutes at the droplet edge. Tribological analysis based on the morphology of the dried drops reflects synovial fluid biomolecular and structural modifications. Raman Spectroscopy provides more specific information on chemical composition and monitors biomolecular structural alterations. This thesis leads to the proposal of synovial biomarkers representative of the joint osteoarthritic process.