N° d'ordre 334-2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE MATERIAUX DE LYON

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 19/12/2012

par

MATEI Constantin Ionut

Recherche des assemblages moléculaires actifs en biolubrification en vue du diagnostic et de la thérapeutique précoce de pathologies articulaires

Directeur de thèse : BLANCHIN Marie-Geneviève
Co - directeur de thèse : TRUNFIO SFARGHIU Ana-Maria

JURY :
M BERTHIER Yves
M BODENNEC Jacques
Mme HONG Saw-See
M MAROTTE Hubert
M MARQUES Carlos
M MIOSSEC Pierre

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Secrétaire Général	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. BERNARD
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements

En cette fin de thèse tout le plaisir est de regarder maintenant en arrière le chemin parcouru et de se remémorer toutes les personnes m'ayant soutenu et aidé. J'ai eu l'immense chance de rencontrer ces personnes qui ont su enrichir ces nombreux mois de travaux, tant dans ma vie professionnelle que personnelle.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures (LPMCN CNRS UMR 5586, ILM CNRS UMR 5300 à compter du 01/01/2013) et au Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS CNRS UMR 5259). Je veux remercier ***M. Alfonso SAN MIGUEL****, Directeur du LPMCN et* ***M. David DUREISSEIX****, Directeur du LaMCoS, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires.*

J'exprime mes vifs remerciements à mes directeurs de thèse ***Mme Marie-Geneviève BLANCHIN*** *et* ***Mme Ana-Maria TRUNFIO SFARGHIU*** *qui m'ont accompagné lors de mes recherches. Vous avez été une source d'inspiration, de savoir mais aussi et un support amical.*

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à:

- ***M. Hubert MAROTTE*** *et* ***M. Carlos MARQUES****, rapporteurs, qui ont eu la tâche délicate de lire et de juger ce travail de recherche;*
- ***Mme Saw-See HONG*** *et* ***M. Pierre MIOSSEC*** *avec qui nous avons mené à bien d'importantes collaborations lors des travaux de cette thèse et qui ont accepté de faire partie du jury;*
- ***M. Jacques BODENNEC*** *qui m'a prodigué ses conseils pour certaines analyses biochimiques et que je suis heureux de retrouver dans ce jury;*
- ***M. Yves BERTHIER*** *qui a constamment suivi mon travail et accepté de le juger.*

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes que je tiens à remercier pour leur soutien et les discussions enrichissantes:

- ***M. Pr. Pierre MIOSSEC*** *et* ***M. Dr Régis JOLY*** *de l'Equipe Immunologie Clinique et Rhumatologie de l'Hôpital Edouard Herriot grâce à qui j'ai pu obtenir des échantillons de liquide synovial indispensables pour mes recherches ;*

- ***Mme Saw-See HONG et M. Pierre BOULANGER*** *de Laboratoire Rétrovirus, Intégration Virale & Vaccins (RI2V, UBC Lyon1) pour l'important travail de réalisation des cultures cellulaires utilisées dans cette étude ;*

- ***Mme Caroline BOULOCHER, Mme Marie-Eve DUCLOS, M. Thiery ROGER, M. Michael SCHRAMME et M. Eric VIGUIER*** *de VetAgro Sup Lyon qui m'ont procuré des nombreux prélèvements de liquide synovial d'origine animale ;*

- ***M. Jacques BODENNEC*** *du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL, UCB Lyon1),* ***M. Michel GUICHARDANT*** *de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL, UCB Lyon1) et* ***M. René BUCHET*** *de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS, UCB Lyon1) pour m'avoir donné accès aux expériences analytiques au sein de leur équipe. Sans vous la biochimie serait restée pour moi un terrain encore peu exploré et parfois incompris ;*

- ***M. Nick BLANCHARD*** *de Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures (LPMCN, UCB Lyon1) qui m'a initié à l'utilisation de microscope Topcon au LPMCN ;*

- ***Mme Annie RIVOIRE, Mme Christelle BOULÉ et Mme Béatrice BURDIN*** *de Centre Technologique des Microstructures (CTμ, UCB Lyon 1) pour m'avoir aidé dans les observations, m'avoir fait partager leurs expériences et leurs idées dans le domaine des microscopies ;*

- ***Mme Mirela SAVA et M. Bogdan MUNTEANU*** *du Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS, INSA Lyon) pour avoir contribué à cette étude par leur travail durent leurs stages Erasmus/ Master.*

J'adresse mes sincères remerciements à mes collègues du LaMCoS et du LPMCN et mes amis roumains, vous avez été d'un soutien sans faille, et également une pensée à mes amis français, vous m'avez aidé dans mon intégration, vous m'avez "adopté" et m'avez montré que l'amitié en France n'est pas seulement un mot. Je sais que vous vous reconnaitrez tous. Sachez que vous occupez une place immense dans mon cœur et que sans vous, tout ce travail n'aurait pas été possible.

Je suis reconnaissant envers ma famille pour leur amour et leur soutien. Vous m'avez appris à être comme je suis, et m'avez apporté de solides fondations afin que j'affronte ce que la vie m'a réservé, jusque-là, et ce qui m'attend maintenant.

Enfin, merci à vous qui partagez mes passions, merci de nourrir et de raviver mes rêves.

Valorisation du travail de recherche

Présentations ORALES dans des conférences internationales :

- **Matei CI**, Trunfio-Sfarghiu AM, Munteanu B, Borta I, Blanchin MG, Miossec P, Boulanger P, Hong SS, Berthier Y, The Role of Discontinuous Lipid Structures in the Lubrication : Possible mechanism deduced from Healthy and Pathological Synovial Joints, International Conference on BioTribology, Imperial College London, 2011
- **Matei CI**, Trunfio-Sfarghiu AM, Munteanu B, Borta I, Blanchin MG, Miossec P, Boulanger P, Hong SS, Berthier Y, Structural and pathological analysis of healthy and pathological synovial fluids, Conference on Diagnosis and Prediction in Mechanical Engineering Systems, Galati, 2012
- Munteanu B, Trunfio-Sfarghiu AM, **Matei CI**, Hong SS, Boulanger P, Miossec P, Blanchin MG, Berthier Y, Correlation between nanomechanical and tribological properties of healthy and pathological synovial fluids reconstituted from synoviocyte cultures, The 5th International Conference on advanced concepts in mechanical engineering, Iasi, 2012

Publications scientifiques :

- Mirea DA, Trunfio-Sfarghiu AM, **Matei CI**, Munteanu B, Piednoir A, Rieu JP, Blanchin MG, Berthier Y, Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of synovial fluid, Tribology International, 2013, 59:302-11
- Munteanu B, Trunfio-Sfarghiu AM, **Matei CI**, Hong SS, Boulanger P, Miossec P, Blanchin MG, Berthier Y, Correlation between nanomechanical and tribological properties of healthy and pathological synovial fluids reconstituted from synoviocyte cultures, Bulletin of the Polytechnic Institute of Iasi, 2012, LVIII (LXII)/ 2

Articles scientifiques en vue de publication :

- **Matei CI**, Boulocher C, Sava M, Viguer E, Schramme M, Roger T, Bethier Y, Trunfio-Sfarghiu, AM, Blanchin MG, Ultrastructural analysis of healthy biological synovial fluids, soumis en Journal of Colloid and Interfaces
- **Matei CI**, Sava M, Munteanu B, Boulocher C, Schramme M, Roger T, Bethier Y, Blanchin MG, Trunfio-Sfarghiu AM, Tribological analysis of healthy synovial fluids, en instance de soumis en Tribological International
- **Matei CI**, Munteanu B, Hong SS, Miossec P, Boulanger P, Berthier Y, Blanchin MG, Trunfio-Sfarghiu AM, Molecular and Tribological Signature of the Inflammatory Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis, en instance de soumis en Translation Medicine

Recherche des assemblages moléculaires actifs en biolubrification en vue du diagnostic et de la thérapeutique précoce de pathologies articulaires

Résumé

Les maladies ostéoarticulaires représentent environ 10% de l'ensemble des pathologies survenant en France chaque année. Les difficultés pour identifier les causes de ces maladies proviennent pour une part d'un manque de compréhension du mécanisme de lubrification d'une articulation synoviale saine.

Dans ce contexte, un premier objectif de ce travail a été d'analyser la structure discontinue du liquide synovial à partir de prélèvements animaux sains et de la reproduire à partir de composants biomoléculaires commerciaux afin de comprendre le mécanisme de lubrification dans le cas sain.

Le deuxième objectif de cette thèse a été d'analyser l'évolution de la structure et des propriétés lubrifiantes du liquide synovial dans le stade précoce de pathologies non-inflammatoires ou inflammatoires à partir de prélèvements pathologiques humains. Afin d'étudier plus finement l'évolution de la lubrification pathologique cette thèse a visé à développer aussi des modèles de lubrifiants obtenus à partir de cultures cellulaires de synoviocytes humains en combinant l'action de facteurs inflammatoire (cytokines).

L'ensemble des résultats montre l'importance de la structure supramoléculaire du liquide synovial dans l'obtention de bonnes propriétés lubrifiantes ; cette relation devrait constituer d'une part un paramètre clé dans le diagnostic précoce des pathologies articulaires et d'autre part une voie de développement de liquides thérapeutiques à base de lubrifiants nanostructurés.

MOTS-CLES : biolubrification, liquide synovial, assemblages moléculaires, pathologies articulaires, synoviocytes, phospholipides, microscopie électronique en transmission et à balayage, microscopie à force atomique, microscopie photonique de fluorescence.

Research of active molecular assemblies in biolubrication in view of diagnosis and early treatment of joint diseases

Abstract

Osteoarticular diseases account for approximately 10% of all diseases occurring in France each year. The difficulties in identifying their causes are also due to a deficiency in understanding the lubrication mechanism of healthy synovial joint.

In this context, the first objective of the present study was to analyze the discontinuous structure of synovial fluid samples from healthy animals and to reproduce it using commercial biomolecular components in order to understand the lubrication mechanism in the healthy case.

The second objective of this thesis was to analyze the evolution of the structure and the lubricating properties of synovial fluid in the early stage of non-inflammatory and inflammatory diseases using pathological human fluid samples. In order to study more precisely the evolution of pathological lubrication this work aimed to develop lubricant models obtained from cell cultures of human synoviocytes adding the action of pathological inflammatory factors (cytokines).

All together the results show the importance of the supramolecular structure of the synovial fluid in obtaining good lubricating properties what may be a key parameter in the early diagnosis of joint diseases and even more a chance to develop therapeutic fluids based on nanostructured lubricants.

KEYWORDS: biolubrification, synovial fluid, molecular assemblies, articular diseases, synoviocytes, phospholipids, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy, atomic force microscopy, fluorescence microscopy.

Liste d'abréviations

AFM	Atomique Force Microscopy (Microscopie à Force Atomique)
AH	Acide hyaluronique
APT	Acide phosphotungstique
BHT	Hydroxytoluène butylé
Bodipy	Bore-dipyrométhene
BSA	Bovine serum albumin
CCM	Chromatographie sur couche mince
CCM 2D	Chromatographie sur couche mince en deux dimensions
Chl	Cholestérol
Cryo MEB	Microscopie Electronique à Balayage à basse température
CS	Chondroïtine Sulfate
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DLPC	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
EDH	Elasto-hydrodynamique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy (Microscopie Electronique à Balayage Environnementale)
FLS	Fibroblast-like synoviocytes
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HD	Hydrodynamique
IGD	Inter Globular Domain (Domaine Inter-Globulaire)

HEMA	Hydroxyéthyl Méthacrylate
5-HETE	5-hydrohy-eicosatétraénoique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance)
LPC	Lysophosphatidylcholine
LT	Lipides totaux
LTB4	Leucotriènes B_4
LS	Liquide synovial
LUV	Large Unilamellar Versicles (Vésicules unilamellaires)
KS	Kératane Sulfate
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MLV	Multilamellar Vesicles (Vésicules multilamellaires)
NBD-PC	1-myristoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine
OA	Osteoarthritis (Arthrose)
PAL	Phosphatase alcaline
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PLA2	Phospholipase A_2
PLT	Phospholipides totaux

POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PS	Phosphatidylsérine
SAP	Surface active protéine
SAPL	Surface active phospholipide
SPH	Sphingomyéline
TG	Triglycérides

TABLE DE MATIERES

Chapitre I. Introduction 23

1.1. Contexte socio-économique 25

1.2. Contexte scientifique 26

1.3. Triplet tribologique articulaire 33
1.3.1. Le mécanisme – le système musculo-ligamentaire 34
1.3.1. Les 1ers corps – le cartilage articulaire 34
1.3.1.1. Les collagènes 35
1.3.1.2. L'agrécanne et autres protéoglycannes 36
1.3.2. Le 3eme corps – le liquide synovial 38
1.3.2.1. Protéines et glycoprotéines 39
1.3.2.2. Acide hyaluronique 41
1.3.2.3. Lipides 42

1.4. Modèle tribologique ex vivo d'une articulation saine 46
1.4.1. Choix du mécanisme modèle 46
1.4.2. Choix des 1ers corps modèle 46
1.4.3. Choix du 3eme corps modèle 48

1.5. Pathologies articulaires 49

Chapitre II. Objectifs et stratégie 55

Chapitre III. Analyse de perturbations pathologiques de la structure du liquide synovial 59

3.1. Prélèvements étudiés 61

3.2. Liquide synovial sain 61

3.3. Liquide synovial pathologique 71

3.4. Liquides synoviaux synthétiques (mimétiques) 74

3.5. Liquides synoviaux reproduits à partir de cultures cellulaires (surnageants) 79

3.6. Discussion et conclusions 83

Chapitre IV. Analyse de perturbations pathologiques de la composition du liquide synovial 85

4.1. Contexte 87
4.1.1. Prélèvements 87
4.1.2. Analyses globales 88
4.1.3. Analyses particuliers pour chaque composant 88
4.1.3.1. Protéines et glycoprotéines 88
4.1.3.2. Acide hyaluronique 90
4.1.3.3. Lipides 91
4.1.3.4. Cristaux 92

4.2. Positionnement par rapport au contexte 94

4.3. Synthèse de résultats 94
4.3.1. Prélèvements 94
4.3.2. Analyse spectroscopique en infrarouge 95
4.3.3. Protéines et glycoprotéines 96
4.3.4. Lipides 98
4.3.5. Marqueurs inflammatoires 103

4.4. Discussion et conclusions 105

Chapitre V. Analyse de perturbations pathologiques du comportement tribologique 109

5.1. Influence de la viscosité dans la lubrification hydrodynamique 111

5.2. Modèle du triplet tribologique pour le régime de lubrification limite 113
5.2.1. Choix des corps en contact (1er corps) 113
5.2.2. Choix du lubrifiant (3eme corps) 114
5.2.3. Choix du mécanisme tribologique - dispositif expérimental 117

5.3. Résultats 122
5.3.1. Liquides synoviaux synthétiques 122
5.3.2. Liquides synoviaux obtenus à partir de cultures cellulaire (surnageants) 133
5.3.3. Prélèvements de liquide synovial sain et pathologique 136

5.4. Discussions et conclusions 139

Chapitre VI. Synthèse et perspectives 141

Annexes

Annexe 1 : Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)/ mode Wet STEM 147

Annexe 2 : Microscopie électronique à transmission (MET) 150

Annexe 3 : Technique de coloration négative pour l'observation MET 152

Annexe 4 : Microscopie Electronique à Balayage à basse température (Cryo MEB) 153

Annexe 5 : La cryofracture 154

Annexe 6 : La microscopie à force atomique (AFM) 156

Annexe 7 : Obtention des liquides synoviaux synthétiques 163

Annexe 8 : Obtention des liquides synoviaux à partir des cultures cellulaires 165

Annexe 9 : Spectroscopie infrarouge 166

Annexe 10 : Dosage de protéines par la Méthode de Bradford 167

Annexe 11 : Détection de la lubricine par la méthode ELISA 169

Annexe 12 : Quantification de différentes classes de phospholipides (PLs), de la composition en acides gras et des marqueurs d'inflammation 170

Annexe 13 : Séparation et quantification des classes de phospholipides en fonction de type de « tête » par une CCM 2D 176

Annexe 14 : Analyse de l'activité de phosphatase alcaline (PAL) 180

Annexe 15 : Calcul du nombre des bicouches qui peuvent être formées par les PLs des interfaces du liquide synovial 181

Annexe 16 : Visco-supplémentation 182

Bibliographie 125

Chapitre I. Introduction

L'articulation synoviale est susceptible de développer différentes pathologies non inflammatoires ou inflammatoires qui prennent une importance grandissante avec le vieillissement de la population, et qui s'avèrent difficiles à traiter du fait de leur détection tardive. Celle-ci est due aux symptômes qui apparaissent très tardivement, par exemple la douleur, principal symptôme de ces maladies, n'est décelée qu'une fois l'endommagement du cartilage arrivé à l'os.

A l'heure actuelle, aucun traitement permettant la réparation du tissu cartilagineux ne semble vraiment efficace. Cela est dû principalement aux difficultés liées à l'identification des causes de ces maladies. Ces difficultés sont liées à la complexité biochimique du liquide synovial qui présente une fonction lubrifiante mais aussi de nutrition des cartilages, et dont l'évolution de ses propriétés mécaniques et physicochimiques au cours des pathologies entraîne la perte des propriétés lubrifiantes. Ainsi, afin d'améliorer l'efficacité des traitements, il est nécessaire de comprendre l'évolution de ces pathologies, en tenant compte de la multitude de facteurs physicochimiques, biochimiques et mécaniques qui génèrent la rupture de l'homéostasie articulaire. Ces facteurs peuvent provenir des éléments composant l'articulation synovial : l'os, le cartilage, le liquide synovial ou le système musculo-ligamentaire. L'étude des interactions entre ces éléments est complexe et nécessite une vue d'ensemble sur les interactions physicochimiques, biochimiques et mécaniques, qui sont présentées dans ce premier chapitre.

1.2.Contexte socio-économique

Les maladies ostéo-articulaires regroupent diverses pathologies qui ont toutes comme point commun d'associer handicap locomoteur et douleurs, et ceci à tous les âges de la vie. L'arthropathie est la plus fréquente des pathologies articulaires affectant les articulations synoviales et le cartilage articulaire. Il existe de nombreux types d'arthropathies mais les plus fréquentes sont l'arthrose sous sa forme dégénérative ou **arthrose (OA)**, et **polyarthrite rhumatoïde (PR),** chacune ayant un facteur déclencheur différent, qui peut être relié soit à un traumatisme articulaire soit à l'attaque immune/auto-immune des cellules inflammatoires dans l'articulation [1].

L'impact de ces maladies en terme de santé publique est majeur : 100 millions en Europe [2,3], dont 6 millions de personnes en France sont touchées par l'arthrose et 1 million souffrent de l'arthrite [4].

En 2030, l'OA pourrait toucher 22% de la population française [3]. Des études démographiques plus récentes ont révélé que cette maladie se retrouve chez 16% des personnes de plus de 55 ans et atteint 70% des plus de 65 ans [5]. Si l'âge est bien un facteur de risque de l'arthrose, elle peut cependant se développer beaucoup plus tôt et mettre de nombreuses années avant de présenter des symptômes cliniques visibles. Ainsi, l'OA ne touche pas seulement les personnes âgées : les études montrent qu'environ 10% de la population des plus de vingt ans a développé de l'arthrose [61], tout en sachant que plus la population vieillit, plus la prévalence de l'OA devrait augmenter.

La PR est la plus fréquente des maladies rhumatismales, chroniques et inflammatoires de l'adulte. En France sa prévalence est située à 0,4% [6]. Sa prévalence dans la population globale est d'environ 0,8 %, avec une nette prédominance chez la femme (3 femmes atteintes pour 1 homme). La cause de cette maladie reste inconnue. On constate que cette maladie peut survenir à tout âge mais plus fréquemment entre 25 et 50 ans.

La tendance des dernières années sur l'augmentation de la durée de vie de la population, fait que ces maladies affectent de plus en plus de personnes, avec un coût conséquent pour le système social d'environ 1,6 milliard d'euros (en 2003) avec une augmentation d'environ 2,5% par an et par patient [3].

1.3.Contexte scientifique

Ayant des propriétés remarquables comme une longévité d'environ 80 années ou la réalisation de mouvements complexes, les articulations synoviales ont commencé à être étudiées dans les années 50. Ces études ont apporté une meilleure compréhension du mécanisme de lubrification des articulations, particulièrement sur le comportement tribologique et les interactions cartilage/liquide synovial. La première hypothèse sur l'efficacité du liquide synovial est que la biolubrification implique la formation d'un film fluide et lubrifiant [10]. Cette théorie considérait le liquide synovial comme un film fluide lubrifiant continu, séparant les cartilages, de sorte que la friction et l'usage des surfaces articulaires soient réduits grâce à une fine lame de liquide lubrifiant d'environ 0,5 µm.

Plusieurs théories sur la lubrification, non forcément liées à la biologie, ont été établies en liaison avec la courbe de Stribeck (1902), courbe expérimentale qui met en évidence la variation d'un coefficient de frottement en fonction de l'épaisseur du film lubrifiant. Cette courbe (figure 1) permet de représenter les tendances d'évolution du coefficient de frottement global en fonction de la sévérité des conditions de chargement et d'épaisseur du contact.

Sur cette courbe on distingue différents régimes de lubrification. Ainsi, quand l'épaisseur du film est très faible le régime est plutôt limité, mais dès que l'épaisseur augmente on peut avoir un régime mixte avec un film lubrifiant non-continu, du fait des rugosités de la couche moléculaire en contact. Si la sévérité du contact augmente, le nombre de rugosités en régime limité augmente avec le coefficient de frottement. Lorsque l'épaisseur du film lubrifiant-continu est de l'ordre de grandeur de celle de la déformation des corps en contact, la lubrification est de type élasto-hydrodynamique (EHD). Quand l'épaisseur du film est plus grande que celle de la déformation des corps en contact, la lubrification est de type hydrodynamique (HD). Le coefficient de frottement croît en fonction de l'épaisseur du film et décroît en fonction de la sévérité. Dans ces régimes de lubrification, l'épaisseur du film lubrifiant est telle, qu'un équilibre entre efforts appliqués et portance hydrodynamique apparait. Cette portance hydrodynamique est une fonction croissante de la viscosité du lubrifiant et de la vitesse tangentielle, et une fonction décroissante de la vitesse normale.

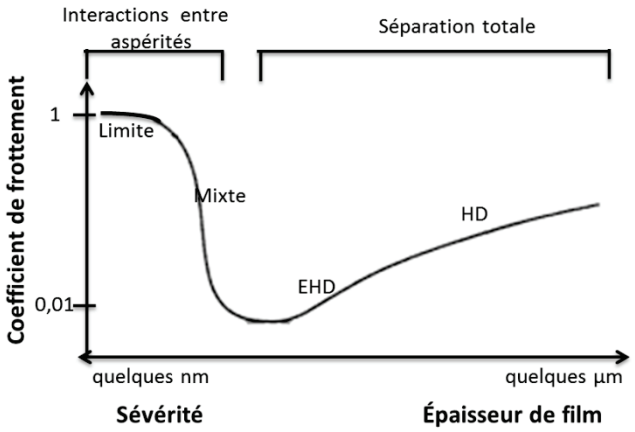


Figure 1.Courbe de Stribeck

Ces régimes de lubrification ont été transposés du côté biologique (articulations) et ont été corrélés avec les différentes phases du cycle de marche (figure 2) :

- la première phase du cycle de marche correspond au moment où le contact articulaire est soumis à charge (vitesse normale) très forte avec des vitesses tangentielles très faibles. La théorie prédit alors une portance hydrodynamique significative, liée à un effet de pressurisation qui favorise une lubrification de type **« squeeze »** [11, 12]. Cet effet d'écrasement peut être amplifié par une lubrification de type **« boosted»** [16]. Cette dernière phase suppose en plus d'une variation de vitesse normale une entrée de petites molécules de lubrifiant (eau + ions) dans la couche surfacique du cartilage sous l'effet du choc articulaire, ce qui augmente la viscosité du lubrifiant et augmente aussi l'effet de squeeze ;
- la deuxième phase du cycle de marche correspond à des vitesses tangentielles plus élevées qui favorisent le régime de type **EDH**. La déformation des cartilages est significative, et bénéfique vis-à-vis de l'épaisseur du film, qui reste néanmoins relativement faible (quelques centaines de nanomètres), du même ordre de grandeur que la déformation du cartilage articulaire [13, 14] ;
- la troisième phase de marche correspond au moment où la charge commence à être transférée sur l'articulation de l'autre membre. La charge et la vitesse tangentielle sont faibles, ce qui donne un mécanisme d'alimentation du film par un effet d'exsudation du cartilage, lié à sa nature poroélastique, favorisant une lubrification de type «**weeping**» [15] ;
- la quatrième phase de marche correspond au moment où la charge est presque nulle et les vitesses tangentielles importantes. Dans ce cas, la déformation des cartilages est non-significative. La portance hydrodynamique induit une épaisseur de film élevée (quelques micromètres), donc régime de lubrification de type **HD** [9, 10].

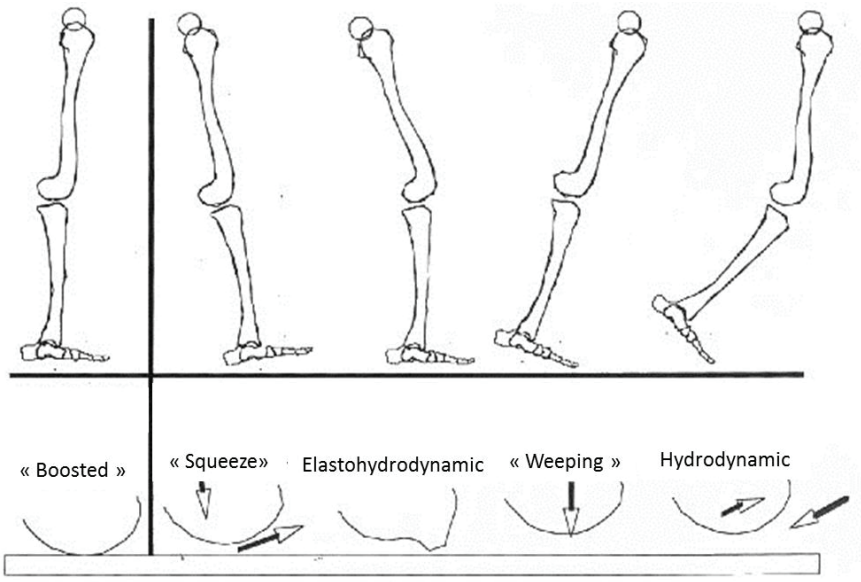


Figure 2. Corrélation entre les différentes phases du cycle de la marche et les types de lubrification [7, 8]

Les régimes de lubrification hydrodynamique sont caractérisés par des modèles théoriques. Ces modèles théoriques sont basés sur l'équation de type Reynolds [151] décrivant l'écoulement du film lubrifiant, éventuellement couplée à un modèle mécanique de déformation des corps en contact. Ceci permet d'estimer l'épaisseur du film synovial, et la répartition de la pression pour une loi de **viscosité** donnée. Ainsi, plusieurs études (la plus complète étant celle de Mazzucco) ont permis de caractériser la viscosité de liquide synovial dans un cas sain et un cas pathologique. Ces études montrent une baisse de la viscosité de 10 - 24 Pa*s pour le liquide synovial sain, à 0,1 - 1 Pa*s pour le cas de pathologies non-inflammatoires (arthrose) et jusqu'à 0,01 – 0,1 Pa*s pour le cas des pathologies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde) [101]. Mais ces études de viscosité ont été faites sans tenir compte des interfaces moléculaires biologiques entre cartilage et liquide synovial qui, comme on le verra dans cette thèse, peuvent détruire les assemblages moléculaires du liquide synovial, entrainant ainsi une modification des propriétés rhéologiques. Par conséquence, la vraie rhéologie du liquide synovial dans son environnement biologique n'est pas encore connue.

D'autre part, les modèles de lubrification présentés ci-dessus ne tiennent pas compte de la rugosité importante des cartilages articulaires (1 – 6 μm) qui peut influencer fortement les conditions hydrodynamiques. Quand le mécanisme tribologique est caractérisé par de fortes pressions locales et de très faibles vitesses relatives, conditions qui ne permettent pas de former une épaisseur de film continu supérieure à 100 nm, on a un **régime de lubrification limite** [17,18,19].

La caractéristique de ce régime est l'invariance du coefficient de frottement par rapport à la vitesse et la pression. Dans ce cas-là, le frottement va être accommodé dans les couches moléculaires adsorbées sur les surfaces du cartilage articulaire. Ce régime *pose plus de problèmes d'usure au niveau articulaire*, mais plusieurs études ont montré que les articulations synoviales, même dans ce régime, peuvent garder des coefficients de frottement très faibles de 0,0005 à 0,04 [20,21,22,23].

Ainsi dans ce régime, les couches moléculaires absorbées sur les surfaces frottantes sont très importantes. Pour identifier quel serait le composant moléculaire du liquide synovial qui peut intervenir dans la lubrification limite, des expériences ont été faites en extrayant la couche moléculaire de la surface du cartilage articulaire. Au moins deux candidats sont considérés comme jouant un rôle majeur dans le mécanisme de lubrification du cartilage articulaire: la protéine **SAP** (surface active protéine) [24,25,26,27] et le phospholipide **SAPL** (surface active phospholipide). Ces appellations « actives » sont utilisées pour mettre en évidence les propriétés remarquables de lubrification des phospholipides et des protéines, expliquant les faibles coefficients de frottement obtenus dans la biolubrification.

Les SAPs et SAPLs extraits de la matrice extracellulaire de surface du cartilage articulaire ont été testés ensemble et c'est cette combinaison, nommée « **lubricine** », qui est capable de maintenir un coefficient de frottement très bas dans la lubrification limite [28,29]. Les rôles

tribologiques de ces molécules sont encore discutés. A partir de ces découvertes, deux théories de lubrification limite ont été développées : une partante de SAP et l'autre de SAPL.

En ce qui concerne SAP, Klein et al. (2010) pensent que la protection et la lubrification limite des surfaces biologiques sont dues à un mécanisme ressemblant à celui observé pour le cas des brosses moléculaires, constituées de polyélectrolytes chargées dans un milieu aqueux et qui sont entourées par une couche de molécules d'eau liées aux groupes polaires chargés [140]. Ces molécules ont permis d'obtenir des coefficients de frottement de ~0,005 dans certaines conditions expérimentales, obtenues sur des simulateurs de type SFA à des faibles temps de frottement (quelques minutes) et pressions d'ordre MPa [141]. Mais le coefficient de frottement à basse pression mesuré aussi par SFA entre la lubricine (polyélectrolyte biologique naturel) adsorbée sur des surfaces hydrophiles ou hydrophobes (par Israelachvili et al. (2007)), était plus élevé (0,02-0,04), arrivant jusqu'à 0,2 quand la pression a été supérieure à 0,6 MPa [142]. Cette différence pourrait être due à la très grande densité surfacique et donc par la plus grande compacité de type brosse, de polymère pour les polyélectrolytes synthétiques testés par Klein et al par rapport aux polyélectrolytes biologiques testées pas Israelaschvili.

Ainsi, les faibles concentrations de polyélectrolytes (250 µg/ml dans 1,1 ml de liquide synovial [142]) et la grandeur des surfaces frottantes biologiques (~ 121 cm^2 [143]) pour l'articulation du genou, suggèrent que la conformation moléculaire ne permet pas de former des brosses denses adhérentes en surface. Donc, les faibles coefficients de frottement pour le modèle in vivo ne semblent pas être expliqués par la lubrification limitée des polyélectrolytes.

Des études récentes couplant un substitut de la lubricine (mucine) à des leviers AFM, indiquent des probabilités d'adhésion avec des bicouches lipidiques entre 56,5% et 82,9 % [56]. D'après ces résultats qui montrent une très forte affinité entre la lubricine et les bicouches lipidiques et les études sur l'intéraction de la lubricine avec les molécules constituant la matrice du cartilage articulaire et la faible concentration dans le liquide synovial, il est possible que la lubricine s'étende sur la surface frottante du cartilage au lieu de former des brosses de polyélectrolytes. Cette localisation peut lui donner un rôle d'accrochage et de protection pour les bicouches SAPLs qui se trouvent à l'interface cartilage/liquide synovial.

Concernant la lubrification SAPL, la capacité de lubrification limite des différents constituants du liquide synovial, y compris des SAPLs a été soulignée par d'autres études récentes [144, 145]. Les recherches de Hills [51] suggèrent que les SAPLs sont l'ingrédient essentiel de la lubrification limite des articulations, les SAPLs formeraient une interface entre la surface articulaire et le volume de liquide synovial grâce à leur capacité d'auto-assemblage en bicouches. Donc, la lubrification limite, lorsque les surfaces articulaires devraient normalement être « en contact », est assurée par cette interface constituée de multicouches lipidiques.

Hills et al. ont mis en évidence l'existence d'**interfaces lipidiques sur la surface du cartilage articulaire**, formées par un empilement de bicouches lipidiques entre lesquelles se trouve du sérum physiologique (figure 3) [35].

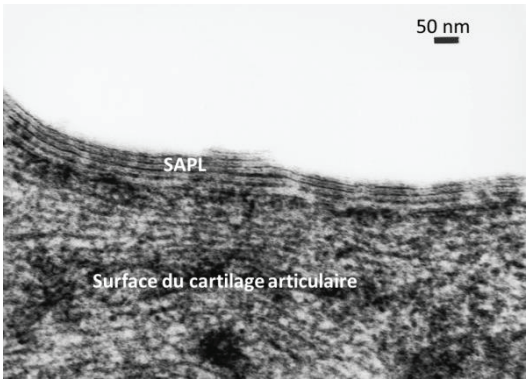


Figure 3. Surface active phospholipides (SAPLs) sur la surface du cartilage articulaire [35]

Dans ce contexte, le premier objectif de la présente thèse a été d'étudier le rôle des interfaces SAPLs dans la biolubrification articulaire limite.

D'autre part les études et les théories de lubrification hydrodynamique se basant sur une structure du film lubrifiant continu, ont été remises en doute depuis les années 2000, puisque de nouvelles études ont montré la présence de **discontinuités** dans le film lubrifiant**,** à l'échelle de l'épaisseur de film donné par la théorie de lubrification (0,5 - 1 μm).

L'existence de vésicules micrométriques a été constatée **dans le volume de liquide synovial** de rat (figure 4) [30], ce qui suggère la **répartition discontinue du liquide synovial au niveau du contact articulaire.** Ces discontinuités sont plus grandes que l'épaisseur du film lubrifiant, estimée avec les modèles hydrodynamiques [31]. L'origine de ces discontinuités est en liaison avec la composition moléculaire du liquide synovial qui peut former des auto-assemblages.

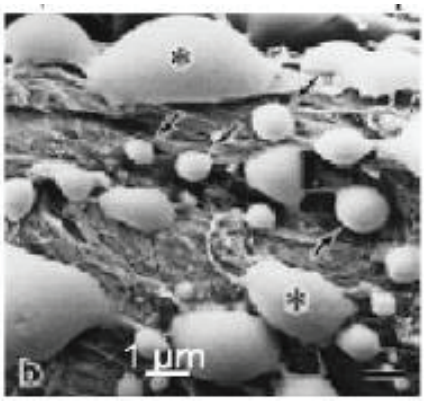


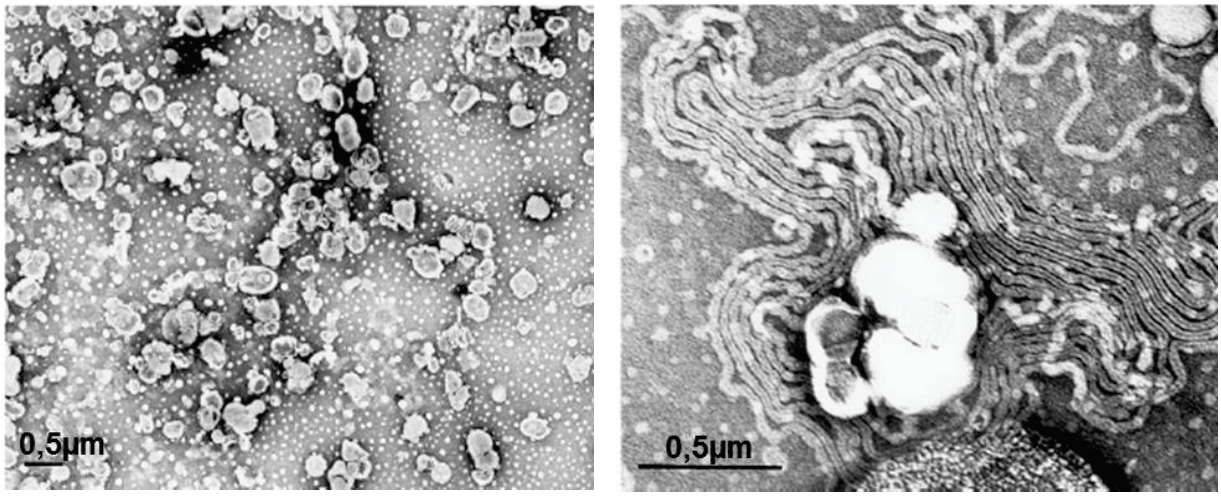
Figure 4. Structures vésiculaires présentes dans le liquide synovial [30]

Les études physicochimiques ont mis en évidence la formation d'auto-assemblages entre **l'acide hyaluronique (AH) et les SAPLs** [32]. Ces études montrent que le rajout d'acide hyaluronique dans une suspension aqueuse de vésicules lipidiques, génère la formation d'auto-assemblages lipidiques dont la structure dépend du poids moléculaire de l'acide hyaluronique.

Ainsi, ces vésicules lipidiques peuvent modifier leur structure en présence de l'AH dans:

- des vésicules unilamellaires de quelques centaines de nm (figure 5A) lorsque la masse moléculaire d'AH est petite ;
- des multicouches lipidiques (figure 5B) et des structures tubulaires de quelques µm en longueur, remplies d'AH si on rajoute d'AH de grand poids moléculaire (concentration équivalente à la concentration de la synovie).

En fonction des dimensions des vésicules, le comportement rhéologique de l'AH est modifié. Ainsi, si on a des petits vésicules qui sont inclus dans l'AH (figure 5A), on obtient un comportement fluidifiant et si l'AH est inclus dans ces vésicules (figure 5B), on obtient un comportement viscosifiant de cette macromolécule [33].



A B

Figure 5. Discontinuités formées par la mise en contact d'une suspension aqueuse de vésicules lipidiques et d'acide hyaluronique [32]

De plus, les protéines de type albumine et globulines du liquide synovial peuvent réagir aussi **avec l'AH** formant une structure de gel qui est créée par la dissolution de molécules d'AH et d'albumine dans le sérum physiologique. Cette structure est renforcée par des réticulations entre les chaînes moléculaires d'AH et les molécules d'albumine. Des études rhéologiques récentes montrent que ces réticulations augmentent la viscosité du gel et son caractère élastique [34]. Elles peuvent également réagir avec la surface de frottement changeant le mécanisme de lubrification.

En conclusion, la structure discontinue du liquide synovial fait apparaître deux structures : une structure multicouche et une structure en gel. La structure multicouche est liée à l'auto-association des lipides dans le sérum physiologique. Elle est non-miscible avec le gel composé d'acide hyaluronique et de protéines (nommé par la suite gel glycoprotéique).

Dans ce contexte, le deuxième objectif de cette thèse est d'étudier comment les deux composants (multicouches lipidiques, et gel glycoprotéique) non miscibles du liquide synovial coexistent dans le film lubrifiant et quelle structure en découle, comment ils réagissent afin d'obtenir des performances tribologiques dans le cas sain et comment cette interaction est perturbée dans le cas pathologique.

Comme nous l'avons vu, cette thèse vise donc à étudier d'une part le rôle des interfaces lipidiques entre liquide synovial et cartilage, et d'autre part le rôle des interactions entre les multicouches lipidiques et le gel glycoprotéique en volume du liquide synovial dans les conditions de contacts articulaires sains et pathologiques.

Pour ce faire, la résolution avec des moyens *in vivo* étant insuffisante, la stratégie de cette thèse vise à reproduire *ex vivo* : les interactions entre les corps en contact (les cartilages) avec une structure poroélastique, le lubrifiant (le liquide synovial) avec une structure discontinue, et un mécanisme qui impose différentes vitesses et pressions. Dans ce contexte, pour étudier le fonctionnement tribologique des assemblages moléculaires actifs en biolubrification, il est nécessaire de réaliser des expériences *ex vivo*. Afin de reproduire la réalité biologique, on reproduit les spécificités du fonctionnement articulaire à l'aide d'un modèle tribologique *ex vivo*.

1.4.Triplet tribologique articulaire

L'articulation synoviale (figure 6) est une entité aux composants interdépendants, comprenant deux extrémités osseuses qui sont liées par une capsule et des ligaments. La surface interne de la capsule articulaire est couverte par la membrane synoviale et les faces osseuses le sont par le cartilage articulaire. La cavité articulaire est remplie de liquide synovial (LS). Les surfaces articulaires (faciès articulaires) sont revêtues du cartilage articulaire de type hyalin. La plupart des terminaisons nerveuses se situent dans le stratum fibreux qui est irrigué par des vaisseaux sanguins. Le stratum synovial, aussi appelé membrane synoviale ou simplement « la synoviale », complète la capsule articulaire.
L'articulation synoviale humaine saine est considérée comme un tribosystème très performant qui a pour fonction d'assurer le minimum d'usure au niveau du contact [36] et du point de vue biomécanique, elle représente un système vivant complexe. Elle assure un mouvement, caractérisé par un faible coefficient de frottement entre les segments articulaires, tout en préservant la transmission de charges relativement élevées à ce niveau.
Pour comprendre ces performances exceptionnelles du milieu vivant et faire une analyse réaliste du fonctionnement articulaire il faut prendre en compte l'ensemble du triplet tribologique qui se compose :
• du mécanisme qui impose les sollicitations locales ;
• des premiers corps qui bordent le contact ;
• du troisième corps qui sépare les premiers corps.
La figure 6 illustre les éléments du triplet tribologique à partir d'une articulation synoviale:

- Le **mécanisme** est représenté par le système musculo-ligamentaire, qui impose les sollicitations globales qui se traduisent au niveau local par une pression de contact et une vitesse relative des corps en contact
- Les **1ers corps** constitués du cartilage articulaire qui forme les surfaces en contact
- Le **3eme corps**, représente le liquide synovial, qui sépare les 1ers corps et assure la lubrification

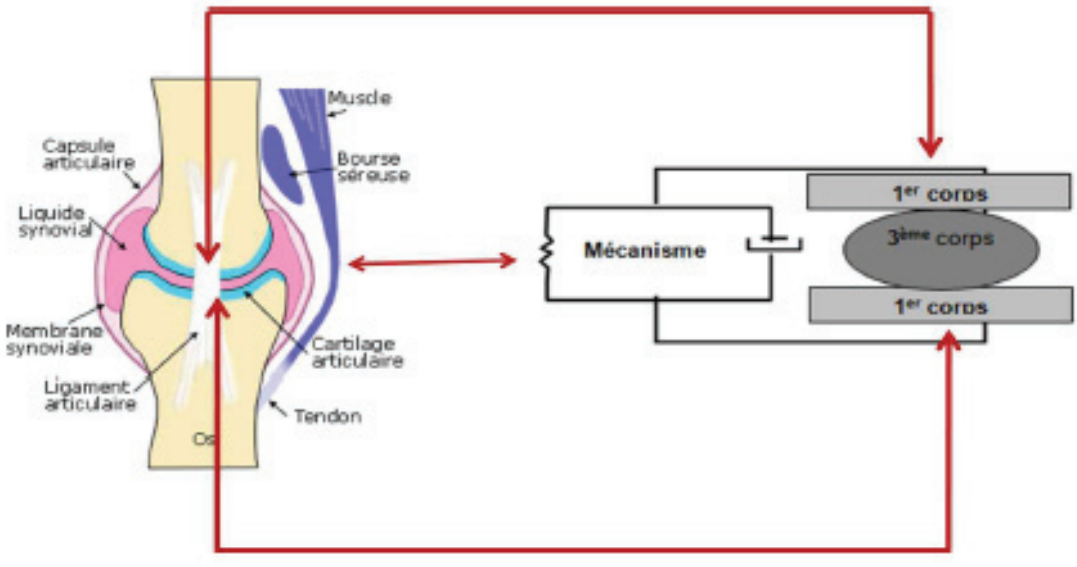


Figure 6. Schéma d'une articulation synoviale et les éléments du triplet tribologique

1.4.1. Le mécanisme – le système musculo-ligamentaire

Le système musculo-ligamentaire met en mouvement les 1ers corps du contact articulaire, grâce à la génération de la commande de mouvement par le système neuromusculaire et la réalisation effective du mouvement par le système musculo-ligamentaire (figure 7) [8].

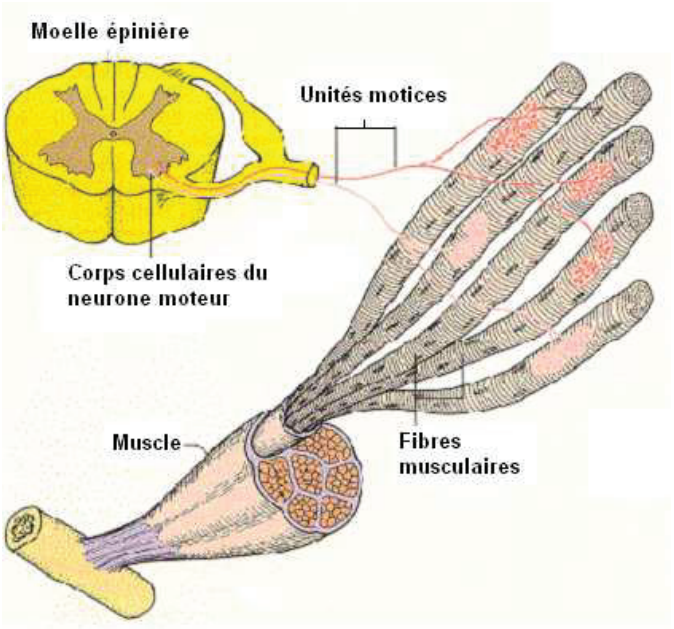


Figure 7. Mécanisme — unité neuromusculaire à l'échelle microscopique [8]

Bien que la structure macroscopique du mécanisme et les sollicitations globales puissent être très différentes d'une articulation à l'autre, les compensations biologiques telles que la conformité géométrique des surfaces articulaires et le rétrocontrôle nerveux, font que les conditions locales de fonctionnement tribologique sont pratiquement les mêmes pour toutes les articulations. Ainsi, les études qui exploitent la dynamique inverse pour calculer les efforts musculaires et d'impact transmis à l'articulation au cours de la marche obtiennent des résultats de pressions de contact articulaire comprises entre 10^5 et 10^6 Pa et des vitesses relatives comprises entre 0 et 8.10^{-2} m/s [8].

1.4.2. Les 1ers corps – le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est le tissu qui recouvre la surface des os des articulations de type diarthrose. Sa fonction principale est d'assurer le glissement entre les extrémités osseuses avec un coefficient de frottement très bas et de prévenir les phénomènes d'usure caractéristiques pour les cas pathologiques de type arthroses. C'est un tissu conjonctif spécialisé et adapté pour supporter des forces de compression et de tension importantes. Une grande partie des charges auxquelles le cartilage est soumis est transmise et absorbée par l'os sous-chondral. L'organisation structurale de la matrice cartilagineuse permet de mieux saisir ses compétences biomécaniques [37].

Le cartilage articulaire (figure 8A) est un tissu avasculaire et non-innervé et l'existence d'apports nutritifs se fait par les vaisseaux situés dans l'os souschondral au niveau de la zone cartilagineuse profonde calcifiée (6 - 8 % du cartilage). Le cartilage calcifié en dessous de la « tidemark » (figure 8A) sert à ancrer le cartilage articulaire à l'os souschondral, tandis que la zone superficielle (I), sert à résister aux forces de traction et la zone intermédiaire (II) à absorber les chocs.

De type hyalin, il est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) et de chondrocytes (10 % du volume tissulaire) (figure 8B). Les chondrocytes sont les seules cellules du cartilage et sont répartis en densité cellulaire variable en fonction de la profondeur du cartilage, avec des différences d'un individu à un autre.

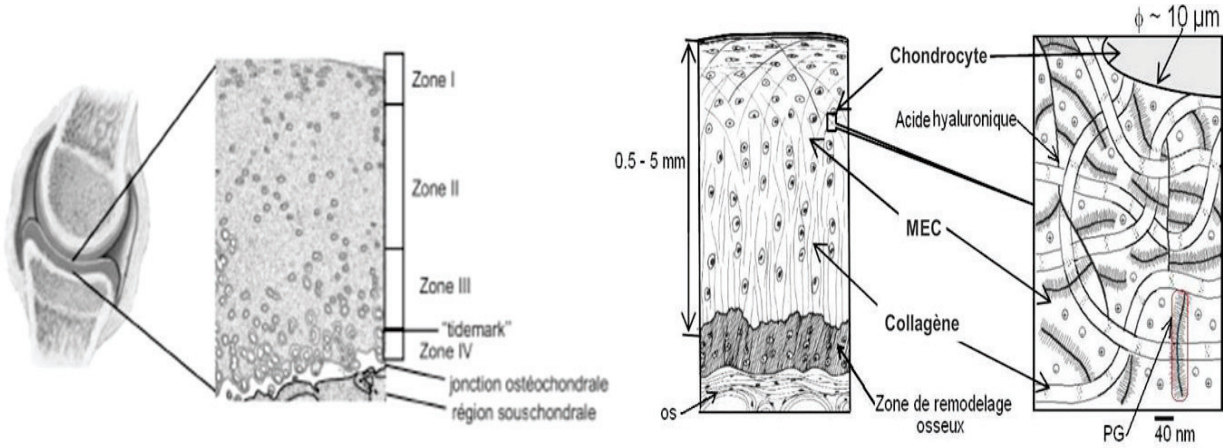


Figure 8. Les différentes zones du cartilage (A) : zone 1 – zone tangentielle, zone 2 – zone de transition, zone 3- zone radiale, zone 4 – zone calcifiée constituant la structure du cartilage articulaire (B) [65]

La MEC est principalement composé d'eau (70-80 %) et de macromolécules (20-40 %). Les collagènes représentent environ 50-60 %, les glycoprotéines 15-20 % et les protéoglycannes 30-35 % du poids sec. D'autres éléments tels que sels, protéines non-collagéniques et lipides sont aussi présents, mais en plus petites quantités [38].

1.4.2.1.Les collagènes

Les principaux collagènes du cartilage articulaire est le type II (fibrillaire, 80-85 %) et les collagènes IX et XI représentent 15 % des collagènes [38,40].

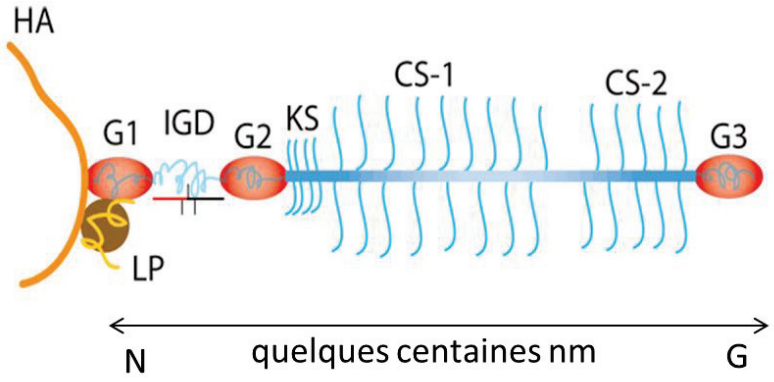
Une fibre de collagène II se compose de trois chaînes polypeptidiques de procollagène α identiques. Ces précurseurs sont sécrétés dans la matrice extracellulaire, où les parties non hélicoïdales sont enlevées et les fibres de collagène se constituent. Les fibres de collagène II sont responsables de la résistance du cartilage aux forces de tension. Elles forment des arcades et sont orientées parallèlement à la surface cartilagineuse et perpendiculairement par rapport à

l'os souschondral en profondeur. Le rôle des Coll. IX et Coll. XI n'est pas encore tout à fait élucidé, mais ils contribueraient à la formation et à la stabilité du réseau collagénique.

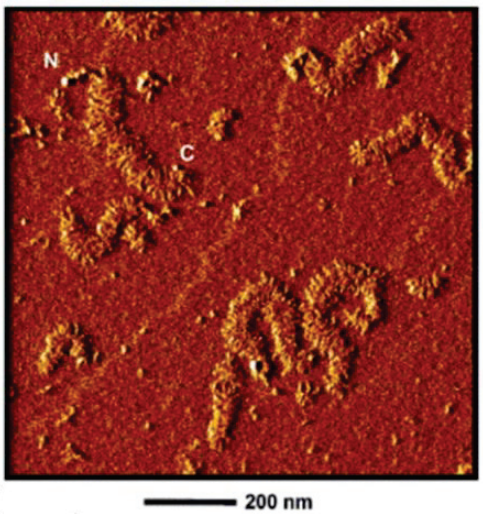
1.4.2.2.L'agrécanne et autres protéoglycannes

L'autre élément majeur de la matrice du cartilage est l'aggrécane, protéoglycanne d'un poids moléculaire élevé. D'un point de vue moléculaire, les protéoglycannes sont constitués d'une charpente centrale protéique à laquelle viennent se lier de glycoaminoglycannes (GAG), longues chaînes composées d'unités répétitives de disaccharides et d'oligosaccharides. Ces unités sont constituées d'une hexosamine (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) et d'un acide uronique (acide glucuronique, iduronique ou de galactose).

La chondroïtine sulfate et le kératane sulfate sont les deux GAG retrouvés au sein de l'agrécanne.



A



B

Figure 9. Représentation schématique (A) [41] et image obtenue par microscopie à force atomique (B) [155] de l'agrécanne

La protéine centrale de l'agrécanne (figure 9A) présente trois domaines globulaires (G1, G2, et G3), deux parties terminales (figure 9B) et trois domaines étendus :

- Domaine Inter-Globulaire, entre G1 et G2: IGD,
- Kératane Sulfate: KS
- Chondroïtine Sulfate: CS
-

La partie N-terminale de la protéine centrale est composée de 2 domaines globulaires nommés G1 et G2, qui sont séparés par une région interglobulaire (domaine IG). Le domaine G1 présente 3 boucles: une impliquée dans les interactions avec une protéine de liaison alors que les autres interagissent avec la molécule d'acide hyaluronique (AH). Le domaine G2, région moléculaire unique à l'agrécanne, présente 2 boucles présentant 67 % d'homologie avec les boucles de G1 qui interagissent avec l'AH [41,42].

La partie C-terminale du domaine G2 est suivie d'une zone centrale à laquelle viennent s'attacher des GAG, le kératane sulfate (domaine KS) et le chondroïtine sulfate (domaine CS, le plus grand domaine de l'agrécanne, séparées en sous-domaines CS-1 et CS-2); la protéine se termine par un troisième domaine globulaire G3 [41,43].

Les 3 domaines globulaires présentent des séquences peptidiques hautement conservées à travers les espèces alors que les domaines étendus sont plus variables.

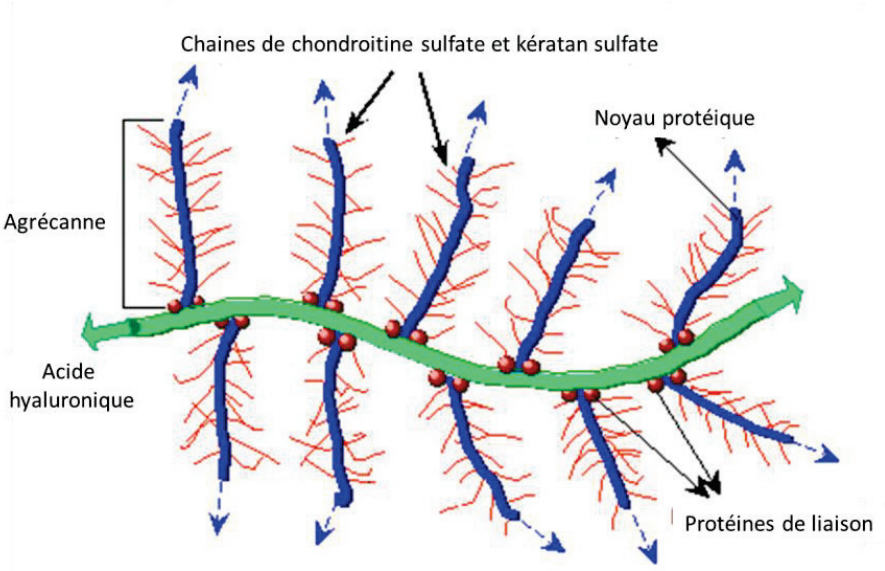


Figure 10. Agrégat d'agrécanne (extrait du cartilage) (modifié d'après [50])

De nombreux monomères d'agrécannes sont liés de façon non-covalente à une très longue chaîne d'acide hyaluronique par le biais de la protéine de liaison pour former un agrégat de très haut poids moléculaire pouvant compter jusqu'à 300 monomères liés à une seule molécule d'acide hyaluronique (figure 10) [44, 45].

L'agrécanne et l'eau constituent la substance fondamentale, gel hydraté composé de 75% d'eau. Les mouvements de l'eau au sein du cartilage se font sous l'influence des différences

dans les pressions osmotiques qui existent entre le cartilage et le liquide synovial. Ce phénomène survient grâce aux charges négatives portées par les GAG de l'agrécanne qui attirent des ions cationiques tels que les Na+.

Le réseau tridimensionnel de collagène fournit à la structure une armature solide qui permet de résister à l'expansion de l'hydratation des protéoglycannes. Ainsi, à l'équilibre, la pression osmotique est égale à la pression de tension du collagène. C'est l'équilibre entre la pression osmotique due aux protéoglycannes et la tension des fibres de collagène qui assure les propriétés de compressibilité et d'élasticité caractéristiques du cartilage, d'absorption et de redistribution des forces ainsi que de leur transmission à l'os sous-chondral. Lorsqu'une pression mécanique est effectuée sur le cartilage articulaire, les molécules d'eau sont évacuées dans des régions de la matrice qui n'est pas sous pression. Par conséquent lorsque les charges ne sont plus là, les protéoglycannes refixent l'eau jusqu'à atteindre un nouvel équilibre entre les pressions au sein du cartilage [46].

1.4.3. Le 3eme corps – le liquide synovial

Le liquide synovial est le liquide présent dans l'espace articulaire, délimité par la capsule articulaire. Ses principales fonctions sont la lubrification afin de réduire la friction (et donc l'usure) entre les surfaces articulaires essentielles lors des mouvements, l'apport de nutriments au cartilage, le drainage des déchets métaboliques et la défense immunitaire [47]. Il est généré par l'action commune des cellules synoviales (synoviocytes de types B présents dans la structure de la membrane synoviale) et des échanges plasmatiques [48]. Il correspond ainsi à un dialysat du plasma sanguin (formé sous l'effet des pressions hydrostatiques et osmotiques) auquel viendra s'ajouter une production locale d'acide hyaluronique et de lubricine.

Une partie de la microvascularisation retrouvée dans la membrane synoviale est spécialisée et, ajoutée à la pression osmotique exercée par l'acide hyaluronique, permet le passage rapide de l'eau et de solutés de faible poids moléculaire tels que les électrolytes, le glucose, les acides aminés et les protéines. Les concentrations des électrolytes et des petites molécules sont équivalentes à celles retrouvées dans le plasma, mais les sucres, les lipides et les grosses protéines telles que l'albumine sont présents en plus faibles concentrations. À cela viennent s'ajouter l'acide hyaluronique et la lubricine sécrétées par les synoviocytes, qui apporteront les propriétés lubrifiantes du liquide synovial et lui confèreront sa consistance visqueuse. [47,48].

Pour résumer, les principaux composants du liquide synovial sain [7] sont :

- Les protéines (environ 20 mg/ml) et glycoprotéines (environ 0.02 mg/ml) ;
- L'acide hyaluronique (environ 3 mg/ml) ;
- Les lipides (environ 3 mg/ml).

1.3.3.1.Protéines et glycoprotéines

On trouve dans le liquide synovial sain des protéines de faible poids moléculaire qui sont filtrées depuis le plasma sanguin au travers de la membrane synoviale. Etant donné la faible perméabilité de cette membrane aux macromolécules, la concentration en protéines du liquide synovial est largement inférieure à celle du plasma [49].

Les principales protéines sériques du liquide synovial sont les albumines avec un volume d'environ 4 x 4 x 14 nm et les γ-globulines avec un volume de 10 x 7 x 2 nm (figure 11 A et B). L'albumine a une structure globulaire (figure 11C) (17 ponts disulfure S-S) d'une taille relativement faible: 564 AA, pour une masse moléculaire de 66kDa. L'unité de base d'une γ-globuline comprend 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères identiques. Cet édifice moléculaire présente une masse d'environ 150 Kda. Au microscope électronique, ces Ig se présentent sous la forme d'un Y (figure 11D), symétrique, avec un axe de symétrie entre les 2 chaînes lourdes.

Dans les organismes vivants, les protéines sériques ont pour rôle principal de véhiculer les substances nutritives (albumines ou immunitaires (globulines) (rôle biologique) et d'équilibrer les pressions osmotiques extracellulaires et intracellulaires (albumines) (rôle physico-chimique), permettant ainsi le maintien des cellules et des tissus. [7]
Les albumines jouent également un rôle en bio-lubrification et contribuent à l'augmentation de la viscosité de la synovie en formant des réticulations entre les chaînes moléculaires de l'acide hyaluronique [52]. Les globulines précipitent les lipides et permettent une protection contre l'usure. [53]

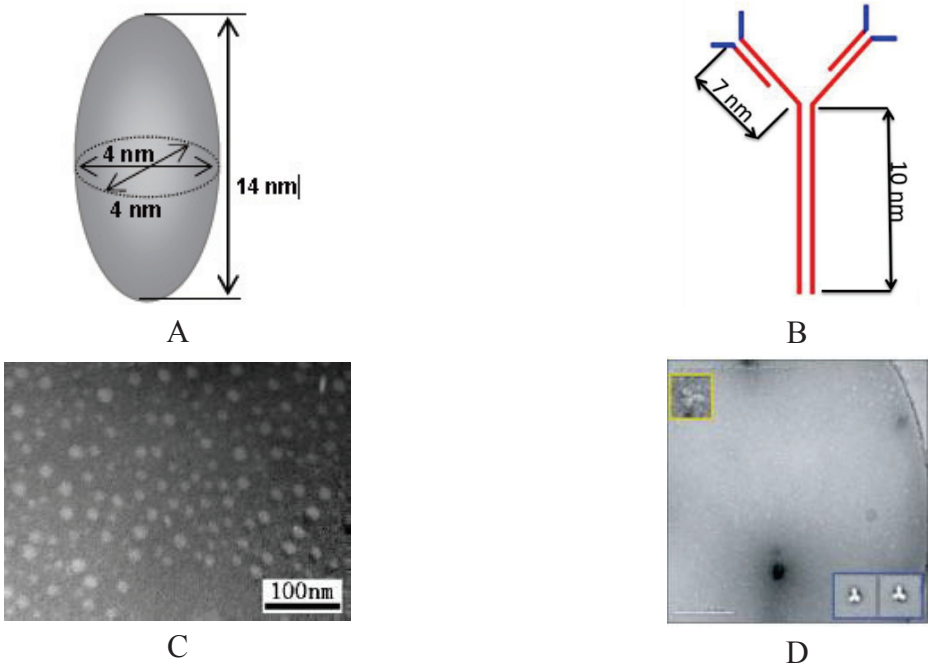


Figure 11. Schémas illustrant une molécule d'albumine(A) et une molécule de γ-globuline(B) ; Images obtenues en microscopie électronique illustrant respectivement les structures des albumines (C) [153] et des γ-globulines (D) [154] en microscopie électronique à transmission.

La **lubricine** est sécrétée par les synoviocytes fibroblastiques et les chondrocytes. Elle est une glycoprotéine présente sur les surfaces du cartilage articulaire et de la membrane synoviale.

Elle est le produit du gène proteoglycan 4 exprimé par les synoviocytes et les Images obtenues en microscopie électronique (figure 12B) montrent qu'elle présente une structure en forme de tige, d'une longueur d'environ 200 nm et d'une largeur entre 1 et 2 nm.

Au niveau de sa structure chimique il y a de multiples sites de liaisons O-glycosidiques, et un seul site d'ancrage pour une chaine de chondroitine sulfate (CS) (figure 12 A). Cette structure se compose:

- d'un domaine vitronectine lui conférant un rôle d'adhésif moléculaire, capable de se lier aussi bien aux fibres de collagène, qu'au gel du cartilage et aux couches lipidiques de la synovie [54]
- d'un domaine hemopexine qui confère à la lubricine le rôle d'anti-oxydant lipidique et des protéines de liaisons [55]
- d'un domaine mucine dans lequel l'abondance de sucres chargés négativement induit une force d'hydratation répulsive qui permettrait à la protéine de jouer un rôle dans la lubrification [56]

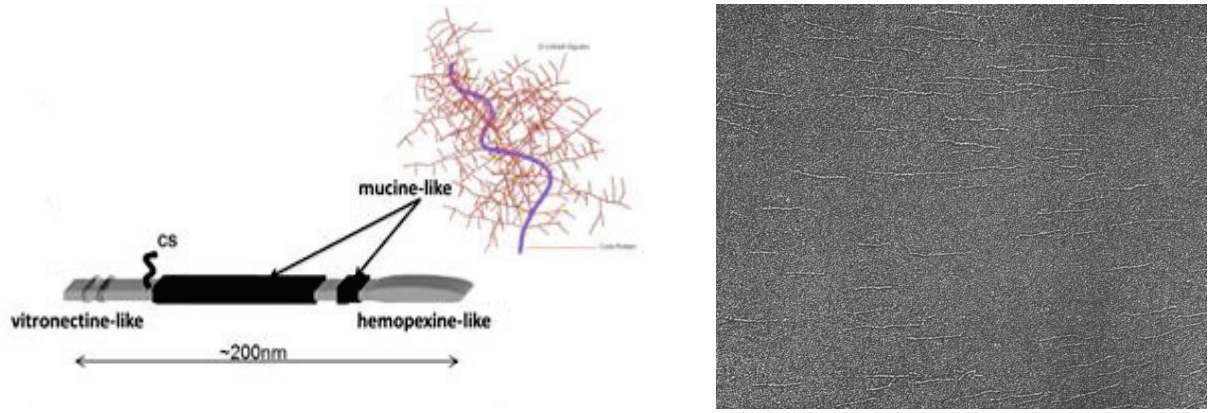
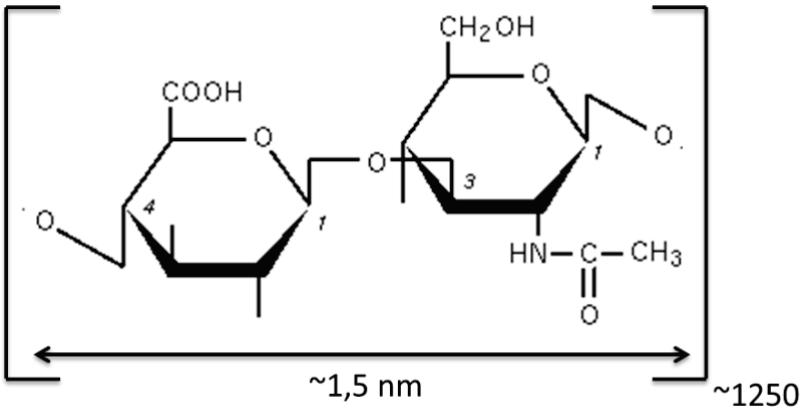


Figure 12. Schéma de la structure (A) [adapté de 57] et image obtenu en microscopie électronique à transmission de la lubricine (grossissement x61000) [156]

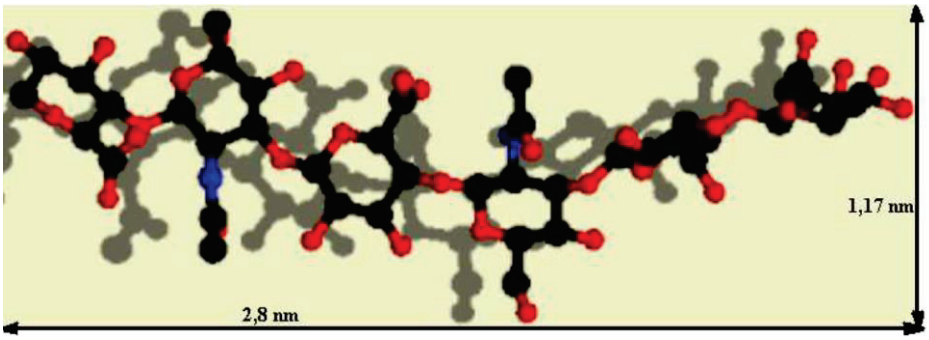
La lubricine est aujourd'hui reconnue comme étant un protecteur articulaire majeur, empêchant l'usure du cartilage, la prolifération et l'adhésion des cellules synoviales.

1.3.3.3.Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) est un mucopolysaccharide de haut poids moléculaire composé d'une longue chaîne disaccharidique : acide glycuronique et N-acétylglucosamine, en tandem et difficile à visualiser en microscopie. Le polysaccharide est présent dans le liquide synovial tout comme l'hyaluronate de sodium. (Figure 13)



A



B

Figure 13. Structure chimique (A) et dimensions d'une unité d'acide hyaluronique (B) [59]

Ses propriétés chimiques ou physiques dépendent directement de son poids moléculaire qui peut être variable et de sa concentration dans le liquide synovial, lui conférant plusieurs propriétés:

- viscoélastiques du liquide synovial : l'acide hyaluronique forme avec l'eau un gel déformable qui devient élastique si les forces de cisaillement appliquées sont plus fortes. Il joue donc un rôle de lubrification et d'absorption des chocs. En cas d'arthrose, la concentration d'acide hyaluronique dans le liquide synovial diminue et son poids moléculaire est plus faible, entrainant une diminution de sa viscosité. Une partie de ces modifications est imputable à la dépolymérisation des longues chaînes polysaccharidiques par des radicaux libres produits par les leucocytes et à l'épanchement articulaire qui diminue la concentration d'acide hyaluronique. La

« viscosupplémentation » qui est utilisée comme traitement contre l'arthrose consiste à injecter dans la cavité articulaire de l'acide hyaluronique à haut poids moléculaire [60].

- antalgiques et anti-inflammatoires : l'acide hyaluronique inhibe la production des prostaglandines E2 dans le liquide synovial humain et régule de nombreuses activités cellulaires dont la migration des polynucléaires, des neutrophiles et des lymphocytes ainsi que l'inhibition de la phagocytose par les macrophages. Il diminue également la production de radicaux libres dans le liquide synovial [58].
- chondroprotectrices : l'acide hyaluronique augmente l'activité métabolique du chondrocyte et du fibroblaste synovial. Un déficit en acide hyaluronique provoque des modifications de la matrice cartilagineuse avec dégradation des protéoglycanes. L'acide hyaluronique a donc un effet chondroprotecteur [58].
- de cicatrisation : l'acide hyaluronique module la production fibroblastique et stimule la formation du tissu de granulation. Il jouerait un rôle dans le transport de facteurs de croissance dans le tissu néoformé, favorisant ainsi les processus de cicatrisation [58].

1.3.3.4.Lipides

Des lipides (triglycérides, phospholipides, cholestérol) sont présents dans le liquide synovial normal à des taux très inférieurs aux taux plasmatiques, du fait de la taille importante des lipoprotéines, qui leur empêche l'accès à la cavité articulaire.

Les **triglycérides** sont entourés d'un réseau de fibres collagènes de type III. Les traumatismes articulaires peuvent causer l'irruption de particules graisseuses qui contiennent des triglycérides [62]. Elles sont d'abord un réservoir d'énergie mais elles jouent aussi un rôle d'isolation thermique et de protection mécanique.

Dans cette étude on s'intéressera aux lipides qui jouent un rôle structural et de lubrification, dont les phospholipides et le cholestérol.

Les **phospholipides** sont des molécules amphiphiles [63], dont la structure se compose de deux parties (Figure 14) :

- une « tête » hydrophile composée de trois éléments qui sont un glycérol, un phosphate et un groupe alcool spécifique à chaque type de phospholipide. Ce groupe peut être chargé ou neutre.

- deux queues hydrophobes composées de deux chaînes d'acides gras (notées sn-1 et sn-2). Dans la synovie les acides gras formant ces queues sont pour 43 % saturés (en général en position sn-1) et 57% non saturés (position sn-2). [7] La présence des acides gras non saturés fait que ces lipides ne résistent pas à un milieu oxydant.

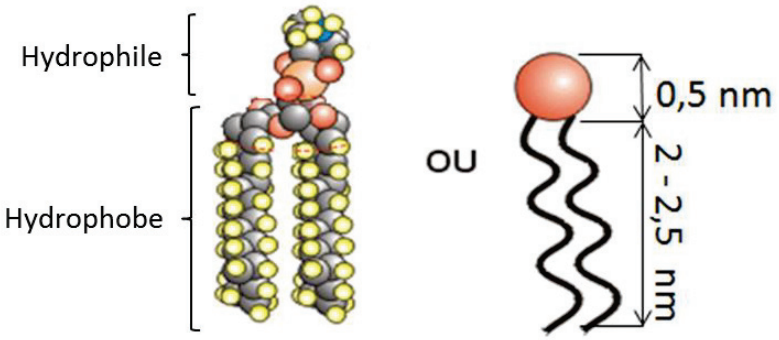


Figure 14. Structure et schéma d'une molécule phospholipidique [64]

Plusieurs types de phospholipides peuvent exister selon le type d'alcool présent dans le groupement hydrophile parmi lesquels les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidylethanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS), les phosphatidylinositols (PI) et les sphingomyélines (Sph) (figure 15).

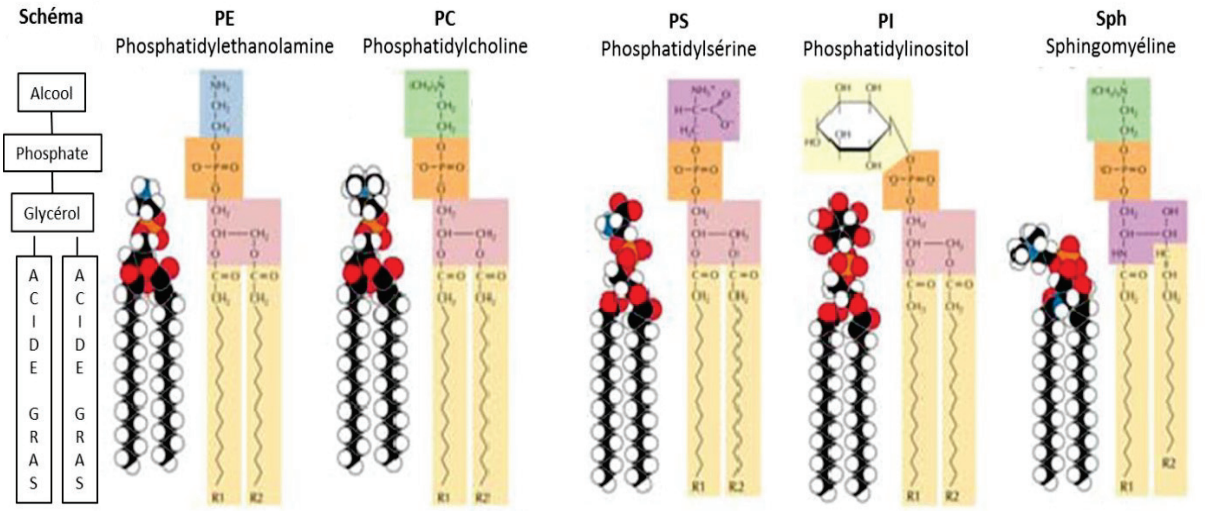
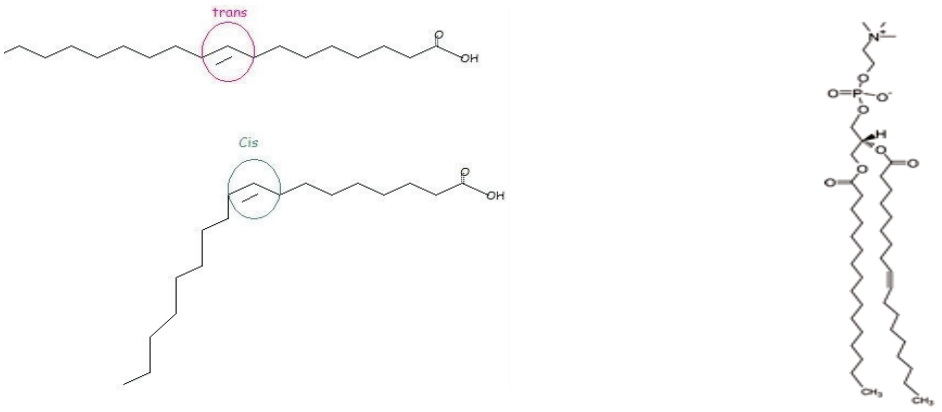


Figure 15. Structure des différentes molécules phospholipidiques

Les tissus sains présentent 45-55% de PC [66], 15-25% de PE [68] et 32% de Sph [48] associés à une faible quantité de PS (2-10% [66]) et de PI (moins de 1%). Tous ces groupes confèrent aux lipides articulaires une neutralité électrique qui influence les propriétés physico-chimiques [67].

Les queues non polaires de la majorité des phospholipides sont constituées de molécules d'acides gras à longue chaine carbonée. Dépendamment du nombre d'atomes de carbone et du nombre de doubles liaisons qui les composent les acides gras varient. Cependant, dans le milieu vivant, on retrouve généralement 16 à 18 atomes de carbone dans la chaine carbonée. Un de ces deux acides gras est insaturé (généralement en position sn-2) (Figure 16). Un des phospholipides prédominant est le POPC (palmitoyl-oléoyl-phosphatydil-choline, 16:0 -18:1 PC), composé d'une chaine sn-1 saturée (acide palmitique 16:0) et d'une chaine sn-2 insaturée (acide oléique 18:1) [70].



A B

Figure 16. A. Représentation schématique de l'acide gras formant les queues hydrophobes des phospholipides ; B. Représentation chimique de la structure du POPC (palmitoyl-oléoyl-phosphatydil-choline, 16:0 -18:1 PC)

En phase aqueuse, dépendamment des paramètres d'empilement, les lipides ont tendance à adopter plusieurs types de phases (polymorphisme), qui leur confère des possibilités d'auto-organisation en milieu aqueux et de former spontanément des structures différentes : bicouches lipidiques, micelles ou vésicules lipidiques (figure 17). Le côté amphiphile des phospholipides les pousse à s'associer entre eux pour éviter le contact aqueux. Les têtes hydrophiles (en blanc) restent en contact avec l'eau, tandis que les parties hydrophobes (en jaune) restent associées entre elles. Ce phénomène est responsable de la formation des vésicules des micelles, ou de la bicouche lipidique que l'on retrouve sur les membranes cellulaires [7,67].

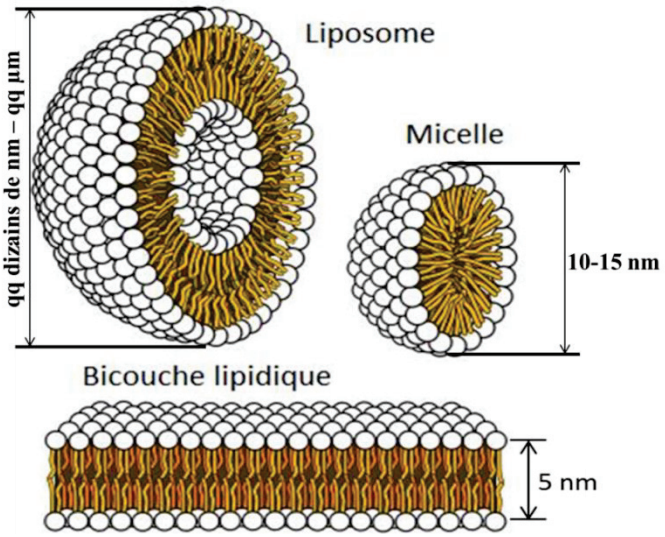


Figure 17. Organisation des phospholipides en milieu aqueux

Même si présents en faible quantité dans le liquide synovial sain (0.1-0.2 mg/ml), les phospholipides ont un rôle important dans la lubrification des surfaces articulaires en formant des assemblages moléculaires telles que les bicouches lipidiques sur la surface articulaire (figure 3) ou les vésicules lipidiques dans le volume (figure 5) qui sont des marqueurs importants de pathologies articulaires.

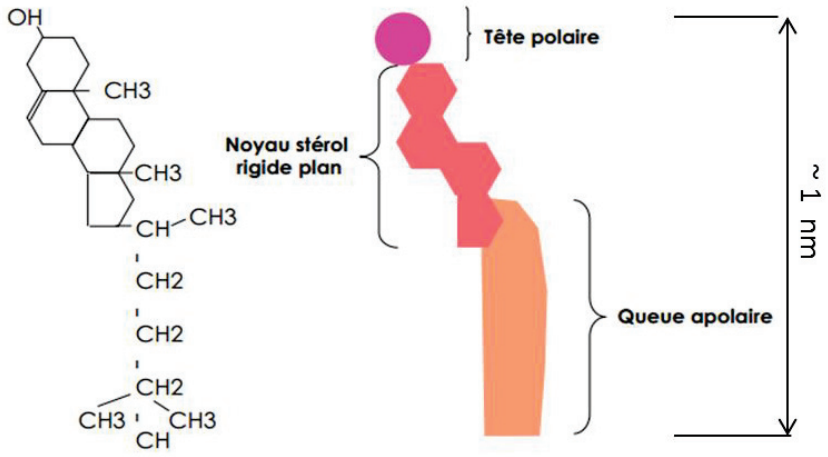


Figure 18. Structure d'une molécule de cholestérol

Le cholestérol est, comme les phospholipides, une molécule amphiphile (Figure 18). Il va s'associer aux phospholipides (Figure 19) pour former les membranes lipidiques augmentant l'imperméabilité et la rigidité des bicouches lipidiques [76,77].

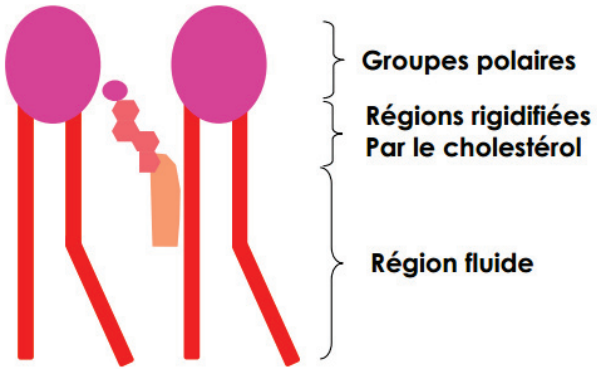


Figure 19. Association du cholestérol avec les phospholipides

Etant donnée la complexité du triplet tribologique in vivo, il faudra, pour réaliser des études de lubrification articulaire réaliste, reproduire ex vivo chaque élément du triplet tribologique en procédant à des compromis expérimentaux tout en conservant les propriétés mécaniques et physicochimiques conformes à la réalité biologique.

1.4. Modèle tribologique ex vivo d'une articulation saine

Le modèle tribologique présenté ci-dessous a été conçu durant la thèse d'Ana-Maria Trunfio Sfarghiu [8]. Ce modèle tribologique *ex vivo* est constitué d'un mécanisme et des corps modèles (figure 20).

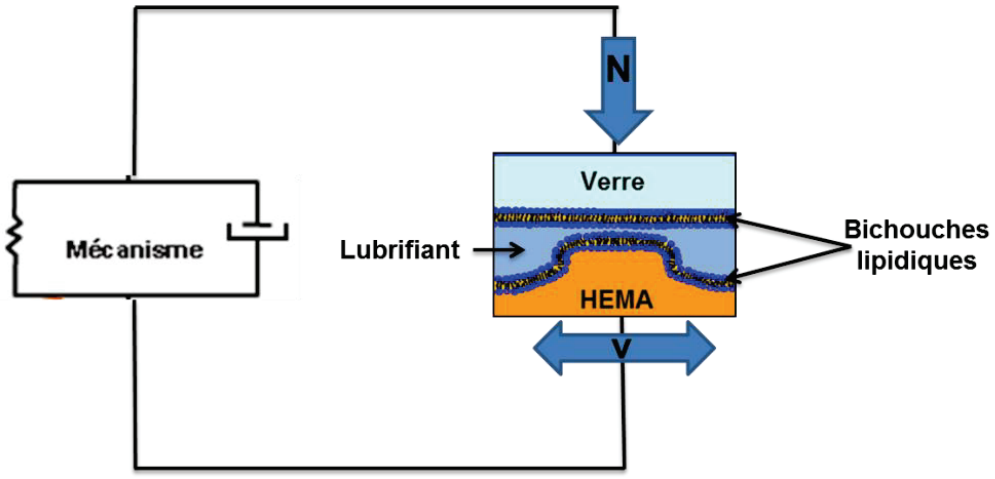


Figure 20. Schéma du modèle tribologique ex vivo d'une articulation synoviale saine

1.4.1. Choix du mécanisme modèle

Pour ce modèle tribologique nous avons choisi d'étudier le cas de lubrification limite car, comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent, pose plus de problèmes d'usure au niveau articulaire. Pour cela le modèle de mécanisme tribologique du modèle articulaire a été simulé grâce à un dispositif qui permet d'avoir des conditions de sollicitations telles que les effets de portance hydrodynamique sont totalement négligeables, de sorte que le rôle des interfaces lipidiques (SAPL) soit mis en évidence et exacerbé.

Pour avoir ces conditions nous avons choisi une vitesse relative entre les deux premiers corps de quelques mm/s et une pression de contact comprise entre 0.2 et 0.4 MPa, ces paramètres n'influencent pas l'évolution du coefficient de frottement, tel que validé dans le chapitre V.

1.4.2. Choix des 1ers corps modèle

Pour les études *ex vivo* du comportement tribologique d'une articulation synoviale, il faut prendre en compte des propriétés poro-élastiques du cartilage articulaire pour reproduire les bonnes conditions de fonctionnement d'une articulation parce que les prélèvements de cartilage articulaire perdent leurs propriétés quand ils sont soumis à des essais de longue durée. Ces propriétés ont été largement étudiées et plusieurs types de matériaux synthétiques

polymériques très hydrophiles de type hydrogel ont été proposés pour simuler ex vivo les propriétés du cartilage articulaire, matériaux comme le polyalcool vinylique (PVA), le poly-acide acrylique (PAA) et hydroxyl-éthyl méthacrylate (HEMA) [78, 79, 80].

Parmi ces matériaux synthétiques de type hydrogel qui sont proposés pour simuler ex vivo les propriétés mécaniques du cartilage articulaire, notre choix s'est porté sur le hydrogel hydroxyl-éthyl méthacrylate (HEMA) [78] parce que sa structure et ses propriétés mécaniques sont très proche de celles du cartilage articulaire (Tableau 1) [8].

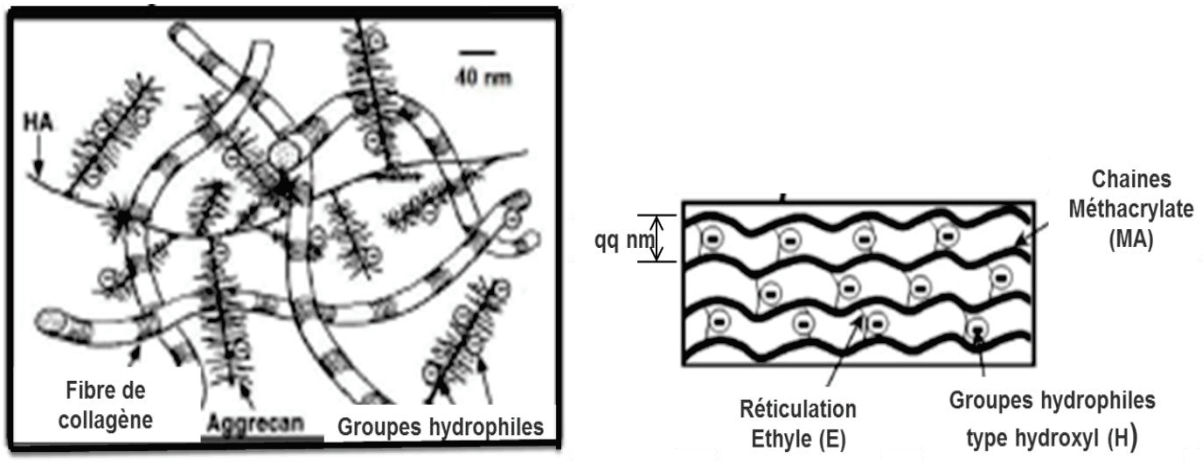


Figure 21. Schéma de la structure du cartilage articulaire et de l'hydrogel HEMA [8]

L'hydrogel HEMA présente de grosses chaînes polymériques méthacrylate réticulées par des petites chaînes hydroxy-éthyle (figure 21), qui sont hydrophiles. Cette structure est comparable à celle du cartilage, qui présente des fibres de collagène réticulées par les assemblages PG (aggrecan), qui sont hydrophiles aussi.

Quand l'hydrogel HEMA est hydraté dans une solution tampon de NaCl (150mM) au pH physiologique (pH 7), son module d'élasticité en compression est d'environ 0.5 MPa et sa perméabilité pour l'eau est d'environ ~10^{-16} m^4/N.s pour une épaisseur d'1 mm de matériau soumise à une différence de pression hydrostatique de 2 MPa [8].

Propriétés	**Cartilage** [I.50]	**Hydrogel HEMA** [I.51]
Module d'élasticité en compression (MPa)	0.5-1	0.2-0.9
Perméabilité d'origine physicochimique (m^4/N.s)	$10^{-16} – 10^{-15}$	~10^{-16}

Tableau 1. Comparatif des propriétés du cartilage articulaire et de l'hydrogel HEMA (dans une solution tampon de NaCl 150 mM) [8]

Pour cette étude nous avons choisi comme modèle du cartilage articulaire l'hydrogel HEMA issu des ébauches de lentilles cornées en HEMA semi-rigides qui présente une partie bombée dans la macro géométrie. Ceci aide à localiser la zone du contact lors des essais tribologiques (chapitre V). Parce que la rugosité de la surface d'HEMA est très faible (qq nm rms) par rapport à la rugosité du cartilage articulaire (qq µm rms) nous pouvons également étudier le comportement tribologique des interfaces lipidiques.

Afin de visualiser *in situ* le contact pendant les essais tribologiques, une surface en verre transparent a été choisie comme contre face au 1er corps modèle (chapitre V).

1.4.3. Choix du 3eme corps modèle

Etant donné les objectifs fixés dans cette étude nous avons choisi pour le 3eme corps, le liquide synovial prélevé *in vivo* ou reconstitué *ex vivo* avec ou sans interfaces phospholipidiques SAPL constituées de deux bicouches phospholipidiques d'épaisseur très faible (5nm) absorbées sur les surfaces des 1ers corps.

Vu les discontinuités de la structure supramoléculaire à l'échelle du film lubrifiant et la complexité des composants biochimique ainsi que leur non miscibilité (les protéines et l'acide hyaluronique forment un gel glycoprotéique et les lipides des bicouches lipidiques), un des objectifs de cette thèse est de comprendre quel est le rôle des interactions biochimiques (entre composants), quelle est la structure supramoléculaire qui en découle et quelle est la conséquence dans le cas de la biolubrification saine.

Pour ce faire, un modèle réaliste a été développé afin de reproduire les interfaces biologiques cartilage / liquide synovial et les sollicitations mécaniques articulaires dans des conditions de lubrification limite qui entraine des problèmes d'usure et qui exacerbe le rôle des interfaces et assemblages moléculaires. Pour cela nous avons choisi de réaliser des reproductions synthétiques comparativement aux échantillons animaux sains prélevés in vivo.

1.6. Pathologies articulaires

Les principales affections touchant les articulations sont l'arthrite et l'arthrose (la plus répandue) (figure 22).

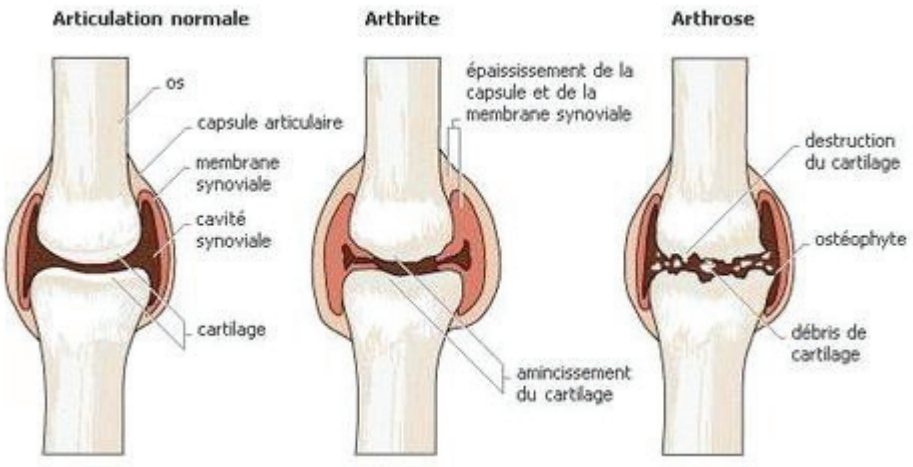


Figure 22. Comparaison de l'articulation saine, atteinte d'arthrite et atteinte d'arthrose

L'arthrose (OA) est difficile à définir du fait de la diversité de ses manifestations et de la multitude de facteurs étiologiques qui peuvent être impliqués dans son initiation et sa progression. La physiopathologie de l'arthrose n'est pas encore parfaitement comprise et son étiologie n'est pas encore complètement connue, mais elle serait le résultat d'un déséquilibre entre les propriétés physico-chimiques qui confèrent au cartilage sa résistance et les forces biomécaniques appliquées. Elle impliquerait ainsi des interactions complexes entre des causes mécaniques, biologiques (hérédité, vieillissement), biochimiques, moléculaires et métaboliques. Certaines théories aboutissent au résultat que l'arthrose n'est pas une maladie, mais une défaillance de l'articulation, vue comme un organe, initialement provoquée par des facteurs mécaniques et où les changements biologiques observés en sont la conséquence. Dans cette optique, l'arthrose correspond au stade final de cette défaillance [81, 82, 83].
L'arthrose est une maladie articulaire caractérisée par des changements pathologiques au sein du cartilage articulaire, de l'os périarticulaire et de la membrane synoviale. Ce sont les principaux sites de ces modifications, mais elle implique aussi d'autres tissus tels que les muscles, les tendons, les ligaments ou les ménisques lorsqu'ils sont présents. L'arthrose se traduit notamment par une dégradation et une perte du cartilage articulaire, des changements osseux (hypertrophie, ostéophytose, remodelage de l'os sous-chondral) et une inflammation de la membrane synoviale. Contrairement à l'arthrite, l'arthrose n'est pas une maladie d'origine inflammatoire. Néanmoins, certains événements inflammatoires peuvent y être observés et s'ils représentent des phénomènes secondaires, ils contribuent fortement au maintien de la maladie.

Pour résumer, l'arthrose est une pathologie liée au vieillissement de l'articulation : le cartilage commence par s'amincir, puis est progressivement détruit. Les os dépourvus de cartilage sont

le siège d'une croissance osseuse anarchique, formant des « éperons » osseux appelés ostéophytes (figure 22). Les arthroses se manifestent par une raideur de l'articulation touchée, qui devient douloureuse. Elle est, en outre, souvent chaude et gonflée. Cette maladie fait partie des maladies dégénératives.

L'arthrite est une affection inflammatoire, d'origine infectieuse ou non : les globules blancs impliqués dans les processus d'inflammation envahissent la membrane synoviale et s'y multiplient. La membrane synoviale et la capsule articulaire s'épaississent ; les épanchements de synovie successifs provoquent l'amincissement du cartilage. Selon Butler et al 1995, le terme « arthrite » signifie d'abord une inflammation simple de l'articulation, accompagnée par une distension articulaire sans remaniement osseux. Ainsi, l'inflammation entraîne deux phénomènes : une sécrétion excessive de liquide qui s'accumule dans l'articulation et la prolifération des cellules de la membrane qui s'épaissit (figure 22). Ce processus accroît la libération de substances (enzymes, radicaux libres, etc) qui lèsent plus ou moins directement le cartilage, l'os, puis éventuellement les tendons situés à proximité. L'inflammation est localisée dans la capsule articulaire et provoque des modifications de la qualité et de la quantité du liquide synovial.

Une des réactions inflammatoires importantes de l'arthrite est l'action enzymatique de phospholipases. Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides [71]. La **phospholipase A_2** enlève l'acide gras lié à la fonction alcool secondaire sn-2 du glycérol, libérant un acide gras et un lysophospholipide (figure 23). Ainsi, suite à l'action hydrolytique de la PLA_2 sur le PC, on obtient la lysophosphatidylcoline (LPC) qui a un rôle important dans l'inflammation favorisant la réaction inflammatoire locale en agissant comme un facteur chimiotactique sur les sites de l'inflammation. [72]

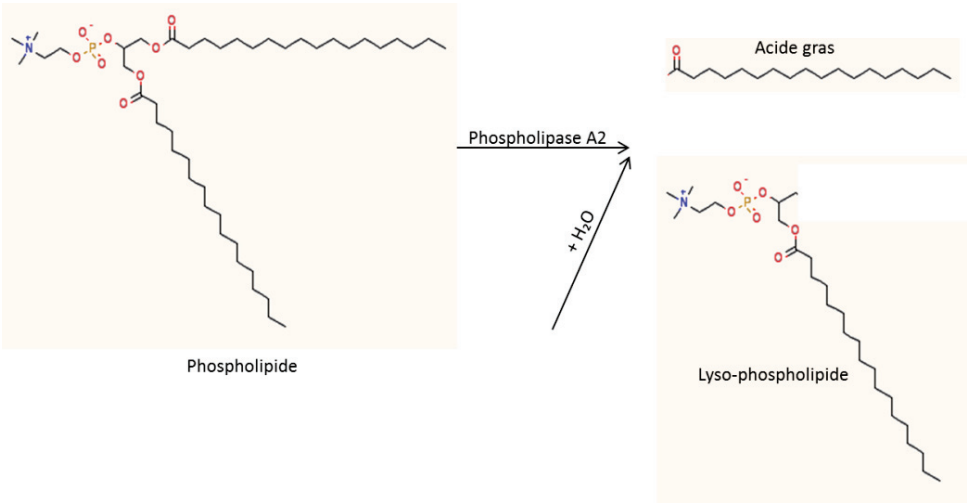


Figure 23. Action oxydative de la PLA_2 sur les phospholipides avec libération d'un lysophospholipide et d'une chaine d'acide gras

La réaction inflammatoire est caracterisée par une perméabilité des parois vasculaires et une augmentation du flux sanguin, par une libération locale de médiateurs et par des migrations cellulaires. Les médiateurs d'inflammation libérés suite à la dégradation enzymatique des produits résultant de l'action des phospholipases sur les phospholipides vont agir sur des récepteurs spécifiques. Au cours de ces différentes phases de la réaction inflammatoire, un rôle important est joué par des métabolites de l'acide arachidonique (figure 24) comme les prostanoides, les leukotriènes et les lipoxines. [73, 74].

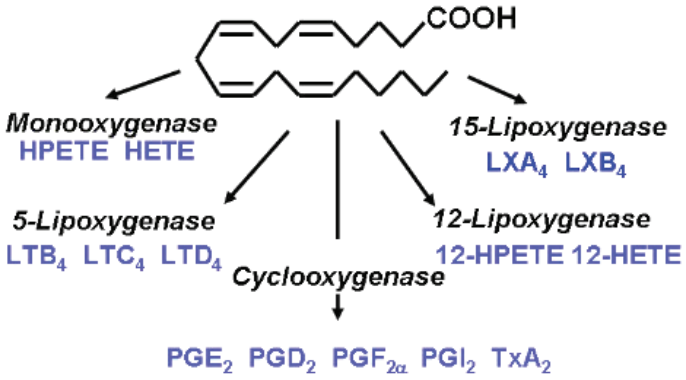


Figure 24. Métabolisme de l'acide arachidonique avec libération des marqueurs d'inflammation (LTB_4, HETE)

Les effets biologiques de l'acide arachidonique sont dus essentiellement à sa conversion en de nombreux métabolites. La libération de ces médiateurs lipidiques varie en fonction du type cellulaire stimulé. Souvent, la synthèse de ces médiateurs nécessite des interactions entre différents types cellulaires. Un type cellulaire peut fournir le substrat qui sera métabolisé par un autre type cellulaire possédant un enzyme spécifique pour la synthèse d'un eicosanoïde [67].

La **polyarthrite rhumatoïde (PR)** est une maladie chronique auto-immune qui engendre douleur, gonflement et raideur des articulations et qui finit souvent par provoquer une destruction de ces articulations. Contrairement à l'arthrose, l'atteinte articulaire la plus fréquente, la PR est une maladie auto-immune au cours de laquelle l'articulation est enflammée, ce qui aboutit à une destruction progressive du cartilage et de l'os adjacent.

Le mécanisme de l'inflammation induite d'autre part la déposition de cristaux due à l'activation cellulaire et dé granulation, la phagocytose (neutrophile ou macrophage) et la membranolyse, et la lésion cellulaire qui précède l'inflammation. Ainsi on peut trouver des cristaux inflammatoires: d'urate à bouts fins (goutte), de pyrophosphate de calcium épais à bouts carrés (chondrocalcinose), d'apatites, d'oxalates, de guanine ou des cristaux peu inflammatoires : de cholestérol et de lipides [84].

Une autre réaction enzymatique qui caractérise les pathologies articulaires mais pas spécifiquement à la PR (aussi OA) est l'activation de la phosphatase alcaline qui génère des cristaux d'apatite [152].

Pour étudier les phases précoces des maladies articulaires, la progression de ces maladies ainsi que pour évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques, plusieurs **modèles expérimentaux** ont été utilisés. Le développement de ces maladies implique des interactions complexes entre des aspects environnementaux (nutrition, exercice, prise de médicaments), biologiques (âge, sexe, génétique, profil hormonal) et biomécaniques (instabilité articulaire, surcharge articulaire, modification des charges articulaires) [85].

Il existe deux groupes principaux de modèles expérimentaux : **arthroses spontanées** traduisant une prédisposition génétique et **arthroses induites** pouvant être de nature mécanique ou structurale [87,88].

Les arthroses peuvent être induites par des **facteurs mécaniques** pouvant être de plusieurs types : instabilité ligamentaire, contraintes biomécaniques anormales consécutives à une instabilité articulaire (désaxation, exérèse méniscale) ou répartition anormale des charges. Dans ce cas, l'arthrose est induite par la destruction de l'intégrité structurale de cartilage ou de ménisque qui peut être réalisés par une opération chirurgicale (rupture de ligament croisé ou fracture de l'intégrité os / cartilage). Ces lésions génèrent l'apparition rapide et sévère de la maladie. Ces **arthroses induites** peuvent aussi avoir des mécanismes initiateurs supplémentaires comme l'inflammation ou la cytotoxicité. Le modèle de référence est celui de la section du ligament croisé antérieur chez le chien sur lequel plusieurs modèles d'arthrose ont été développés. Pour des investigateurs expérimentés cette technique est reproductible et donne des informations très utiles. Au niveau de ce modèle, nous pouvons observer les changements cellulaires caractéristiques, les modifications de surface avec fibrillations et érosions, la déplétion en protéoglycannes ainsi que les altérations osseuses et dans la membrane synoviale. [46]

Les **arthroses structurales**, consécutives à la dégradation de la matrice extracellulaire ou à des altérations cellulaires peuvent être obtenues par des altérations physiques (abrasion locale, contusion externe, etc.), chimiques (mono-iodoacétate, vitamine A, etc.), biochimiques (papaïne, collagénase, etc.) ou immunologiques (IL-1, TNF, etc.) sur une ou plusieurs articulations. [86] L'injection intra-articulaire de mono-iodoacétate induit une dérégulation du métabolisme chondrocytaire. Cet agent a la capacité d'inhiber certaines enzymes qui provoquent une souffrance cellulaire, aboutissant au développement d'une arthrose.

Les tendances récentes sont d'activer un seul facteur biologique afin d'étudier les conséquences. Ainsi il y a deux modèles, un qui agit sur le cartilage et l'autre sur le liquide synovial.

Pour le **cartilage,** il existe aussi des **modèles** expérimentaux **d'ingénierie génétique** de la thérapie cellulaire du cartilage embryonnaire portant une délétion de la sous-unité intégrine β1 dans les chondrocytes qui sont de démontrér le rôle des récepteurs intégrines dans les propriétés mécaniques du cartilage, l'absence d'intégrine de type β1 conduisait à la production d'une matrice cartilagineuse plus rigide, plus résistante à la compression. Ces résultats semblent indiquer que l'altération des liens cellules/matrice provoquée par l'absence de ces intégrines atténue la sensibilité des chondrocytes à la compression cyclique. Ces études

envisagent de préparer des constructions cellules/agarose *in vitro* avant réimplantation chez le patient, à partir de chondrocytes autologues sains ou de cellules souches, l'agarose étant un biomatériau utilisable en clinique. [89]

Pour affecter la structure de **liquide synovial** il est possible d'**induire l'inflammation,** en reproduisant des fluides synoviaux en ciblant une seule perturbation biochimique pathologique afin de pouvoir analyser la conséquence directe de cette perturbation sur les propriétés physicochimiques et mécaniques de ces fluides. Ainsi il est possible d'obtenir des liquides synoviaux à partir des synoviocytes et d'induire l'inflammation par des enzymes ou des cellules (cytokines) ou il est possible de se focaliser sur l'étude de la déficience en protéoglycannes (perturbation biochimique) ce qui est supposée avoir une influence significative sur les propriétés rhéologiques du liquide synovial. Ces études utilisent des lignées cellulaires de hamster déficitaires ou non dans l'expression membranaire des protéoglycannes de type heparane-sulfate (HSPG) afin d'obtenir de fluides synoviaux reconstitués sains et «mutants» (déficients en protéoglycannes).

Dans cette thèse on s'est proposé d'étudier les pathologies pour le cas humain. Comme les modèles expérimentaux énumérés auparavant ne peuvent être pratiqués que sur des animaux pour des expériences in vivo, nous avons également choisi d'utiliser un modèle de culture cellulaire. Ce model cellulaire a été validé en référence aux cas spontanés. Nous appelons cas spontanés, les patients se présentant spontanément en consultation pour un début de pathologie non inflammatoire ou inflammatoire.

Chapitre II. Objectif, stratégie et plan de la thèse

Face à la complexité des articulations saines et des maladies articulaires, cette thèse propose de développer une nouvelle approche nano-bio-tribologique basée d'une part sur un couplage étroit entre les analyses structurales, biochimiques et tribologiques et d'autre part sur la reconstitution ex vivo des liquides synoviaux.

L'objectif de cette thèse est de comprendre le rôle des interfaces lipidiques, de l'interface liquide synovial / cartilage et des structures volumiques du liquide synovial dans les cas de lubrification des articulations synoviales saines et pathologiques.

Stratégie pour le cas sain

La **stratégie** pour le liquide synovial sain a été de comprendre quelle est la structure supramoléculaire et quels sont les composants biochimiques importants pour la longévité de cette structure afin de garantir de bonnes propriétés de biolubrification.

Pour ce faire, on a étudié des échantillons de liquide synovial de trois origines animales qui ont été prélevés au VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, en accord avec les instructions du comité d'éthique pour la protection des animaux :

- liquide synovial de rat (300g, race Wistar : 8 échantillons) ;
- liquide synovial de chien (9-11 kg, race Beagle: 12 échantillons) ;
- liquide synovial de cheval (490-590 kg, race Trotteur français: 2 échantillons).

Pour la reproduction synthétique, on a reconstitué via des méthodes biomimétiques la structure du cas sain, structure déterminée auparavant dans les échantillons prélevés.

Etant donné les difficultés expérimentales dues à observation d'un liquide dans son état initial, il a fallu valider plusieurs méthodes de microscopies pour procéder aux analyses structurales du liquide synovial sain.

On a utilisé le mode Wet-STEM de la microscopie électronique à balayage en mode environnemental pour observer des échantillons hydratés, éliminant l'étape de préparation qui peut endommager l'échantillon. La résolution spatiale en Wet-STEM étant limitée à quelques dizaines de nm dans notre cas, cette technique n'a pas permis de visualiser de structures supramoléculaires de type membranes lipidiques. On a donc également utilisé la technique de coloration négative pour l'observation en microscopie électronique à transmission (MET) permettant de mettre en évidence les structures supramoléculaires de type lipidique. Cette technique rapide à mettre en œuvre nécessite de diluer le fluide synovial dans un tampon physiologique. Les dimensions des structures supramoléculaires observées peuvent donc être modifiées par rapport à la réalité in vivo. C'est pourquoi des techniques cryogéniques en

microscopie électronique à balayage (cryo-MEB) et à transmission (cryofracture) ont été également employées pour approcher autant que possible l'état initial du liquide synovial.

Afin de comprendre quelle est l'origine biochimique des structures mises en évidence dans les prélèvements animaux sains, nous avons utilisé (i) des reproductions synthétiques (6 échantillons) venant de produits commerciaux et des techniques physicochimiques spécifiques à l'obtention des assemblages moléculaires de type lipidique, (ii) des dosages biochimiques spécifiques à la détection de composants lipidiques et (iii) des techniques non spécifiques aux composants lipidiques qui nous ont permis de comparer les échantillons entre eux.

Le rôle des structures supramoléculaires mises en évidence par les analyses structurale et biochimique a été investigué à l'aide d'un biotribomètre permettant (i) la reproduction des paramètres biomécaniques et physicochimiques du cartilage articulaire en utilisant des hydrogels ; (ii) la reproduction des interfaces lipidiques à l'interface cartilage/liquide synovial ; (iii) la visualisation du contact à l'aide de marqueurs fluorescents spécifiques grâce à la microscopie confocale, afin de comprendre le mécanisme tribologique et notamment la localisation du glissement dans les assemblages moléculaires du liquide synovial et de l'interface liquide synovial / cartilage.

Stratégie pour le cas pathologique

Malgré le grand nombre de publications de spécialité dans le domaine des pathologies articulaires, il n'y a à notre connaissance aucune méthodologie qui regroupe les aspects biochimiques, physicochimiques et tribologiques. Souvent, la bibliographie se focalise sur un seul aspect, ce qui amène à des interprétations très différentes d'un même phénomène. Cette multitude d'interprétations, qui néanmoins peuvent être toutes réalistes, sont difficilement compréhensibles par tous les groupes scientifiques concernés (mécanique, physicochimie et biologie) ce qui peut entraver la compréhension des relations causes /conséquences.

En conséquence, **la stratégie** pour ce cas a été de caractériser les liquides synoviaux pathologiques en couplant les analyses biochimiques, structurales et tribologiques afin de comprendre l'évolution pathologique précoce des assemblages moléculaires du liquide synovial. Cette démarche vise à comprendre l'enchaînement causes/conséquences des pathologies dans le stade précoce.

Pour cela on a choisi d'étudier des échantillons de liquide pathologique humain dans le stade précoce des pathologies. Ces échantillons ont été prélevés au Service de Rhumatologie de l'Hôpital Edouard Herriot – Lyon, selon les règles déontologiques en vigueur, avec le consentement éclairé des patients et le visa du comité d'éthique hospitalier. On a analysé des prélèvements **diagnostiqués cliniquement "non inflammatoires"** venant de patients souffrant d'arthrose (OA), **ou "inflammatoires"** issus de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR). Les résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus sur 6 échantillons " non inflammatoires" (OA) et 4 échantillons "inflammatoires" (PR).

La complexité biochimique et structurale de ces prélèvements nous a amené à reproduire les pathologies inflammatoires à l'aide de modèles de cultures cellulaires de synoviocytes humains ou 'fibroblast-like synoviocytes' (FLS) à partir desquels ont été obtenus in vitro des liquides dits « surnageants ». Les 4 échantillons de surnageants étudiés dans cette thèse ont été fournis par l'équipe Rétrovirus et Pathologie Comparée de Université Claude Bernard Lyon. L'inflammation a été induite par l'ajout de cytokines dans le milieu de culture.

En raison de l'impossibilité pratique d'observer tous les prélèvements par différentes méthodes, ces échantillons pathologiques ont été étudiés du point de vue **structurale** en MET via une technique de coloration négative. Ces recherches ont eu pour but de différencier, le cas échéant, les structures supramoléculaires dans les cas non inflammatoire et inflammatoire ainsi que pour détecter la présence ou l'absence de cristaux dans les prélèvements. Les hypothèses structurales émises à partir des études MET ont été validées en utilisant les techniques modernes de la microscopie de proximité à force atomique (AFM) en modes imagerie et spectroscopie de force.

Du point de vue **biochimique** complémentairement aux techniques énumérées pour le liquide synovial sain, nous avons quantifié différents facteurs biochimiques pathologiques (activation enzymatique).

Les **analyses tribologiques** ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour le cas sain.

Tous les échantillons étudiés dans cette thèse ont été conservés grâce à des techniques appropriées après prélèvements (1 – 2h) pour les analyses structurales et biochimiques et étudiés le jour même du prélèvement pour les analyses mécaniques et tribologiques. Au-delà de ces délais on a observé des modifications structurales et biochimiques affectant le comportement mécanique et tribologique.

Plan de thèse

Etant donné ce qui vient d'être exposé dans les chapitres I et II, le travail effectué au cours de cette thèse va être présenté en quatre parties comme suit :

- le Chapitre III porte sur l'analyse de la structure saine et pathologique dans les liquides synoviaux prélevés ou reconstitués.
- dans le Chapitre IV sont présentés les principes et les résultats des études biochimiques effectuées sur ces échantillons.
- le Chapitre V est consacré à l'analyse tribologique pour les cas sains et pathologiques.
- dans le Chapitre VI on procède à la corrélation entre résultats des études structurales, biochimiques et tribologiques et l'on propose des perspectives en vue du diagnostic et de la thérapeutique précoce de pathologies articulaires.

Les principes des différentes techniques utilisées ainsi que les protocoles expérimentaux correspondant aux différentes études seront regroupés en Annexes.

Chapitre III. Analyse de perturbations pathologiques de la structure du liquide synovial

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la structure du liquide synovial sain et pathologique à l'échelle supramoléculaire pour identifier les différents assemblages moléculaires de cette structure : vésicules, bicouches et réseaux, cristaux, qui pourront jouer un rôle important dans la biolubrification

Pour mener à bien ces études à la résolution nécessaire, on a utilisé les microscopies électroniques à transmission (MET) et à balayage (MEB), la microscopie de proximité à force atomique (AFM) et la microscopie photonique confocale.

La MET a été largement utilisée sur tous les types d'échantillons, sur des prélèvements de liquide préparés par coloration négative ou par cryofracture.

Le liquide sans préparation a pu être visualisé grâce à un mode particulier en transmission de la MEB environnementale, le mode Wet-STEM. La MEB à basse température (cryo-MEB) a permis de visualiser le liquide synovial congelé sous haute pression.

La microscopie confocale et la microscopie à force atomique ont été utilisées pour identifier la localisation du composant glycoprotéique à l'intérieur ou à l'extérieur de structures vésiculaires.

Les différents types d'échantillons étudiés ont été d'une part, des prélèvements de liquide synovial sain ou pathologique d'origine animale ou humaine, d'autre part des liquides synoviaux issus de cultures de synoviocytes humains, dits surnageants. Enfin des liquides synoviaux mimétiques ont été synthétisés par voie chimique afin de valider différentes hypothèses concernant les structures des prélèvements.

3.1.Prélèvements étudiés

Etant donné qu'il n'est pas possible d'obtenir des prélèvements de liquide synovial humain sain pour raisons d'éthique médicale du fait de la faible quantité de liquide synovial dans une articulation saine, on a choisi travailler sur des modèles animaux, et l'on a utilisé des échantillons de liquide synovial de trois origines animales (chapitre II).

Les échantillons de liquide pathologique humain ont été prélevés avec l'accord préalable des patients atteints de maladies articulaires non inflammatoires (OA) ou inflammatoires (PR) (chapitre II).

Les différents échantillons ont été conservés différemment, les protocoles correspondants étant détaillés ci-après pour chaque type d'échantillon. Pour chaque échantillons on a préparé plusieurs grilles pour la microscopie électronique, les difficultés inhérentes à la technique de préparation ont fait que toutes les grilles n'éteint pas observables. Sur chaque grille observable on a réalisé une statistique sur le nombre maximal d'objets observables sur la grille.

3.2.Liquide synovial sain

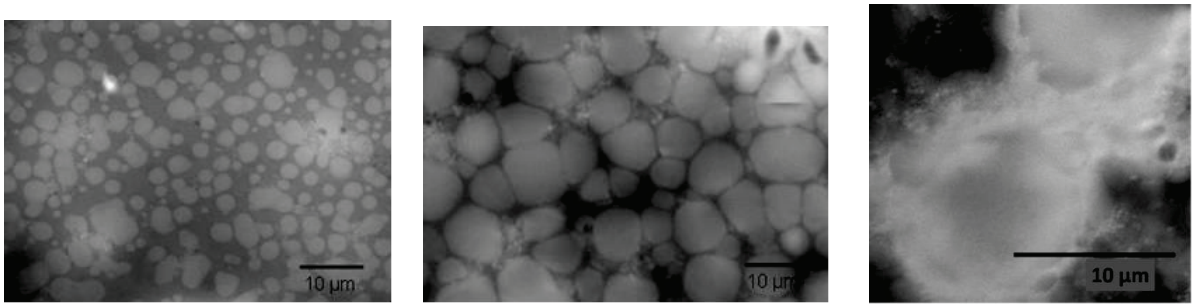
3.2.1. Liquide synovial de rat

Pour le **liquide synovial de RAT** il a fallu injecter une solution tampon phosphate (PB) dans l'articulation afin de pouvoir extraire un volume de liquide suffisamment important. Etant donné les dimensions des articulations et les données bibliographiques on estime que la concentration obtenue dans ce cas est d'environ 50% fluide synovial fonction des ajouts injectés. Les échantillons ont été ensuite mélangés avec 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (472301, Sigma- Aldrich), congelés en azote liquide et ensuite conservés à -80°C.

Pour observer le liquide synovial tel que prélevé sans préparation supplémentaire on a réalisé l'observation directe de gouttes de prélèvements en utilisant le **mode Wet STEM de MEB Environnementale** [90,91] (Annexe 1). En faisant varier la pression dans la chambre d'observation et la température de l'échantillon dans un domaine de valeurs appropriées (3 Torr <p <6 Torr, 3° C <T <5° C) (Annexe 1) on a fait décroitre progressivement le taux d'humidité de l'atmosphère environnant l'échantillon de 100% (prélèvement dans son état liquide initial) à 10% environ.

A titre d'exemple, on présente ici les observations réalisées sur 2 échantillons de 50%vol **synovie rat** en PB + 10% DMSO. Pour une humidité de 95% (figure 25.A) on a observé des structures vésiculaires avec une distribution de diamètres entre quelques centaines de nm et quelques µm. La taille moyenne observée augmente jusqu'à quelques µm pour une humidité de l'ordre de 40% (figure 25.B), et la structure fusionne en réseaux lipidiques (figure 25.C) quand l'humidité décroit à 10% environ. Ceci montre que l'évaporation de la phase liquide entraine la fusion spontanée d'un certain nombre de vésicules. Comme d'autres structures

n'ont pas été identifiées entre les vésicules après déshydratation partielle, on pense que l'espace entre ces vésicules est rempli de liquide aqueux sans composants supramoléculaires de taille détectable.



A B C

Figure 25. Structures vésiculaires du liquide synovial de **rat sain** (dilution 60%) observées en Wet STEM, pour taux d'humidité décroissants

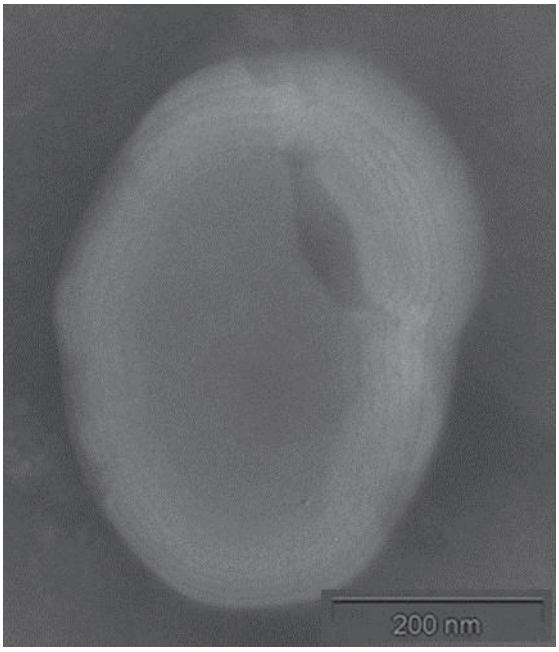
La résolution spatiale en Wet STEM étant limitée à une dizaine de nm dans notre cas, cette technique ne permet pas de visualiser des structures supramoléculaires comme par exemple les membranes de phospholipides pouvant constituer la paroi des vésicules.

Pour visualiser de telles membranes, on a utilisé la **microscopie électronique à transmission** (MET) (Annexe 2) en employant une technique de **coloration négative** (Annexe 3); cette technique consiste à mélanger l'échantillon avec un colorant chimique, ici l'acide phosphotungstique (APT) plus dense aux électrons, qui vient entourer les vésicules ce qui permet d'observer le cas échéant les membranes lipidiques en clair sur fond noir.

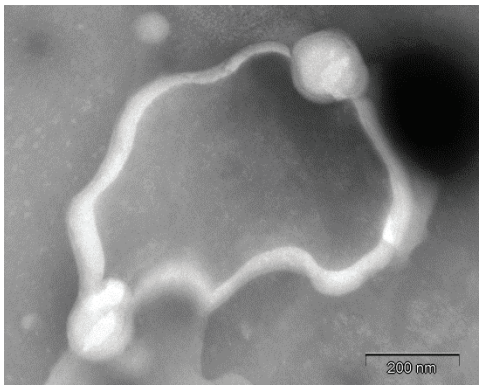
En MET l'épaisseur des structures observées doit être suffisamment faible pour être transparente aux électrons. Nos expériences ont montré que les prélèvements de liquide synovial devaient de ce fait être dilués afin que de trop grandes quantités de vésicules ne viennent se superposer dans l'épaisseur du liquide observé. Les échantillons ont été dilués jusqu'à 70 % en solution tampon PB pH 7.4 puis imprégnés à l'APT 2%.

L'étude a révélé des vésicules à parois multilamellaires c'est-à-dire constituées de 3 à 7 lamelles (figure 26 A). Nous pensons que ces lamelles correspondent à des bicouches lipidiques dont l'épaisseur est de l'ordre 5 nm comme on l'a vu au chapitre I. On a observé également des cas d'éclatement ou fusion de plusieurs vésicules (figures 26. B et C).

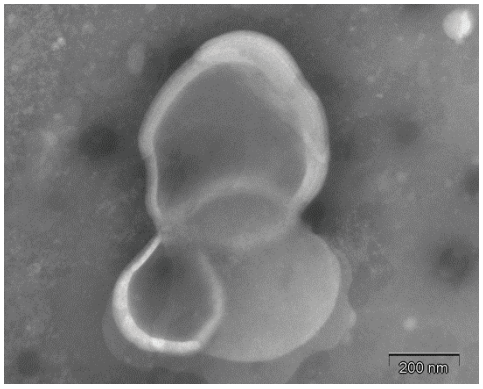
L'analyse statistique à l'aide du logiciel ImageJ de la distribution en taille des vésicules est reportée sur la figure 27: le diamètre maximal mesuré pour un vésicule donné se situe entre une centaine et quelques centaines de nm.



A



B



C

Figure 26. Images MET en coloration négative à APT 2%
du liquide synovial de **rat sain** (dilution à 70 %) :
A. visualisation à fort grandissement d'un vésicule multillamelaire ;
B. cas d'éclatement d'un vésicule ; C. cas de fusion de vésicules

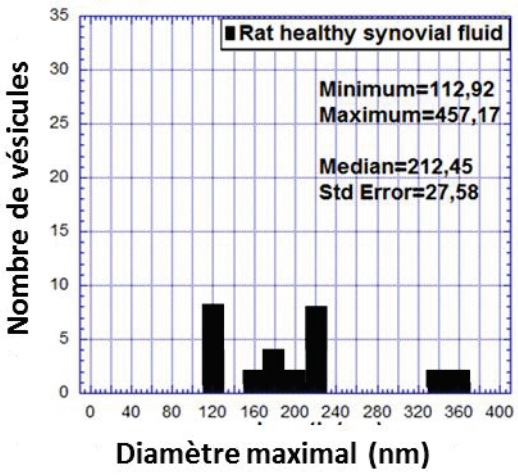


Figure 27. Distribution en taille des vésicules
dans 8 échantillons de liquide synovial de **rat sain**
observés en MET par coloration négative

3.2.2. Liquide synovial de chien

Comme la quantité de liquide synovial pouvant être prélevée sur le rat est faible, on a étudié des animaux plus grands dont le chien afin de disposer d'échantillons non dilués. Pour le **liquide synovial de CHIEN** on a pu réaliser l'extraction du fluide synovial pur sans destruction d'articulation par une technique de médecine vétérinaire. Pour les études structurales, les échantillons ont été utilisés frais ou mélangés avec DMSO à différentes concentrations, congelés en azote liquide et ensuite conservés à -80°C.

On a observé tout d'abord les échantillons par **MET** avec **coloration négative** à l'APT 2% (Annexe 3). Pour cela le liquide synovial n'étant pas dilué lors des prélèvements, les échantillons ont dû être préalablement dilués (comme pour les échantillons de rat) dans une solution tampon PB pH 7.4 (dilution entre 70% et 95%).

En fonction de la dilution de l'échantillon, on a observé différents types de structures :

a) structures alvéolaires (dilution à 70%, figure 29.A) qui peut correspondre à une réticulation de la structure vésiculaire, révélant localement des précipités de vésicules, dont la taille est de quelques centaines de nm (figure 29.B),
b) dispersion de vésicules pouvant fusionner localement (dilution à 95%, figures 3.5.C et D); l'observation à fort grandissement montre qu'il s'agit de vésicules multilamellaires (figure 29.D). La distribution en taille de ces vésicules est présentée sur la figure 28 : cette taille se situe entre une centaine et quelques centaines de nm.

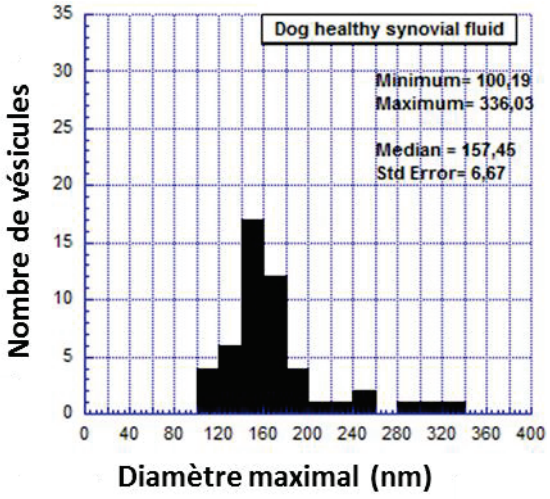


Figure 28. Distribution en taille des vésicules
dans 12 échantillons de liquide synovial **sain de chien**
observés par MET avec coloration négative

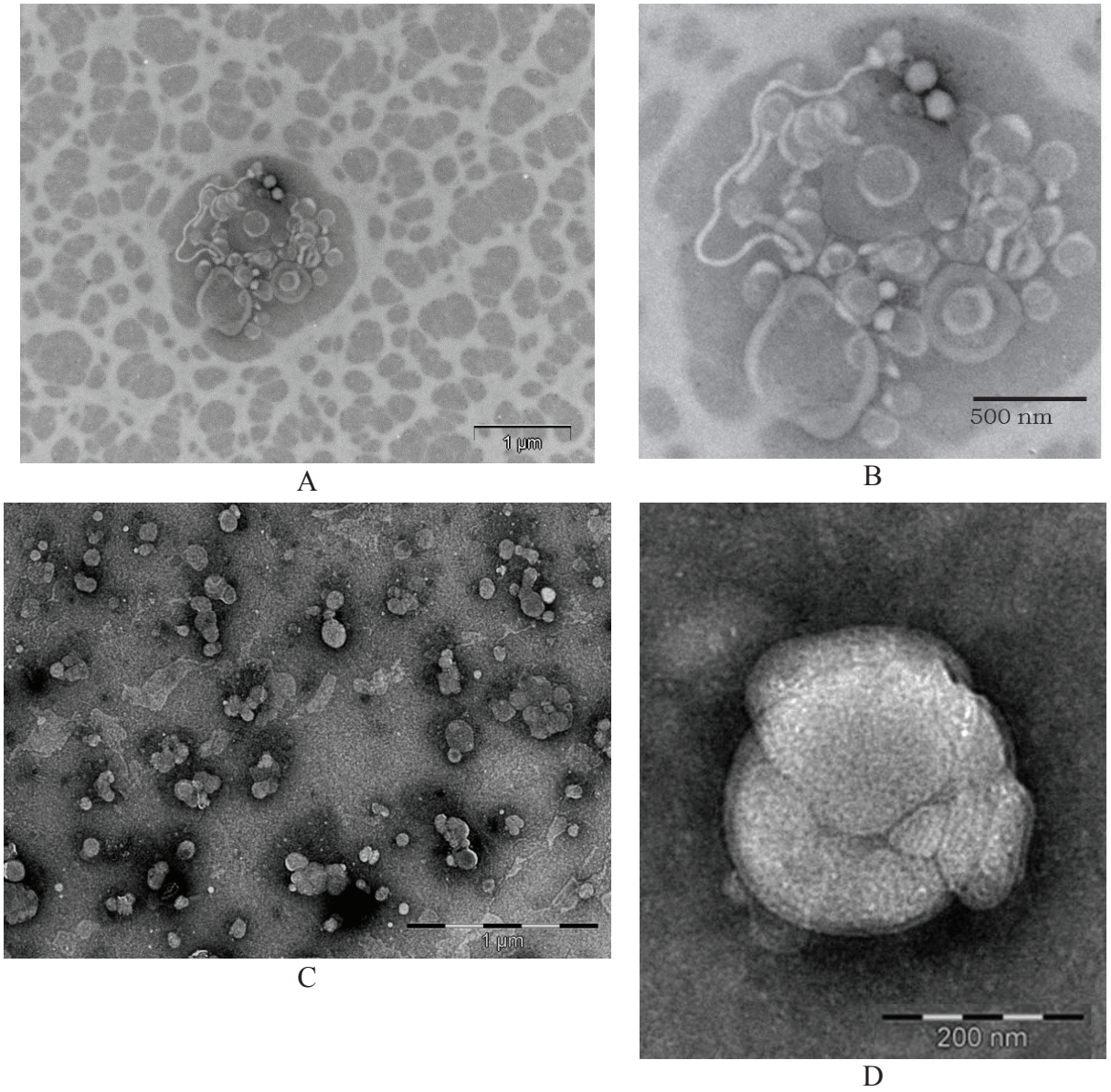


Figure 29. Structures observées (vues d'ensemble et agrandissement correspondants) par MET avec coloration négative à l'APT 2% ,dans des échantillons de liquide synovial de **chien sain** : A et B –dilution à 70%; C et D - dilution à 95%

Comme on a constaté que la dilution du liquide synovial était susceptible de faire évoluer la structure vésiculaire : réticulation, éclatement ou fusion des vésicules, on a utilisé des techniques cryogéniques pour approcher la structure du liquide synovial non dilué.

La technique de **cryo-MEB** (Annexe 4) correspond à la congélation en azote liquide sous haute pression sans traitement chimique de l'échantillon prélevé, puis l'observation par MEB

à basse température. A priori cette technique parait susceptible de conserver la structure du liquide synovial prélevé.

Les résultats obtenus en cryo-MEB ont révélé deux types de structures :

a) structures en réseaux (figure 30.A et B) qui évoquent les structures alvéolaires observées en MET (figure 29.A)
b) des vésicules plus isolés dont certains paraissent être à parois lamellaires (figure 30.C et D)

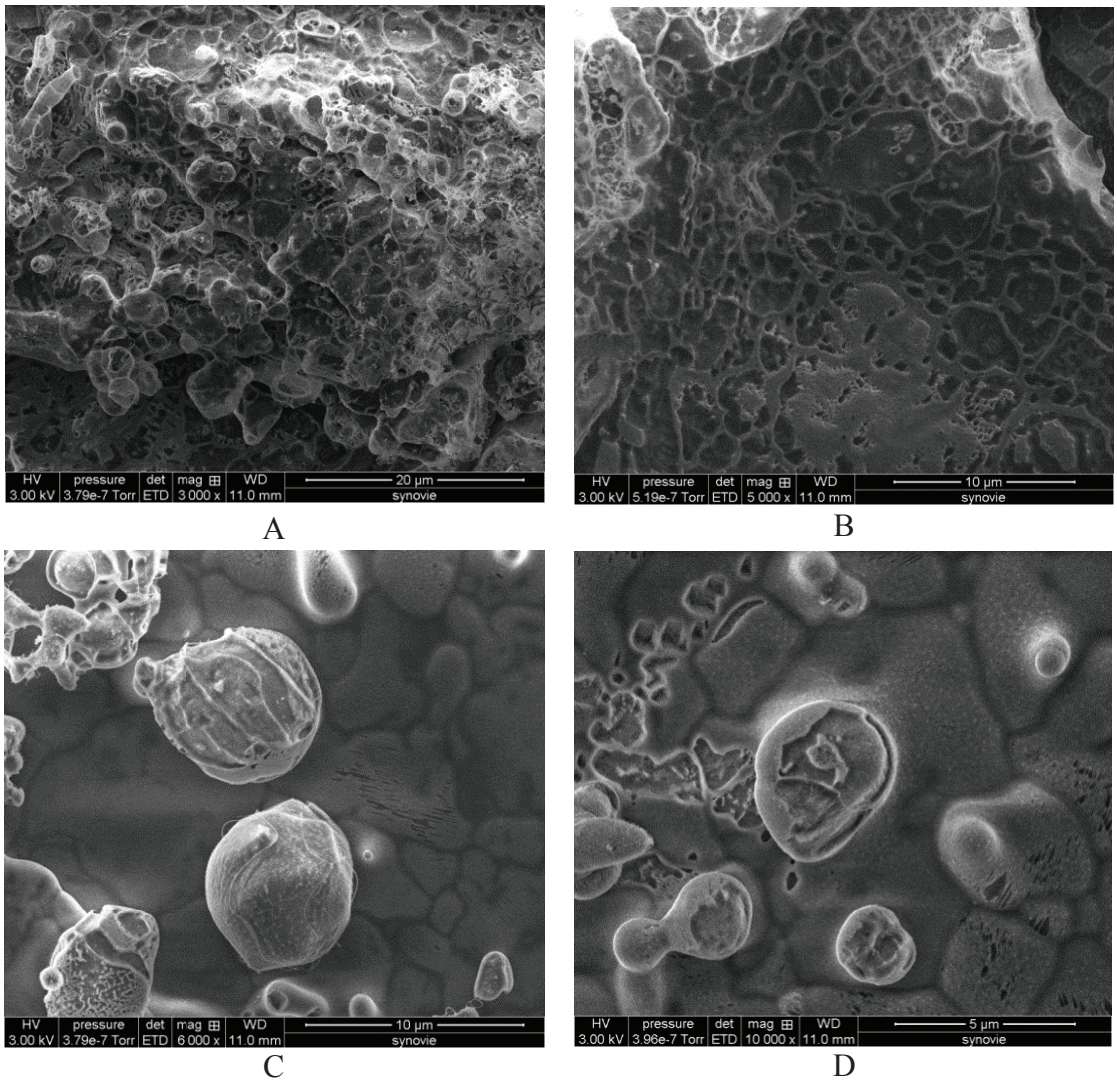


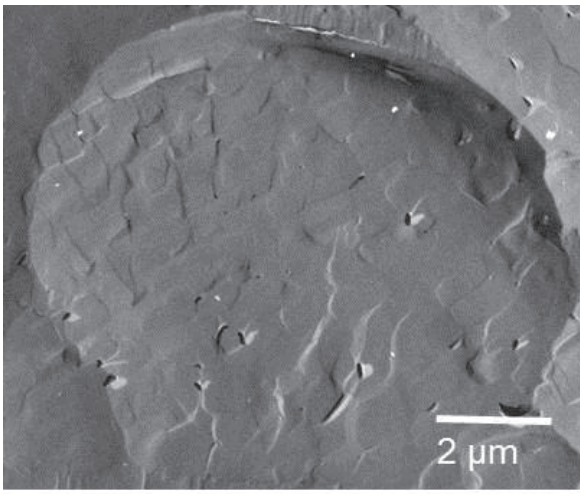
Figure 30. Différents types de structures observées par cryo-MEB dans des échantillons de liquide synovial de **chien sain** (échantillons 100% synovie chien sain) :
A et B- structure en réseaux, C et D- vésicules isolés

La résolution spatiale lors des observations en MEB étant limitée à quelques nm, il n'est pas possible d'analyser par cette technique les structures à l'échelle supramoléculaire. On a donc songé à utiliser la plus grande résolution spatiale de la MET en traitant les échantillons par cryofracture.

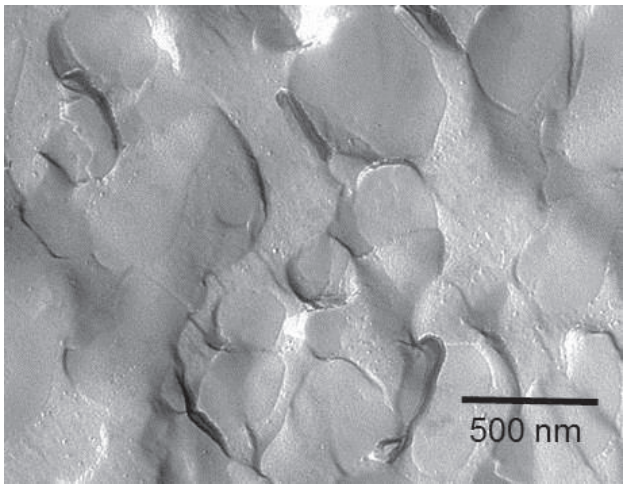
La technique de **cryofracture** (Annexe 5) permet de réaliser une empreinte topographique (réplique) après fracture d'un échantillon congelé. La congélation permet de fracturer des échantillons hydratés à température ambiante.

Sur les échantillons de liquide synovial de **chien sain** pur, préparés par cryofracture on a observé différents types de structures :

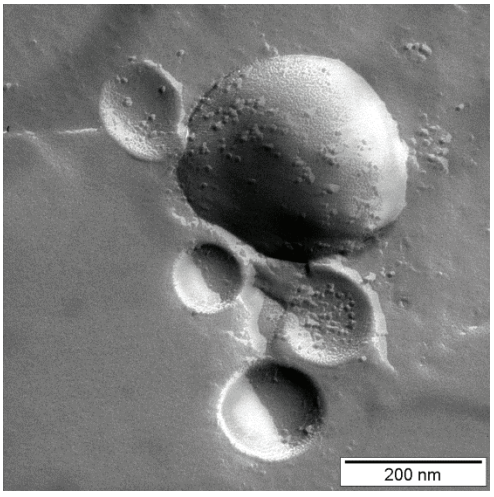
a) structures vésiculaires (fig. 31.A) avec un fond en « écailles » pouvant suggérer un réseau lipidique (figure 31.B)
b) petits vésicules isolés (figure 31.C) : la fracture s'est effectuée autour des vésicules et la structure interne de ces vésicules n'est pas visible.



A



B



C

Figure 31. Différents types de structures observées (vue d'ensemble en A et agrandissement correspondant en B) dans des échantillons de liquide synovial pur de **chien sain**, préparés par cryofracture

Les informations apportées par les prélèvements de liquide synovial sain de chien demeurant néanmoins limitées, on a considéré aussi un modèle animal plus grand : le cheval.

3.2.3. Liquide synovial de cheval

Pour **le liquide synovial de CHEVAL** on a pu réaliser l'extraction du fluide synovial pur, comme dans le cas de chien, sans destruction d'articulation par une technique de médecine vétérinaire. Pour les études structurales les échantillons ont été utilisés frais.

Comme dans le cas du chien, on a utilisé différentes techniques de microscopies électroniques pour caractériser les structures existant dans le fluide synovial.

Pour les études en **MET avec coloration négative** (Annexe 2), les échantillons ont dû être préalablement dispersés dans une solution tampon à 95% de PB.

Les images MET ont montré la présence des vésicules multilamellaires (figure 32). La distribution en taille de ces vésicules est présentée en figure 33 : cette taille s'étale entre quelques dizaines et quelques centaines de nm.

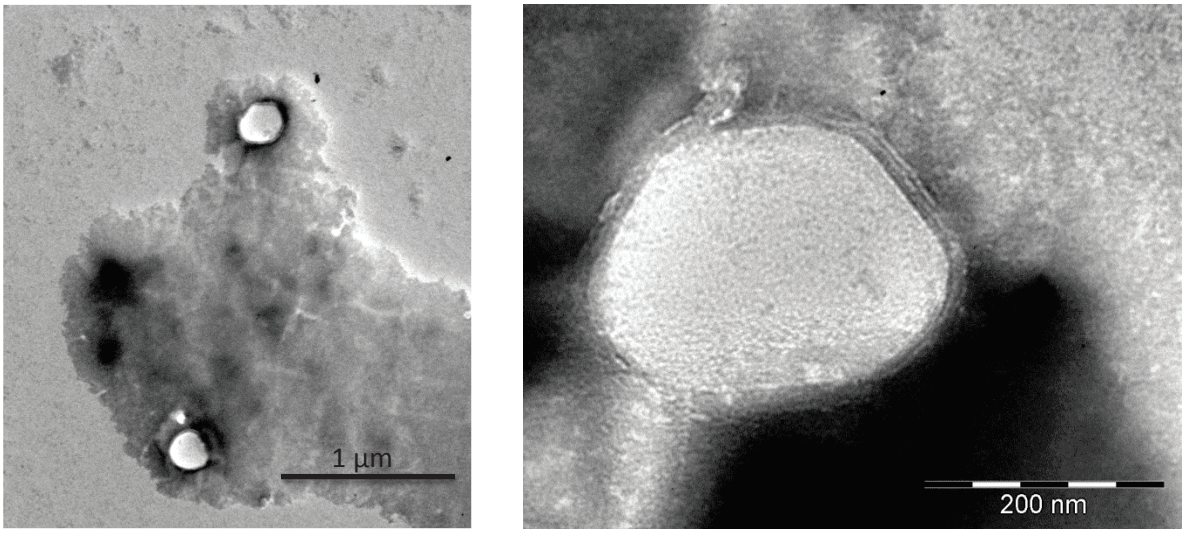


Figure 32. Vésicules multilamellaires (à grandissement croissant) dans des échantillons de liquide synovial **sain du cheval** (dilution à 95%) observés en MET avec coloration négative à l'APT 2%

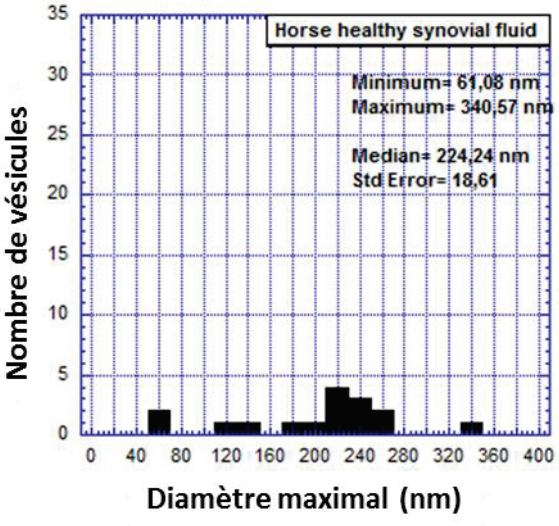
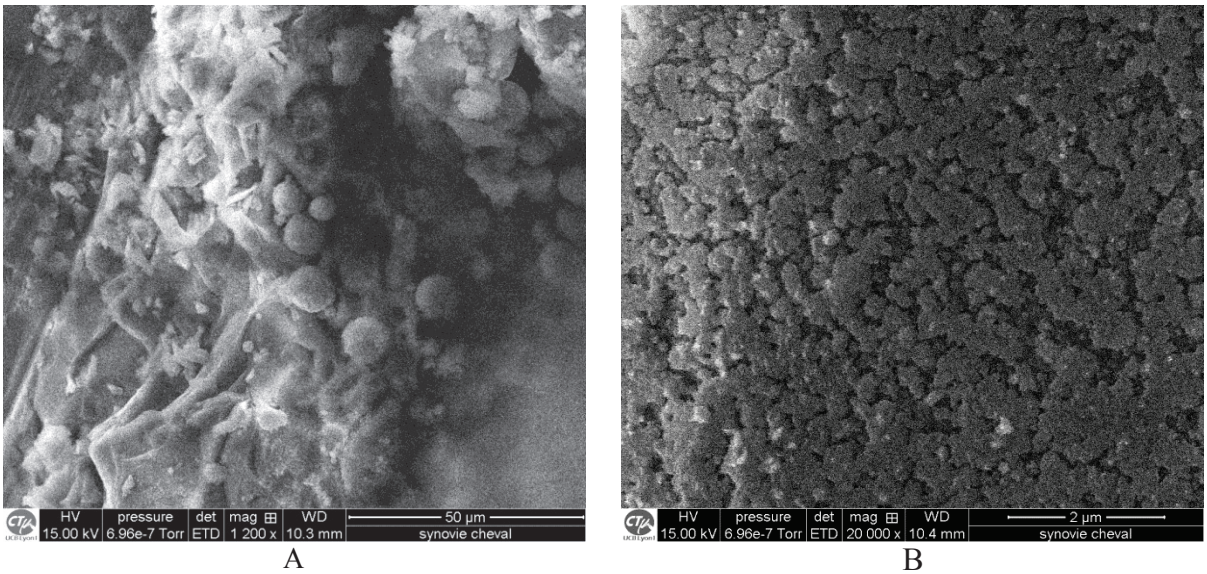


Figure 33. Distribution de la taille de vésicules
dans 2 échantillons de liquide synovial **sain de cheval**
observés en MET avec coloration négative

Pour approcher la structure du liquide synovial non dilué, on a utilisé les techniques cryogéniques.

Par la technique de **cryo-MEB** (Annexe 4) on a observé des vésicules isolés (figure 34.A) et des structures en réseaux (figure 34.B).

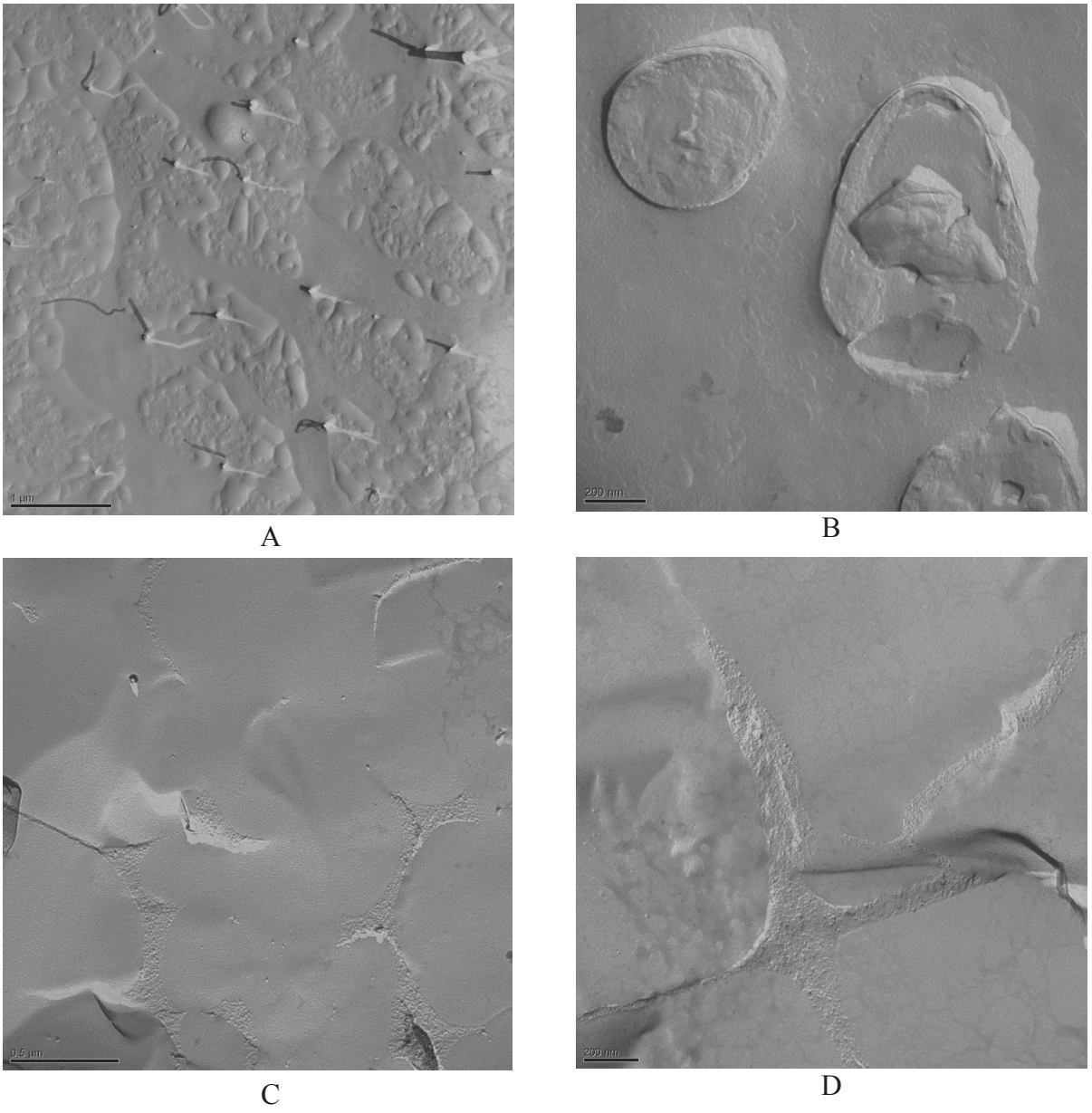


A B

Figure 34. Structures observées en cryo-MEB dans des échantillons
de liquide synovial pur de **cheval sain** (A- vésicules et B- réseaux)

Comme dans le cas du liquide synovial sain de chien, on a fait appel à la technique de cryofracture (Annexe 5) pour visualiser les structures supramoléculaires en MET avec une résolution spatiale supérieure.

Dans les échantillons de liquide synovial de **cheval sain pur**, préparés par cryofracture on a observé des structures vésiculaires uni- et bilamellaire (figure 35.A et B) et des réseaux (figure 35.C et D).



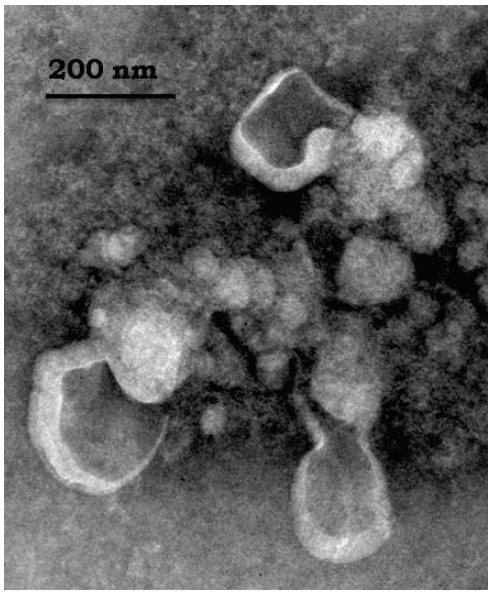
A B C D

Figure 35. Différents types de structures observées dans des échantillons de liquide synovial du **cheval sain** préparés en cryofracture : A et B – vésicules ; C et D – réseaux

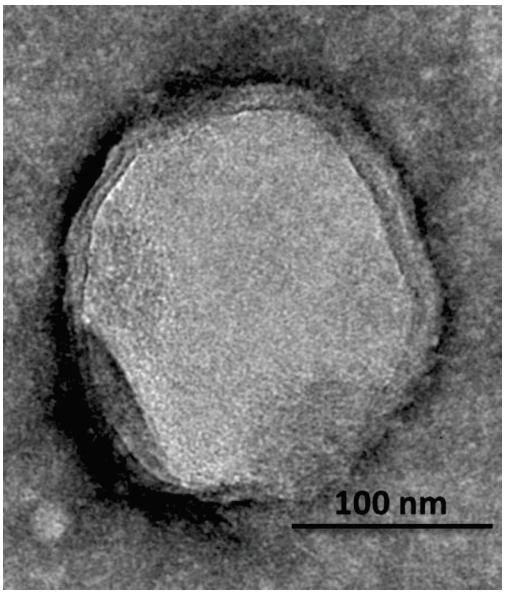
3.3.Liquide synovial humain pathologique

Comme les techniques de microscopie cryogénique n'étaient pas aisées à mettre en œuvre car nécessitant un appareillage onéreux et d'accès difficile étant donné le contexte de nos prélèvements, nous avons choisi à utiliser la MET pour étudier des prélèvements de liquide synovial préparés par coloration négative dans les cas pathologiques non inflammatoires – arthrose (OA) et inflammatoires - polyarthrite rhumatoïde (PR). L'étude a révélé une grande différence structurale entre les deux cas :

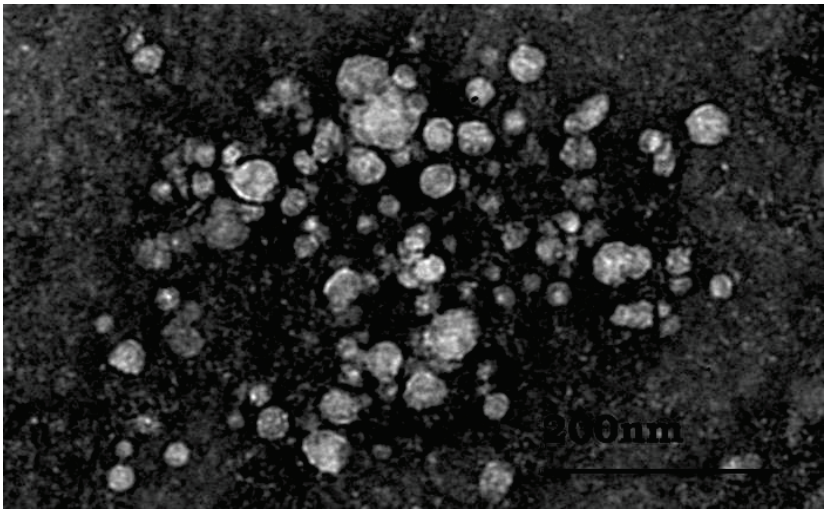
- dans le cas non inflammatoire on observe la présence de vésicules uni- et multilamellaires de taille entre quelques dizaines et 200 nm environ (figure 36A et B) ;
- dans le cas inflammatoire on n'a observé que des vésicules unilamellaires de taille entre une dizaine et une centaine de nm (figure 36 C).



A



B



C

Figure 36. Vésicules dans des échantillons de liquide synovial pathologique **humain**: A, et B - non inflammatoire (OA) ; C - inflammatoire (PR) observés (après dilution à 95%) en MET avec coloration négative à l'APT 2%

La distribution en taille de ces vésicules est présentée en figure 37, la statistique ayant été réalisée sur 6 échantillons de liquide synovial humain non inflammatoire - arthrose (OA) et 4 échantillons de liquide synovial inflammatoire - polyarthrite rhumatoïde (PR). On observe effectivement dans le cas non inflammatoire des vésicules de taille maximale plus importante que dans le cas inflammatoire.

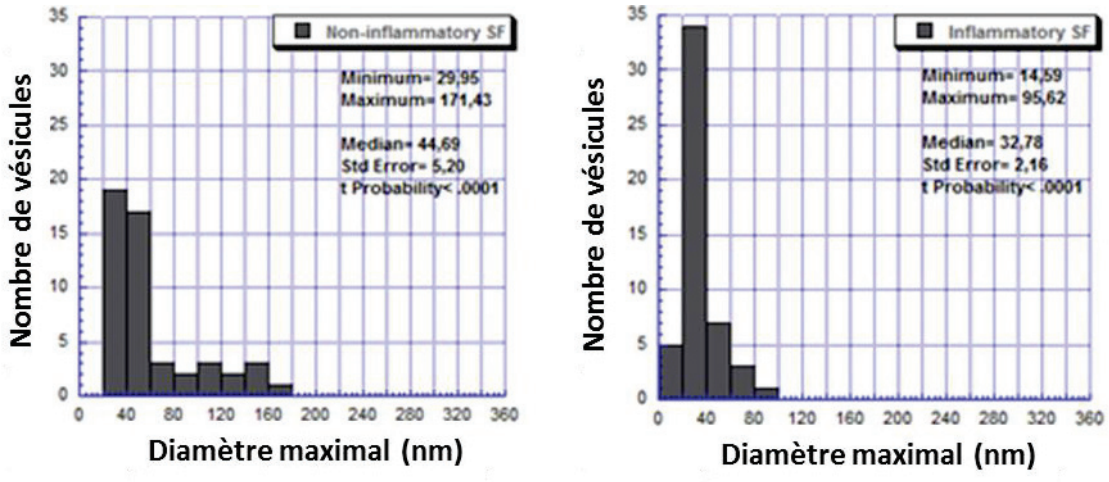


Figure 37. Distribution en taille des vésicules dans
le liquide synovial pathologique humain :
6 échantillons de LS non inflammatoire (OA) et 4 échantillons de LS inflammatoire (PR)
observés par MET avec coloration négative

Caractérisation structurale par AFM

Pour déterminer plus avant les caractéristiques structurales à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules, on a utilisé les techniques AFM (Annexe 6) permettant après visualisation des structures vésiculaires de déterminer la variation du module d'élasticité dans différentes parties de ces structures.

Comme la mesure de la valeur exacte du module d'élasticité nécessite un travail complexe pour la détermination du zéro de l'indentation (Annexe 6), travail qui n'était pas le but de cette thèse, on présentera ici une comparaison qualitative des courbes traduisent le comportement élastique de différentes parties de la structure (se reporter à l'Annexe 6 pour les valeurs des modules d'élasticité).

La figure 38 reproduit l'exemple d'images AFM en mode tapping obtenues en dispersant les échantillons dilués sur une plaque de verre recouverte de polylysine (voir détails de la préparation en Annexe 6) et les courbes force normale-indentation, elles-mêmes déduites des courbes AFM force-distance à l'approche (Annexe 6) ; dans le cas présent, la courbe de référence pour surface rigide (figure 38 C et D) a été obtenue sur la surface de verre couverte de polylysine. Les courbes force normale/indentation ont une allure parabolique (Annexe 6) et

la parabole s'écarte d'autant plus de l'axe des coordonnées que le module d'élasticité du milieu diminue.

Pour le cas non inflammatoire on a observé des grands vésicules isolés de taille quelques µm au maximum (figure 38 A) et l'on obtenu des courbes force-indentation correspondantes à un module d'élasticité plus grand à l'intérieur des vésicules qu'à l'extérieur de ces vésicules (figure 38C).

Pour le cas inflammatoire, au cours de l'imagerie une masse « gélatineuse» a été balayée sur les vésicules, de ce fait on n'a pu trouver des vésicules non couverts de cette masse « gélatineuse» (figure 38 B) d'où une courbe force-indentation correspondant à un module d'élasticité à peu près contant sur tout l'échantillon (figure 38 D).

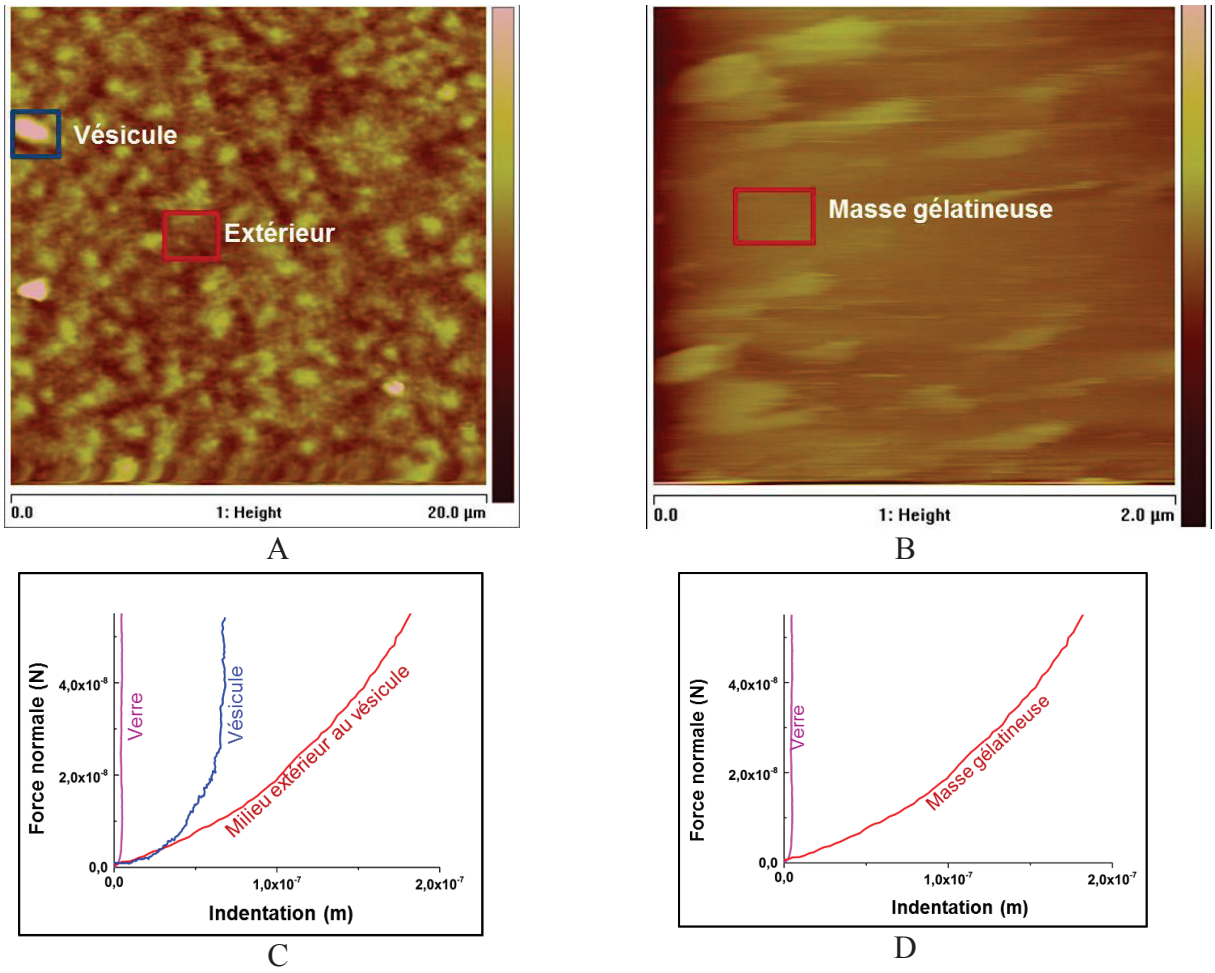
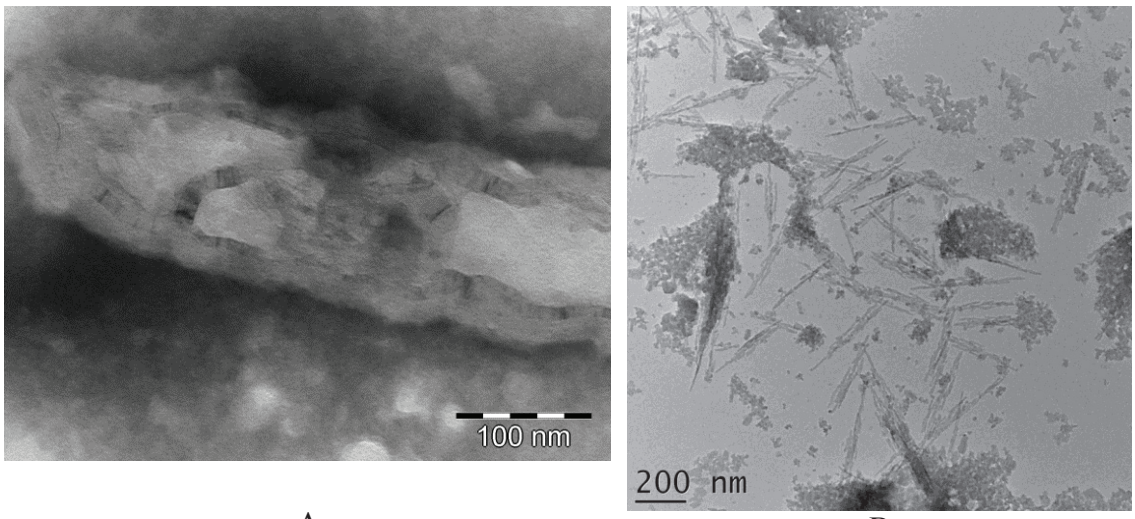


Figure 38. Images AFM et courbes force-indentation de liquides synoviaux humains : A et C – non inflammatoire (OA) ; B et D : inflammatoire (PR), incubés sur plaques de verre recouvertes de polylysine

Ces résultats en AFM nous suggèrent que dans le cas non inflammatoire, la majeure partie du gel glycoprotéique (protéines + acide hyaluronique) est incorporé dans les vésicules tandis que dans le cas inflammatoire ce gel est situé à l'extérieur des vésicules.

Présence de cristaux de cholestérol

Dans tous les prélèvements de liquide synovial pathologique on a observé la présence de cholestérol cristallisé soit sous forme de microcristaux (figure 39.A) soit sous forme d'aiguilles (figure 39.B), comme cité dans la littérature [39, 69].



A B

Figure 39. Cholestérol cristallisé sous forme de microcristaux et d'aiguilles dans des échantillons de liquide synovial humain pathologique :
A - non inflammatoire (OA) et B – inflammatoire (PR) (dilution à 95%)
observés en MET avec coloration négative à l'APT 2%

3.4.Liquides synoviaux synthétiques (mimétiques)

Etant donné les structures observées dans les prélèvements de liquide synovial sain et pathologique on a tenté de reconstituer par des voies biomimétiques (Annexe 7) plusieurs types de liquide synovial correspondant aux cas sains et pathologiques, avec le gel glycoprotéique à l'intérieur (gel-in) ou à l'extérieur (gel-out) de vésicules lipidiques.

3.4.1. Cas gel-in

Comme l'on suppose que dans le cas du liquide synovial sain le gel glycoprotéique est situé à l'intérieur des vésicules, on a élaboré deux types de liquides avec le gel inclus. La différence entre ces liquides est la concentration des phospholipides, 3 mg/ml pour le cas gel-in 1 et 0.3 mg/ml pour le cas gel-in 2 (Annexe 7). En figure 40 sont reproduites des images représentatives de ces liquides, obtenues par MET en coloration négative (Annexe 3) avec la distribution en taille correspondante des vésicules, pour le cas gel-in 1 (A et C) et gel-in 2 (B et D).

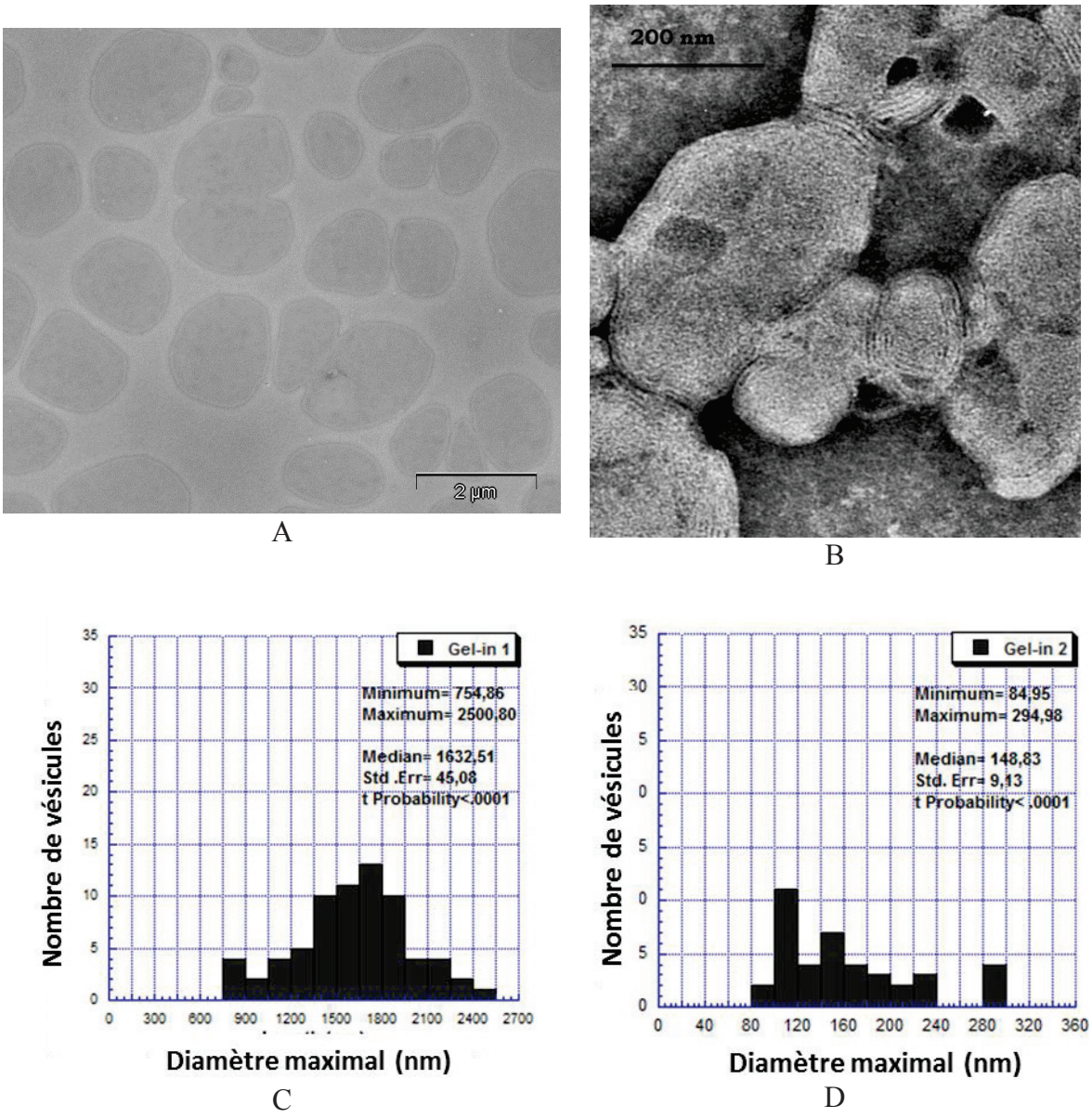


Figure 40. Images de vésicules multilamellaires observés en MET avec coloration négative à l'APT 2% et distribution en taille des vésicules dans 6 échantillons de liquide synovial synthétique gel-in1 (A et C) et gel-in2 (B et D)
(dilution à 50%)

Pour tenter de visualiser les structures supramoléculaires dans un état aussi proche que possible de celui après élaboration, on a utilisé la technique de cryofracture (Annexe 5) notamment pour le gel-in2. Des images obtenues par cette méthode sont présentées dans la figure 41: comme dans le cas du liquide synovial sain d'origine animale, on remarque la présence de grands vésicules multilamellaires avec une taille de plusieurs centaines de nm et quelquefois des réseaux à l'extérieur de ces vésicules.

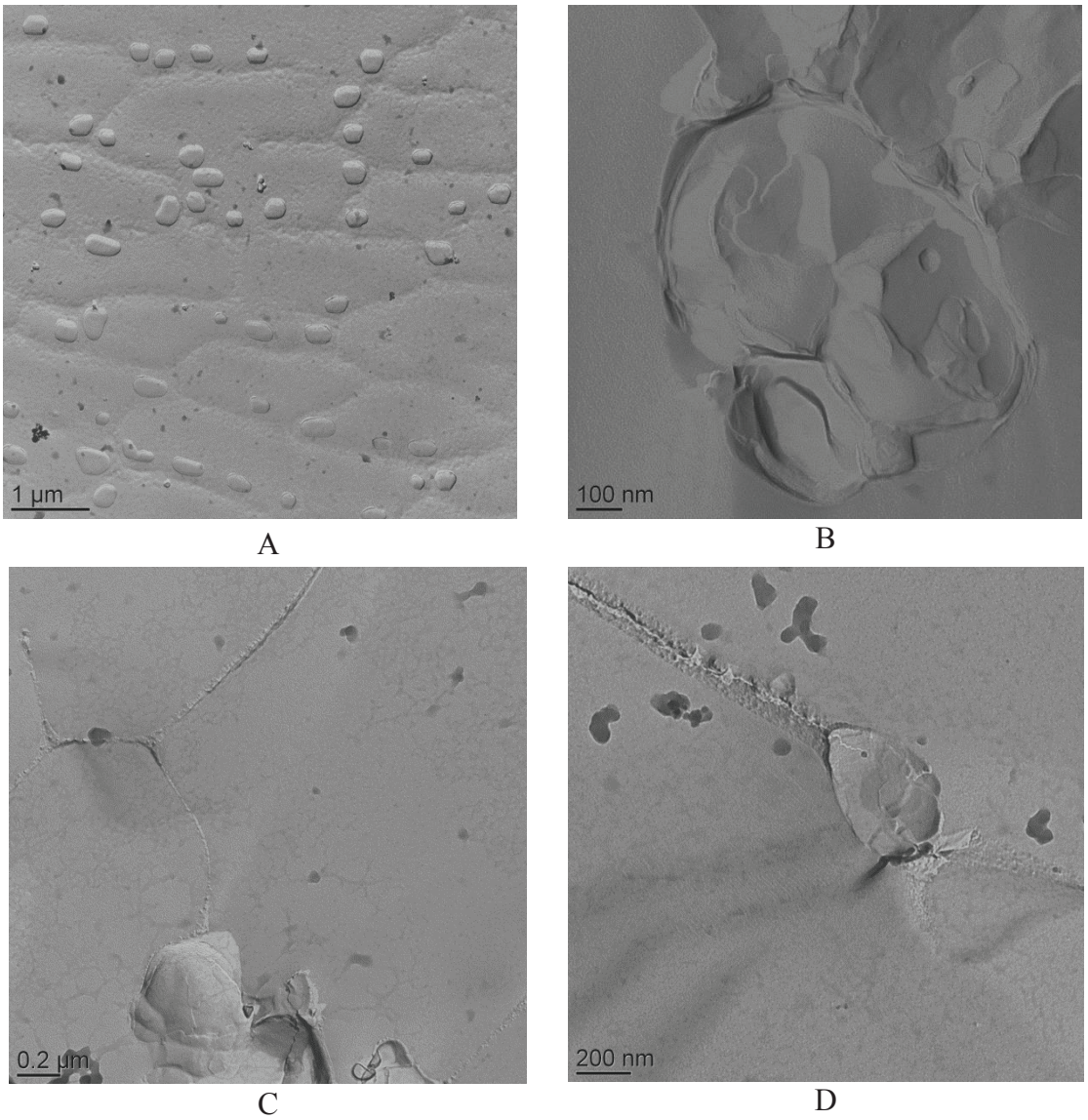


Figure 41. Différents types de structures observées dans des échantillons de liquide synovial synthétique gel-in2, préparé en cryofracture :
vésicules multilamellaires (A et B) et réseaux entre les vésicules (C et D)

3.4.2. Cas gel-out

Pour la reproduction mimétique de la structure des liquides synoviaux pathologiques (cf. 3.3), on a élaboré deux types de liquides synoviaux avec le gel glycoprotéique hors vésicules. La différence entre ces liquides est la concentration des phospholipides et la taille de vésicules, donc 3 mg/ml avec de grands vésicules pour le cas gel-out 1 et 0.3 mg/ml avec de petits vésicules pour le cas gel-out 2 (Annexe 7). Les images de ces liquides obtenues en MET, avec préparation par coloration négative (Annexe 3) et la distribution en taille correspondante des vésicules sont présentées sur la figure 42 pour les cas gel- out 1 (A et C) et gel-out 2 (B et D).

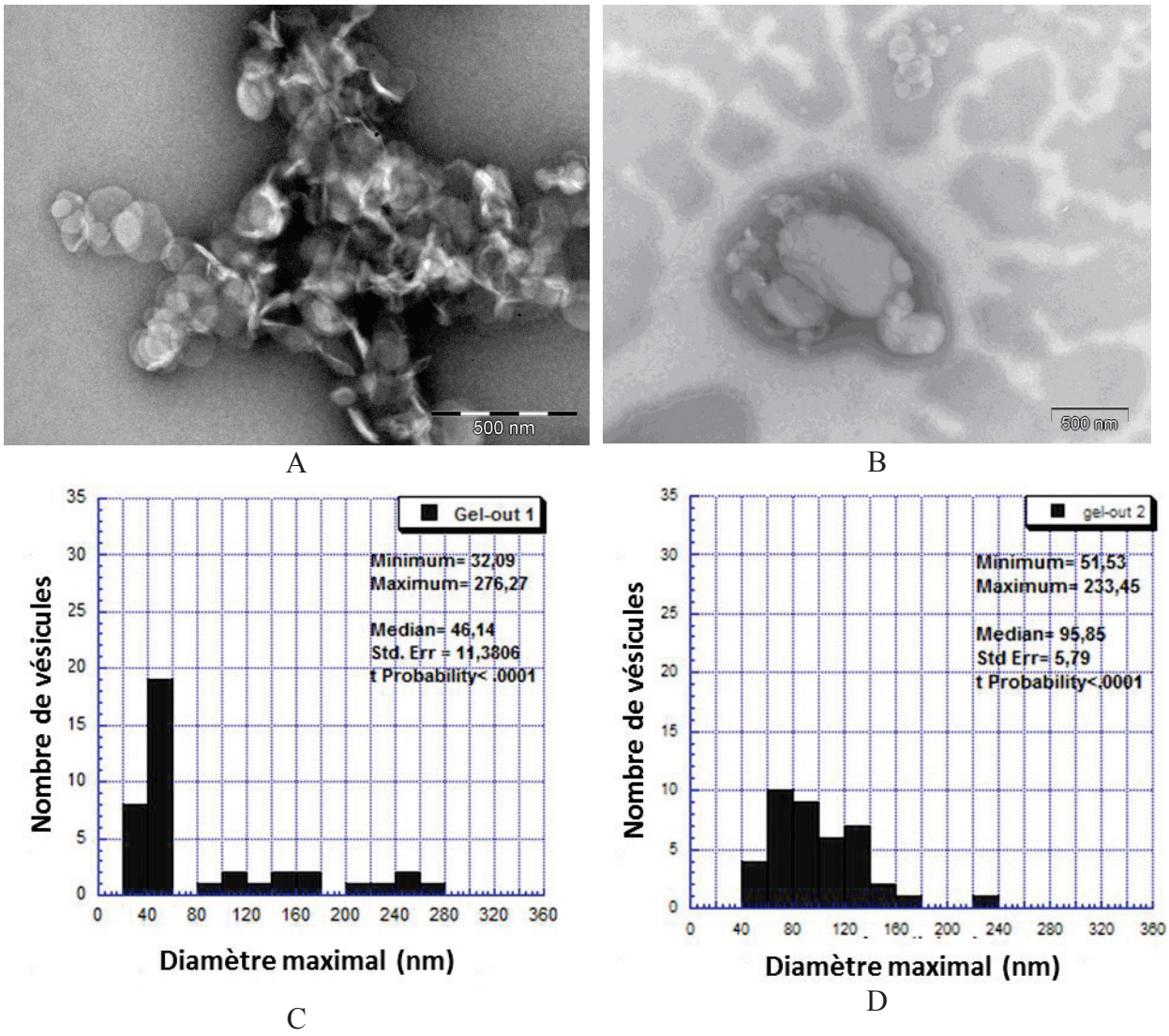


Figure 42. Images observées en MET avec coloration négative à l'APT 2% et distribution en taille des vésicules dans 6 échantillons de liquide synovial synthétique gel-out 1 (A et C) et gel-out 2 (B et D) (dilution à 50%)

3.4.3. Etudes en microscopie confocale

On a fait appel aussi à la microscopie confocale pour confirmer la localisation du composant glycoprotéique à l'intérieur ou à l'extérieur des structures vésiculaires dans les cas gel-in et gel-out. A cette fin, les lipides ont été marqués à l'aide d'une molécule Bodipy fluorescente dans le rouge et les protéines du composant protéique du liquide synovial ont été marquées à l'aide d'une molécule BSA fluorescente dans le vert. Les images en microscopie confocale (figure 43) révèlent une différence nette entre le liquide synovial synthétique gel-in, qui présente une structure vésiculaire avec des grands vésicules lipidiques visibles aussi bien en lumière rouge qu'en lumière verte ce qui signifie que les protéines (vertes) sont bien incluses dans les vésicules lipidiques (rouges), et le liquide synovial gel-out correspondant à une masse gélatineuse d'ensemble (gel glycoprotéique).

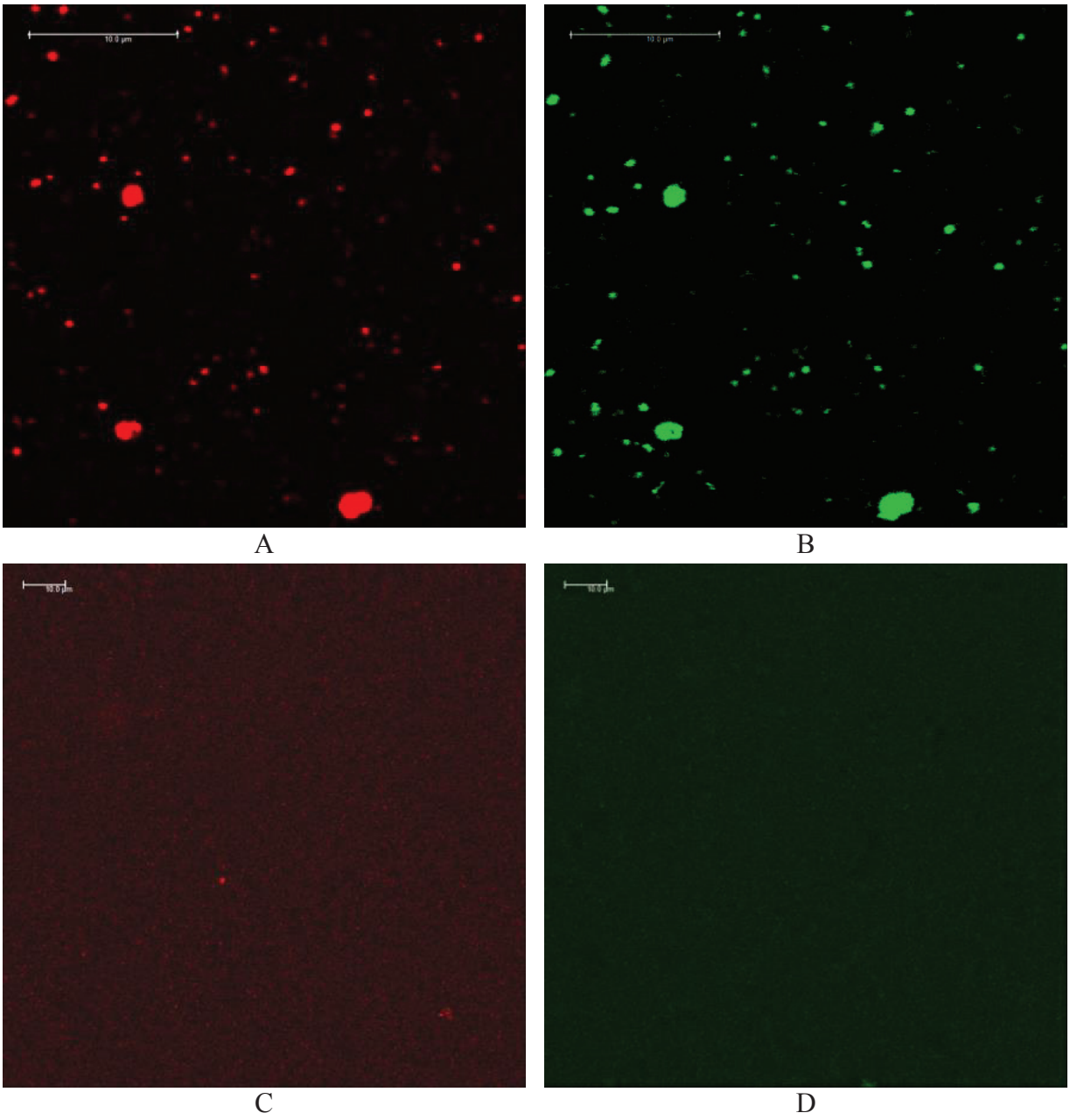


Figure 43. Images en microscopie confocale du liquide synovial synthétique gel-in (A et B) et gel-out (C et D) : A et C images confocales de la structure vésiculaire; B et D images confocale du gel glycoprotéique (la barre d'échelle représente 10µm)

3.5.Liquides synoviaux reproduits à partir de cultures cellulaires (surnageants)

Pour la reproduction de volumes de liquide synovial à partir de cultures cellulaires, appelées par la suite surnageant, on a disposé d'échantillons de milieux de culture (cf. chapitre II), obtenus à partir de cultures cellulaires de synoviocytes humains ou 'fibroblast-like synoviocytes' (FLS) (Annexe 8):

- surnageant obtenu à partir de cultures cellulaires de synoviocytes – FLS témoins, appelé surnageant sain.

- surnageant obtenu à partir de cultures cellulaires de synoviocytes traitées avec cytokines, appelé surnageant inflammatoire.

Ces surnageants ont été maintenus en culture pendant 10 ou 30 jours.

Pour les surnageants obtenus après 10 jours de culture, la préparation d'échantillons MET s'est hélas révélée infructueuse.

La figure 44 montre les images obtenues en MET avec coloration négative (Annexe 3) à partir des surnageants maintenus 30 jours en culture (Annexe 8) et la distribution en taille des structures vésiculaires pour le surnageant sain (A et C) et le surnageant inflammatoire (B et D).

Dans ces liquides synoviaux issus des cultures cellulaires on observe par cette méthode peu de vésicules.

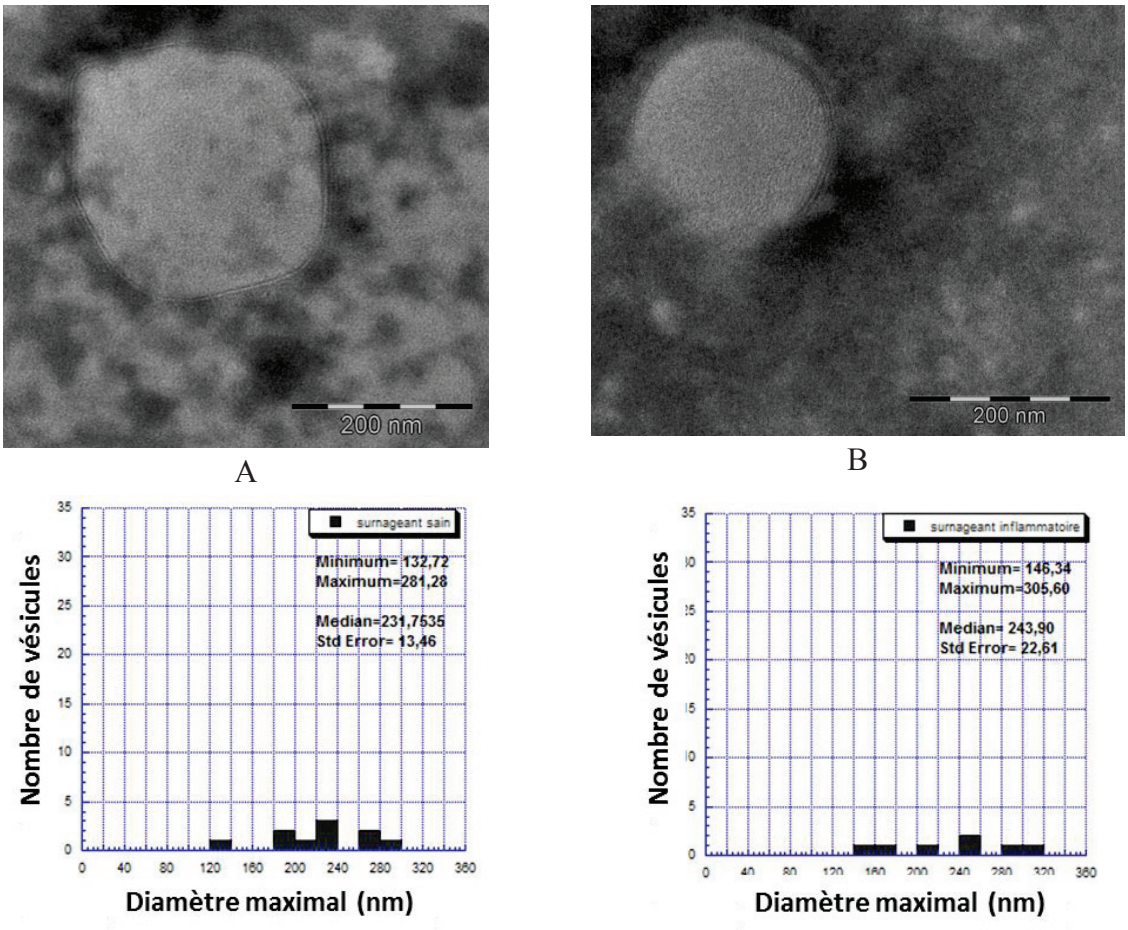


Figure 44. Images et distribution en taille des structures vésiculaires dans 4 échantillons de surnageants sain (A et C) et 4 échantillons de surnageants inflammatoire (B et D) observés en MET avec coloration négative à l'APT 2% (dilution à 50%)

L'imagerie AFM en mode tapping (Annexe 6) a révélé pour le surnageant sain la présence d'assemblages supramoléculaires sous forme de vésicules (figure 45 A et C). La taille des vésicules augmente avec le temps de maintien dans le milieu de culture : pour les surnageants maintenus dans le milieu de culture pendant 10 jours la taille est comprise entre 0.2 et 0.6 µm tandis que pour les surnageants maintenus dans le milieu de culture pendant 30 jours la taille augmente jusqu'à environ 2.5µm.
Ces vésicules ont été adsorbés sur surface de verre récouverte de polylysine et après imagerie, on a obtenu les courbes force-indentation soit sur les vésicules identifiés soit à l'extérieur (Annexe 6). L'allure générale de courbes (figure 45 E) montre qu'à l'extérieur des vésicules on observe un comportement de surface rigide tandis que le gel glycoprotéique est inclus dans les vésicules.

Comme dans le cas du liquide synovial inflammatoire au cours de l'imagerie du surnageant pathologique l'amas « gélatineux » a été balayé sur les vésicules, et l'on n'a pas pu trouver de vésicules non couverts de l'amas « gélatineux » (figure 45 B et D). On a donc obtenu une courbe force-indentation identique sur tout l'échantillon (figure 45 F).

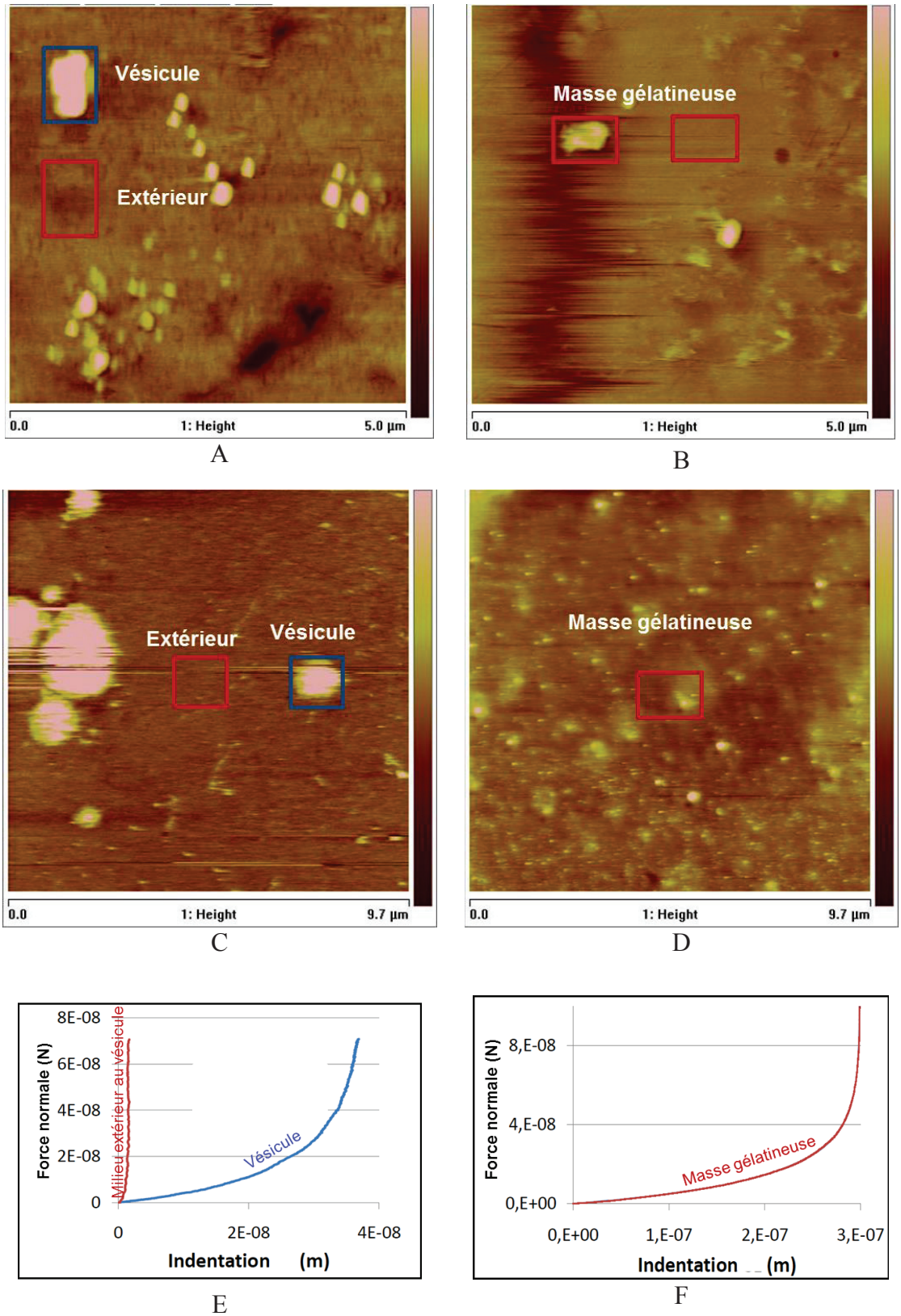


Figure 45. Images AFM après incubation sur plaques de verre recouvertes de polylysine de surnageant sain maintenu 10 jours (A) dans le milieu de culture ou 30 jours (C) et de surnageant inflammatoire maintenu 10 jours dans le milieu de culture (B) ou 30 jours (D) ; courbes force-indentation pour ces types d'échantillons (E et F)

3.7. Discussion et conclusions

Par toutes les techniques utilisées on a mis en évidence la présence de structures vésiculaires et/ou de réseaux dans les échantillons de liquide synovial.

Les méthodes cryogéniques paraissaient à priori les plus adaptées pour approcher la structure de l'état initial du liquide après prélèvement ou élaboration. Par ces méthodes on a observé des structures multilamelllaires grandes (taille jusqu'à quelques μm) et/ou des réseaux lipidiques dans le cas sain. Pour le cas sain également le mode WetSTEM de l'ESEM a permis d'observer des vésicules de taille assez importante. Ceci pourrait être lié au cycle d'évaporation durant le protocole expérimental. Néanmoins cette technique permet l'observation des échantillons hydratés éliminant l'étape de préparation qui peut modifier l'échantillon (comme la coloration négative), il vaut donc la peine de procéder à de nouveaux essais en travaillant sur le contrôle de l'évaporation de liquides observés pour éviter la coalescence des vésicules.

Par étude MET d'échantillons des liquides préparés par coloration négative, on a pu comparer tous les liquides synoviaux, et l'on a mis en évidence des différences structurales certaines entre les cas sains et pathologiques :

- dans le cas sain on note la présence de vésicules multilamellaires de diamètre maximal entre 60 à 500 nm ;

- dans le cas non inflammatoire (arthrose (OA)) on observe des vésicules uni- et multilamellaires de diamètre maximal entre 30 à 200 nm ;

- dans le cas inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde (PR)) on observe des vésicules unilamellaires de diamètre maximal entre 10 à 100 nm.

La microscopie confocale et la microscopie à force atomique nous ont permis de localiser le composant glycoprotéique à l'intérieur des structures vésiculaires pour le cas sain et à l'extérieur de structures vésiculaires dans le cas inflammatoire.

En premières conclusions l'on est amené à penser que les structures vésiculaires observées dans ce chapitre correspondent à des parois de bicouches lipidiques emprisonnant ou non du gel glycoprotéique. Pour progresser dans les investigations on doit donc procéder à des analyses biochimiques des échantillons.

Chapitre IV. Analyse des perturbations pathologiques de la composition du liquide synovial

Ce chapitre a pour objectif de caractériser la composition biochimique du liquide synovial afin de déterminer comment varie la concentration des composants principaux (protéines, glycoprotéines ou protéoglycanes, acide hyaluronique, lipides) dans le cas sain et pathologique (non inflammatoire et inflammatoire) en corrélation avec les structures déterminées dans le chapitre précédent.

Pour une analyse globale des composants chimiques, nous avons réalisé une comparaison qualitative des spectres infrarouges des liquides synoviaux sains et pathologiques.

Concernant la corrélation entre structure et biochimie du liquide synovial nous nous sommes concentrés sur plusieurs aspects :

a. *étant donné la mise en évidence de vésicules entourés par des structures multilamellaires semblables aux structures phospholipidiques, nos analyses ont caractérisé la composition lipidique et plus spécialement les différences entre les variations des différentes classes de phospholipides (PLs), et ce dans différents types de liquides synoviaux sains ou pathologiques ;*
b. *pour la détection des cristaux nonminéraux, nous nous sommes efforcés de doser les autres classes de lipides comme les triglycérides mais aussi le cholestérol ;*
c. *la concentration totale de protéines dans les échantillons de liquides synoviaux sains et pathologiques est une donnée important sachant que dans les processus inflammatoires on assiste à une extravasion de plasma sanguin qui entraine des protéines dans l'articulation, ce qui ainsi peut casser la structure phospholipidique par la précipitation de globulines [53] ;*
d. *l'action des facteurs pathologiques enzymatiques doit être analysée, à savoir :*

- *la détection de l'enzyme phosphatase alcaline (PAL) qui peut précipiter le calcium et donner naissance à des cristaux précoces de hydroxyapatite ;*
- *la détection de la phospholipase A_2 (PLA2) qui catalyse la génération de lysophospholipides (lyso-PLs) à partir de PLs et son activation par la présence de radicaux libres produit la destruction des couches lipidiques et par conséquent, celle de la structure du liquide synovial.*

L'objectif de la présente étude étant la détection des perturbations précoces des pathologies, nous avons étudié seulement des échantillons de liquide synovial sain ou pathologique dans des stades de pathologies précoces où il n'y a pas d'usure de cartilage détectable cliniquement et non plus de traces sanguines.

Ce chapitre est structuré en deux parties : une première partie expose le contexte des multiples analyses biochimiques rapportées dans les revues bibliographiques tandis que la deuxième partie expose les résultats spécifiques par rapport aux objectifs définis ci-dessus.

4.1.Contexte

Le liquide synovial (LS) est un liquide produit par la membrane synoviale, qui tapisse l'intérieur de la capsule des articulations. Il joue le rôle de lubrifiant entre les surfaces articulaires, de liquide nutritif pour le cartilage et de draineur des déchets métaboliques [92].

Il est produit par l'action commune des cellules synoviales et des échanges plasmatiques [48] et il correspond à un dialysat du plasma sanguin (produit par ultrafiltration passive à travers les capillaires de la membrane synoviale) auquel viendra s'ajouter une production locale d'acide hyaluronique.

Une partie de la micro vascularisation retrouvée dans la membrane synoviale est spécialisée et permet le passage rapide de l'eau et de solutés de faible poids moléculaire (électrolytes, glucose, des acides aminés et des protéines). Les concentrations des électrolytes et des petites molécules sont équivalentes à celles retrouvées dans le plasma [93], mais les sucres, les lipides et les grosses protéines comme l'albumine sont présents en plus faibles concentrations [76,77]. À cela viennent s'ajouter l'acide hyaluronique, sécrété par les synoviocytes de type B [94,95], qui lui confèreront sa consistance visqueuse [96], considérée depuis longtemps comme ayant le rôle le plus important dans les propriétés lubrifiantes.

4.1.1. Prélèvements

Le liquide synovial normal est transparent, il est peu abondant et son volume varie selon la taille de l'articulation entre 0.13 à 4 ml [7] il est donc très difficile à prélever. Dans une articulation humaine du genou, la quantité de liquide synovial est de l'ordre de 0.2 ml [98].

Dans le cadre de maladies pathologies articulaires, le liquide synovial, jaune paille ou jaune citrin, augmente en volume, ainsi, il est possible de l'extraire d'une articulation et de l'analyser dans un contexte pathologique. C'est pourquoi il est relativement difficile d'obtenir des informations (réalistes) au niveau du liquide synovial sain. En fonction du liquide synovial (sain ou pathologique), la quantité de ces composants varie ce qui implique une variation de pH aussi entre 7.3-7.4 pour le cas sain, 7.4-7.6 pour les arthroses et 6.6-7.6 pour les polyarthrites rhumatoïdes [99,100].

La bibliographie est vaste et dispersée en fonction de la méthode de prélèvement et de conservation (par exemple les lavages de l'articulation au détergent font sortir des molécules dans le cartilage et dans la membrane synoviale tandis que dans l'extraction post mortem le liquide synoviale est plus dilué chez les sujets décédés probablement à cause des changements hémostatiques qui influencent l'afflux de liquide synovial [101]. La thèse ici présentée se concentre sur une analyse critique de la bibliographie biochimique, en choisissant seulement les prélèvements animaux ou humains extraits sur des spécimens vivants.

4.1.2. Analyses globales

On appelle analyses globales les analyses donnant des informations qualitatives et comparatives concernant les composants biochimiques entre différentes espèces ou pour la même espèce entre les cas sain et différents degrés de pathologies.

La spectroscopie infrarouge IR est l'une de ces techniques. Chaque catégorie de composant du liquide synovial correspond à un domaine spectral en fonction des vibrations des chaines chimiques caractéristiques. Sur le spectre infrarouge du liquide synovial (Tableau 2) les domaines situés entre 3650-3000 cm^{-1} et 1690-1470 cm^{-1} qui sont les domaines spectraux des protéines associés à la vibration des liaisons N-H, C-N et C-O [102].

Les phospholipides, parmi les plus importants composants du point de vue tribologique pour le liquide synovial présentent une bande caractéristique entre 1800-1740 cm^{-1} associée à la vibration de la double liaison P = O. Le domaine spectral 1000-1200 cm^{-1} correspond à la vibration des liaisons C-O, caractéristique de l'acide hyaluronique, donc des dégradations dans ce domaine peuvent être attribuées à une dégradation de l'acide hyaluronique dans les cas pathologiques [103].

Composant	**Domaines caractéristiques (cm^{-1})**	**Pics caractéristiques (cm^{-1})**	**Liaisons caractéristiques**
Phospholipides	1800-1740	1745	P=O
Protéines	3650-3000 et 1690-1470	3300, 3170, 1650, 1560	N-H, C-N, C-O
Acide hyaluronique	1000-1200	1070	C-O

Tableau 2. Domaines spectraux et pics caractéristiques pour les composants du liquide synovial [102,103]

4.1.3. Analyses particulières à chaque composant

Par rapport à la chronologie de la bibliographie sur les composants du liquide synovial, dans les années 60 les études se sont surtout intéressées aux protéines. Apres les années 70 avec l'évolution des technologiques, étant donné que différents polymères modifient la rhéologie, l'intérêt a été porté sur l'acide hyaluronique et son poids moléculaire. A partir des années 2000, les études de Hills ont commencé à s'intéresser au rôle tribologique des lipides qui forment des couches avec un rôle important en lubrification.

4.1.3.1.Protéines et glycoprotéines

Les protéines représentent les composants les plus abondants dans le liquide synovial. La détermination des protéines a toujours été établie par la méthode de « Lowry ». Cette méthode, qui est un essai colorimétrique basé sur la liaison des complexes cuivre-protéines à

un réactif « Folin phenol », fût largement utilisée, mais a été récemment remplacée par une méthode sensible et rapide, la méthode de « Bradford », qui implique de mesurer le changement de couleur/teinte d'un bleu de diméthyl-méthhylène en présence d'une faible quantité de protéine.

La méthode de Bradford possède cependant ses propres limites. Tout d'abord, l'absorbance totale est mesurée à une longueur d'onde (donnée), et ne mesure donc pas individuellement les protéines. Les effets potentiellement significatifs des protéines mineures telles que la «lubricine» sont négligées par les méthodes qui ne mesurent que la concentration totale de protéines. De plus, puisque l'affinité de teinte dépend des acides aminés spécifiques, chaque protéine a une absorbance différente. De ce fait, à une concentration donnée, l'albumine peut absorber plus de lumière que la γ-globulin. Ainsi, dans une solution inconnue, cet essai n'apporte qu'une mesure relative des protéines totales présentes (comparativement à une albumine standard).

La concentration des protéines dans le liquide synovial prélevé des articulations (Tableau 3) est très variée dans la littérature [104,105,106] et McCarty a donné la plage normale pour le liquide synovial sain entre 12 et 30 mg/ml [109].

Liquide synovial	**Sain**	**OA**	**PR**
Protéines (mg/ml)	12-30	24-44	26-63

Tableau 3. Variation de concentration en protéines totales
pour le liquide synovial sain ou pathologique (arthrose –OA /polyarthrite rhumatoïde PR)
[104,105,106,107,108,109]

Les analyses électrophorétiques de protéines ont montré une quantité plus grande d'albumine, 7-18 mg/ml d'albumine [110], que de globulines qui sont entre 0.5-2.9 mg/ml des globulines [111]. Comme indiqué dans le Tableau 1, la concentration des protéines totales, déterminées par des analyses colorimétriques, augmente jusqu'à 44 mg/ml dans le liquide synovial non-inflammatoire et de 63 mg/ml dans le liquide synovial inflammatoire [112], avec une concentration d'albumine de 20-39 mg/ml et de globuline à 15.4 mg/ml [113,114] cela à cause du passage pathologique de ces molécules depuis le plasma à travers la membrane synoviale.

Comme mentionné dans le chapitre I, la lubricine est un composant important dans la biolubrification du liquide synovial même si elle se trouve en quantité faible (~0.02 mg/ml), quantité qui augmente cependant dans les cas pathologiques à cause de l'usure du cartilage [7], c'est pour cela que des tests ELISA ont été utilisés afin d'étudier la variation de cette molécule du sain au pathologique.

4.1.3.2.Acide hyaluronique

La concentration et le poids moléculaire de l'acide hyaluronique (AH) sont aussi dépendants du type de liquide synovial (sain ou pathologique).

En 1953, Ogston rapporte que placer du liquide synovial dans un environnement au pH faible permet la liaison de l'acide hyaluronique avec les protéines. Une limite de cette méthode est que cela dépend des protéines dans le liquide/fluide, qui peut varier, pour déterminer la concentration d'acide hyaluronique dans le liquide. Ainsi, les 4mg/mL reportés par Stafford sont probablement moins précis que les rapports ultérieurs. Quelques années plus tard, Balazs utilise la hyaluronidase pour digérer l'acide hyaluronique et ensuite estimer la concentration en acide hyaluronique. Cette méthode est considérée plus fiable que la précédente, de ce fait l'intervalle de Balazs est considéré comme représentatif. D'autres méthodes incluant des réactions carbazole (a.k.a. la méthode Dische et centrifugation) ont été utilisées, et ont établi des résultats similaires à ceux de Balazs. Kongtawerlert et al. ont développé plusieurs méthodes pour déterminer la concentration d'acide hyluronique en utilisant des essais d'affinité ELISA. Ces méthodes dépendent de l'obtention d'anticorps monoclonaux rares, et n'est donc pas été largement utilisées. Actuellement, la réaction carbazole est la méthode plus souvent utilisée pour déterminer la concentration de l'acide hyaluronique. D'autre part, de toutes les méthodes qui ont été utilisées pour estimer le poids moléculaire de l'acide hyaluronique dans le liquide synovial, la chromatographie d'exclusion stérique est la plus largement utilisée.

Les résultats dans la littérature pour l'acide hyaluronique restent dans un intervalle assez limité (Tableau 4) dans le cas sain la concentration est de 1.5- 4 mg/mL avec un poids moléculaire de 2 MDa, tandis que dans le cas du liquide synoviale pathologique non-inflammatoire la concentration est de 1mg/mL et beaucoup plus faible (inferieur à 1mg/mL) dans le cas du liquide synoviale inflammatoire [101] avec un poids moléculaire qui diminue en même temps, ce qui implique une viscosité plus faible pour le liquide synovial pathologique. [115] Ces modifications sont dues à la dépolymérisation des longues chaines polysaccaridiques par des radicaux libres produits par les leucocytes.

Liquide synovial	**Sain**	**OA**	**PR**
AH (MDa)	2	2.4 – 3.2	0.6
AH (mg/ml)	2 -4	0.8 -1.5	0.7 – 1.1

Tableau 4. Variation du poids moléculaire et de la concentration de l'acide hyaluronique pour le liquide synovial sain ou pathologique (arthrose –OA /polyarthrite rhumatoïde PR) [101,115,116]

4.1.3.3.Lipides

Les premières méthodes utilisées pour mesurer la concentration en lipides ont employé la chromatographie sur couche mince, nécessitant beaucoup de temps ou de main-d'œuvre. Ces méthodes ont entrainé une grande variété de résultats, ces résultats sont liés à la technique utilisée et à la méthode de prélèvement et conservation des échantillons. On trouve aussi des travaux plus récents qui ont employé une technique colorimétrique en utilisant la libération de choline par hydrolyse des phospholipides par la phospholipase D.

Dans la composition du liquide synovial, on trouve trois catégories principales de lipides : triglycérides, phospholipides et cholestérols.

Les études sur les articulations inflammatoires ont mis en évidence avec une méthode enzymatique que la concentration de **triglycérides** (TG) entre le liquide synovial et le sérum (Tableau 5) dépend de la maladie articulaire, car le processus inflammatoire affecte aussi la membrane synoviale [117].

Triglycérides (mg/ml)	**OA**	**PR**
Sérum	1.09	0.93
Liquide synovial	0.16	0.24

Tableau 5. Concentrations de triglycérides du sérum et de liquide synovial pathologiques (arthrose –OA /polyarthrite rhumatoïde PR) [117].

Même si dans le cas où la concentration de lipides est environ de 3mg/ml, la concentration des **phospholipides** (PLs) est seulement de 0.1– 0.2 mg/ml et elle augmente en fonction de l'état pathologique jusqu'à 3.7 mg/ml, due au passage pathologique des composants du plasma dans le liquide synovial (Tableau 6).

Liquide synovial	**Sain**	**OA**	**PR**
Phospholipides (mg/ml)	0.1 – 0.2	0.2 – 0.3	1.5 – 3.7

Tableau 6. Variation de la concentration des phospholipides pour le liquide synovial sain ou pathologique (arthrose –OA /polyarthrite rhumatoïde PR) [101,116, 118]

Même avec une faible concentration lipidique on peut créer de 4 à 9 structures multilamellaires couvrant la totalité du cartilage articulaire (Annexe 15).

En ce qui concerne la concentration sur les différents types de phospholipides dans le liquide synovial, pour le liquide synovial pathologique, en utilisant des analyses chormatographiques la litterature mentionne que le profil lipidique du liquide synovial est proche de celui de serum (Figure 46) [116]. Ces profils sont aussi proches puisque, lors de l'évolution pathologique articulaire, la réaction inflammatoire locale détermine une augmentation de la diffusion à travers la membrane synoviale.

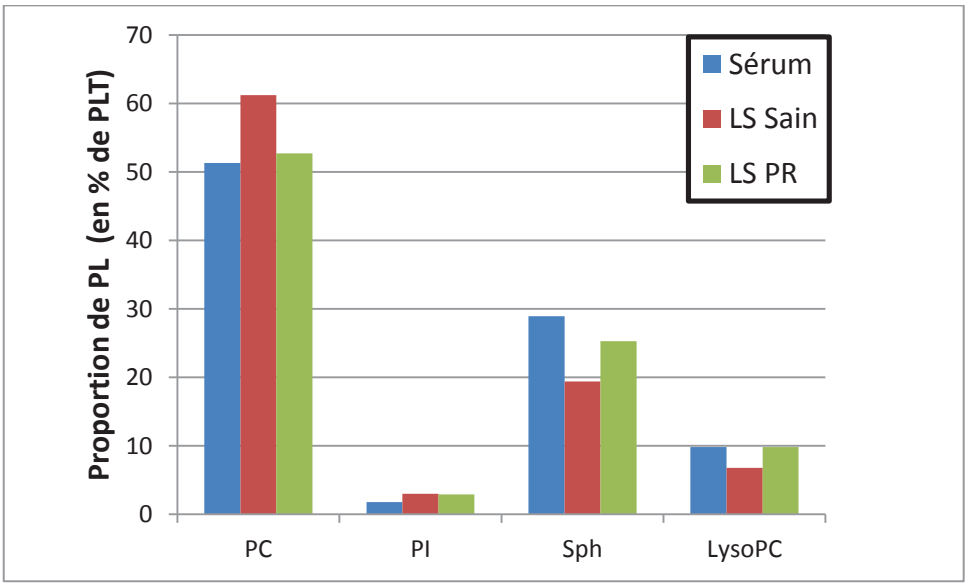


Figure 46. Résultats comparatifs en pourcentage de phospholipides totaux (PLT) pour le sérum et le liquide synovial sain ou pathologique (polyarthrite rhumatoïde PR) [116].

Le **cholestérol** se trouve en concentration faible (0.066- 0.075 mg/ml) [IV.13] dans le liquide synovial sain. Sa concentration peut augmenter jusqu'à 0.9 mg/ml [49] (Tableau 7) en cas de perméabilité vasculaire synoviale accrue et s'associe souvent à la dégénérescence spumeuse des macrophages du liquide articulaire, qui phagocytent les lipoprotéines sans pouvoir parfaitement métaboliser les lipides que ces protéines transportent. [62]

Liquide synovial	**Sain**	**OA**	**PR**
Cholestérol (mg/ml)	0.066 – 0.075	0.27 – 0.8	0.69 – 0.9

Tableau 7. Variation de la concentration de cholestérol pour le liquide synovial sain ou pathologique (arthrose –OA /polyarthrite rhumatoïde PR) [49,116, 119]

4.1.3.4.Cristaux

La recherche de microcristaux dans le liquide articulaire est l'un des examens clés pour le clinicien, car il permet un diagnostic rapide et fiable d'arthropathie microcristalline par l'identification des cristaux pathogènes dans le liquide examiné.

La technique de routine de recherche des microcristaux dans le liquide articulaire consiste en l'observation du liquide synovial à l'aide d'un microscope photonique en lumière polarisée. Cet examen permet l'identification des microcristaux par leur forme, et surtout par leur pouvoir de déviation de la lumière qui est dû à l'organisation régulière et répétitive des molécules formant le cristal, et qui diffère selon les propriétés intrinsèques du cristal observé. C'est une technique a priori simple, peu coûteuse, et rapide, dont la valeur diagnostique reste excellente, même lorsque la ponction articulaire est faite en dehors des phases d'inflammation [120]. La fiabilité de cet examen pose cependant problème, comme le savent bien les

cliniciens et comme l'ont montré plusieurs études au cours desquelles des résultats divergents ont été obtenus en confiant le même liquide articulaire à plusieurs laboratoires [121,122]. Une optique de qualité, une certaine rigueur dans la réalisation de l'examen afin d'éviter les artefacts, de la patience et, incontestablement, une certaine expérience sont les quatre conditions de la réussite.

L'identification des cristaux de phosphate de calcium, apatites en particulier, dans le liquide articulaire pose des problèmes particuliers, du fait de leur petite taille, qui est inférieure au pouvoir de résolution de la microscopie optique. La coloration par le rouge alizarine S colore en rouge vif les amas de microcristaux d'apatite dont la taille varie de 1 à 15 mm, et constitue une bonne méthode de dépistage des cristaux de phosphate de calcium dans le liquide articulaire [123,124]. Cependant, cette coloration n'est pas spécifique de l'apatite et colore tous les cristaux calciques et ses résultats doivent, en toute rigueur, être confirmés par une autre méthode, la microscopie électronique à balayage [125], ou la microscopie à transmission.

La microscopie électronique à transmission est parfois nécessaire à la mise en évidence de cristaux de pyrophosphates de calcium dihydraté de trop petite taille pour être vus en microscopie photonique [126].

Dans les prélèvements qui ont été étudiés dans cette thèse, les observations cliniques par microscopie en lumière polarisée n'ont pas mis en évidence la présence des cristaux.

Suite à cette recherche par microscopie photonique en lumière polarisée, pour confirmer ou non la recherche de cristaux par microscopie optique, on a utilisé la microcopie électronique (cf. 3.3.2) et le dosage de la phosphatase alcaline (PAL) permet de confirmer ou non la présence de cristaux.

4.2.Positionnement de la présence étude par rapport au contexte

Pour avoir des informations comparatives entre les échantillons sains et pathologiques nous avons utilisé une spectroscopie infrarouge pour les composants biochimiques généraux et la concentration des protéines a été déterminée par la méthode Bradford.

Puisque les structures détectées dans le chapitre III font penser aux assemblages supramoléculaires de type lipidique, les analyses biochimiques de cette thèse ont eu pour but de vérifier les dosages de composants lipidiques par chromatographie en couche mince en 2D (CCM 2D) et chromatographie en phase gazeuse (GC).

Pour les échantillons pathologiques, (i) l'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée par spectrophotométrie et (ii) nous avons mis en évidence l'action de la PLA2 à l'aide du dosage des marqueurs d'inflammation (le LTB4 et le 5-HETE) par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

4.3.Synthèse des résultats

4.3.1. Prélèvements

Etant donné qu'il est impossible d'avoir accès à des prélèvements de liquide synovial humain sain pour des raisons d'éthique médicale et du fait de la faible quantité de liquide synovial dans une articulation saine, nous avons choisi de travailler sur des modèles animaux, dans l'hypothèse qu'il n'y a pas de grosses différences dans la composition biochimique du liquide synovial. [127]. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de Fuch et al. qui montrent que la composition en phospholipides du sérum et du liquide synovial est comparable à celle du liquide synovial humain, avec pour seule différence les habitudes alimentaires différentes des uns (herbivores) et des autres (carnivores/ omnivores) [128].

Ainsi, nous avons utilisé des échantillons de liquide synovial sain d'origine animale (chien et cheval) et des échantillons de liquide pathologique (pathologies précoces non-inflammatoires ou inflammatoires) humain. Etant donné les quantités faibles de ces échantillons, du point de vue biochimique nous avons étudié 2 échantillons d'origine animale (1 chien et 1 cheval) et 6 échantillons d'origine humaine (4 non-inflammatoires et 2 inflammatoires). Pour chaque échantillon on a disposé la plus part de temps d'un aliquot qui a fait l'objet des dosages présentées ici.

Les échantillons ont été conservés différemment en fonction des analyses établies. Ainsi, nous avons utilisé :

- des échantillons de liquide synovial pur congelés « sur place » en azote liquide pour déterminer la concentration des protéines par méthode Bradford et la présence de cristaux par l'analyse par spectroscopie infrarouge ;

- des échantillons de liquide synovial « solubilisés sur place » dans des éprouvettes en verre contenant chacun 1 ml de liquide synovial auquel on ajoute 3 ml d'éthanol, 0.15 ml de déféroxamine (chélateur d'ions de fer) et 0.5 ml de hydroxytoluène butylé (antioxydant).

Afin de poursuivre le protocole expérimental d'analyse biochimique, les échantillons ont été stockés à -20°C.

4.3.2. Analyse par spectroscopie infrarouge

Par l'analyse par spectroscopie infrarouge (Annexe 9) ont été identifiées les différences biochimiques liées à une variation de concentration de chaque macromolécule qui compose le liquide synovial entre les échantillons de liquide synovial sain et pathologique.

Par spectroscopie infrarouge nous avons identifié les domaines spectraux infrarouge qui correspondent aux composants principaux du liquide synovial par des substances chimiques pures : protéines (Bovin Serum Albumine A3059, Sigma-Aldrich,γ-Globuline G4386, Sigma-Aldrich), lipides (DLPC – 1,2-diauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine - 770335, Avanti Polar Lipids) et acide hyaluronique (H7630 Sigma Aldrich) (figure 47). Les spectres pour ces substances (figure 47) ont été obtenus par l'addition des trois spectres.

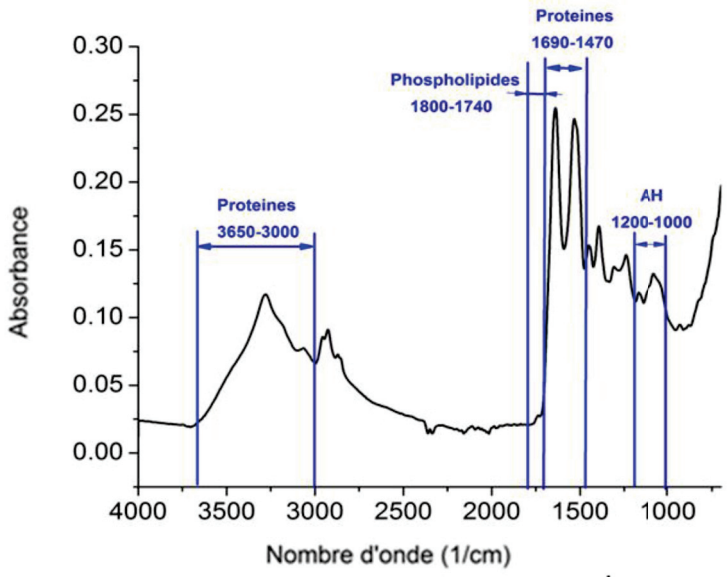


Figure 47. Spectre infrarouge et domaines spectraux spécifiques des substances correspondant aux composants du liquide synovial

Pour identifier les différences de composition entre les différents types de liquide synovial : sain, non-inflammatoire et inflammatoire, le spectre a été divisé en deux domaines qu'on considère comme les plus importants : 3800-2600 cm^{-1} et 1800-800 cm^{-1} pour éliminer les artefacts. Dans la figure 48 les spectres de trois types de liquide synovial testés sont représentés.

Par spectroscopie infrarouge on ne peut pas obtenir des informations quantitatives, elle permet seulement d'obtenir des informations qualitatives sur la composition du liquide synovial par l'identification des pics correspondants à chaque composant principal. nous avons trouvé des pics caractéristiques pour les composants principaux en concordance avec les valeurs trouvées dans la littérature (Tableau 2).
Ainsi :

- Pour les protéines nous avons identifié les pics à 3300, 3190, 1650, 1560 cm^{-1}
- Pour les phospholipides nous avons identifié le pic à 1740 cm^{-1}
- Pour l'acide hyaluronique nous avons identifié le pic à 1070 cm^{-1}

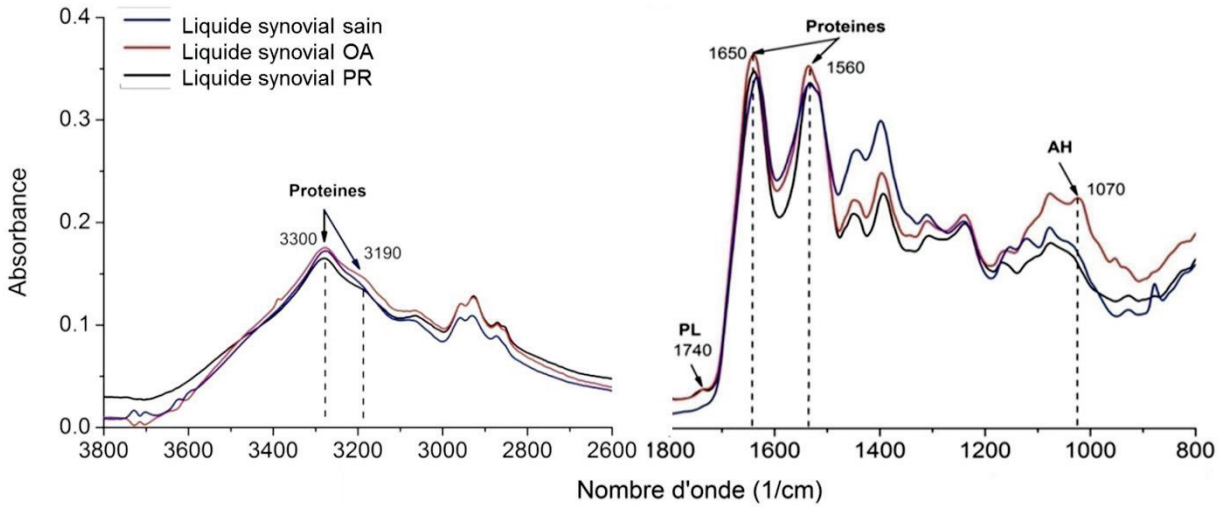


Figure 48. Domaines d'intérêt dans le spectre infrarouge
pour le liquide synovial sain, non inflammatoire (OA), inflammatoire (PR)
et pics correspondant aux composants principaux

On notera qu'il y a des différences entre le liquide synovial sain et pathologique même entre le liquide synovial inflammatoire et non-inflammatoire :

- pour les protéines on obtient une absorbance plus élevée pour le cas pathologique (OA et PR) à 3300, tandis que pour les autres pics l'absorbance est plus grande pour le cas d'OA et aucune différence entre le cas inflammatoire (AR) et sain n'est observée ;
- pour les phospholipides on observe une différence entre le cas sain /non inflammatoire avec les absorbances les plus élevées et le cas inflammatoire qui a une absorbance un peu plus faible ;
- le pic caractéristique pour l'AH présente l'absorbance la plus élevée pour le cas non inflammatoire et moins faible pour le cas inflammatoire.

4.3.3. Protéines et glycoprotéines

Les concentrations de protéines totales obtenues par la méthode Bradford (Annexe 10) présentées dans le Tableau 9 nous montrent qu'il y a une importante augmentation des protéines dans les cas pathologiques. Cela est dû probablement à un dysfonctionnement de la membrane synoviale qui normalement filtre les protéines plasmatiques (protéines du sang) et donc, dans ce cas, une importante concentration des protéines plasmatiques traversent la membrane synoviale et arrivent dans le liquide synovial. Aucune différence entre la concentration des protéines dans le liquide synovial pathologique inflammatoire ou non-inflammatoire n'est observée mais les valeurs sont aussi proches des valeurs trouvées dans la littérature.

LS	**Sain**	**OA**	**PR**
Protéines (mg/ml)	27.81	52.53 - 66.76	68.2 - 74.17

Tableau 9. Concentration de protéines totales dans 1 échantillon LS animal sain, 4 échantillons LS humain OA et 2 échantillons LS humain PR

La détection et les concentrations de glycoprotéines (lubricine) ont été obtenues par la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) en utilisant deux anticorps anti-lubricine humain et souris, l'un dirigé contre le domaine N-terminal, l'autre contre le domaine C-terminal (Annexe 11). Aucune valeur absolue du contenu en lubricine par dosage ELISA n'a été obtenue puisque la courbe d'étalonnage n'a pu être établie par manque de lubricine purifiée ; ainsi, les valeurs de la densité optiques sont arbitraires.

Les meilleures réactions ont été obtenues pour les échantillons de rat et d'homme, et les plus faibles pour le chien et le cheval (figure 49), les résultats pour le chien et le cheval peuvent être expliqués à cause des anticorps utilisés qui ne sont pas spécifiques pour ces espèces.

Ces résultats nous montrent une augmentation de la lubricine dans les cas pathologiques : 1.66 fois dans la PR et jusqu'à 1.81 fois dans l'OA, augmentation probablement due du fait de l'usure du cartilage [7]. Ces valeurs ont été rapportées aux échantillons de rat sain dans l'hypothèse qu'il n'y a pas de grandes différences de la composition de liquide synovial entre les espèces (mais cette hypothèse reste à valider.)

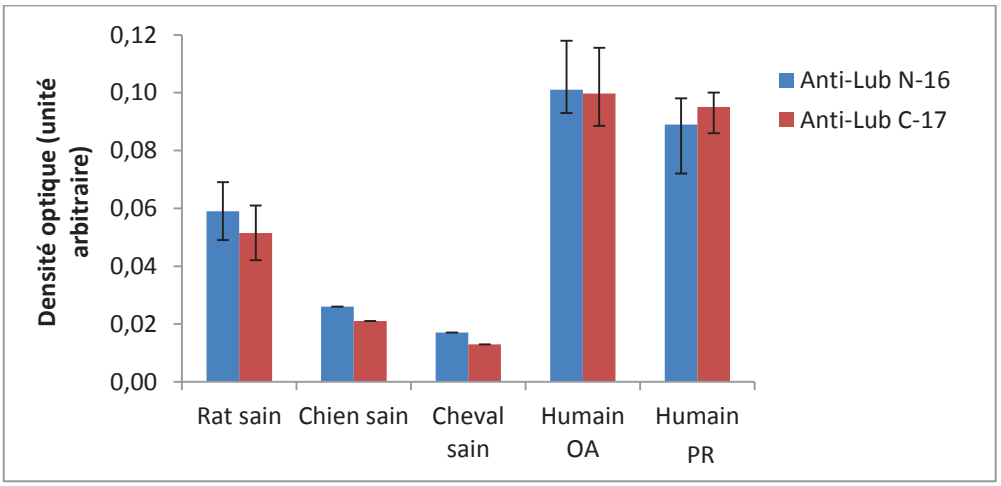


Figure 49. Détection de la lubricine par la méthode Elisa.
Hystogramme des valeurs médianes affectées de l'écart entre les valeurs experimentales minimale et maximale obtenues sur 4 échantillons rat, 1 échantillons chien, 1 echantillons cheval, 4 échantillons OA et 2 échantillons PR

4.3.4. Lipides

Dans le liquide synovial sain il y a environ 3 mg/ml de lipides totaux mais pour les cas pathologiques, d'après notre connaissance, il n'y a pas de valeur pour les lipides totaux dans la bibliographie.

Pour voir les composants principaux lipidiques et leur proportion (analyse qualitative) dans le liquide synovial pathologique, une séparation des lipides neutres sur un échantillon non-inflammatoire et un autre inflammatoire par une chromatographie sur couche mince a été établie. Après la révélation de la plaque par une technique de carbonisation par réaction à base de sulfate de cuivre, on obtient que les triglycérides (TG), le cholestérol (Chl) et les phospholipides (PL) représentent les lipides principaux dans ces échantillons avec une proportion d'environ 40% pour les TG.

En faisant des analyses quantitatives les valeurs de dosage en termes d'acides gras, constituant les chaines acyles des triglycérides, sur les mêmes échantillons donnent les résultats suivants:

- pour l'échantillon non-inflammatoire (OA) une concentration de 1.26 mg/ml TG, donc 40.84% de la concentration de lipides ;
- pour l'échantillon inflammatoire (PR) une concentration de 1.96 mg/ml TG, donc 49.35% de la concentration de lipides.

Par rapport à la plaque de chromatographie, les valeurs donnent des pourcentages un peu plus élevés que ceux de la plaque. Ce phénomène s'explique puisque les bandes des autres lipides minoritaires n'ont pas été prises en compte.

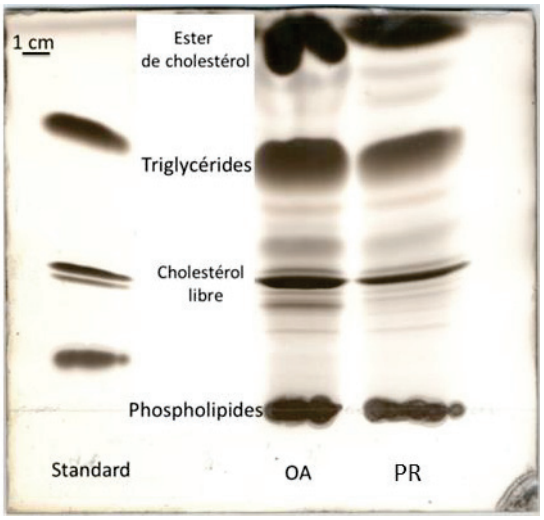


Figure 49. Séparation des lipides neutres par chromatographie sur couche mince pour 1 échantillon de LS non inflammatoire (arthrose –OA) et 1 échantillon de LS inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde PR)

Etant donné la quantité faible de liquide synovial sain animal, la séparation de lipides neutres pour ces échantillons sur la plaque de chromatographie n'a pas pu être établie, mais les résultats obtenus sur le liquide synovial humain pathologique encouragent à faire une séparation de lipides neutres pour les prélèvements de liquide synovial sain.

En prenant une valeur qualitative pour les **lipides totaux (« LT »)** soit la somme de TG, Chl et PLs, on s'aperçoit que la quantité des lipides augmente fortement dans les cas pathologiques (Tableau 10).

LS	**Triglycérides (mg/ml LS)**	**Cholestérol (mg/ml LS)**	**Phospholipides (mg/ml LS)**	**« LT » (mg/ml LS)**
Sain	0.14	0.09	0.25	**0,48**
OA	1.11	0.87	0.45	**2,43**
PR	1.96	1.17	0.58	**3,71**

Tableau 10. Concentrations de lipides dans 1 échantillon LS animal sain, 1 échantillon LS humain OA et 1 échantillon LS humain PR

L'ensemble des résultats sur tous les échantillons analysés sont présentés de manière synthétique en pourcentage par rapport aux lipides totaux (la somme des composants lipidiques principaux) dans la figure 50. Par rapport au liquide synovial sain on constate :

- une augmentation dans les pathologies de TG, lipides ayant un rôle métabolique, cela est dû probablement à un dysfonctionnement de la membrane synoviale du fait d'un métabolisme pathologique ;

- une augmentation importante dans les cas pathologiques de Chl, lipide qui, comme expliqué dans le chapitre III peut être un facteur pathologique puisqu'il peut former des cristaux ; son augmentation est due probablement aussi à un dysfonctionnement de la membrane synoviale comme dans le cas de TG ou dans certains cas due à l'obésité des patients;

- une diminution significative de PLs dans les pathologies, ces lipides ont un rôle structural important et dans la biolubrification donc cette diminution affecte la structure et les propriétés tribologiques du liquide synovial.

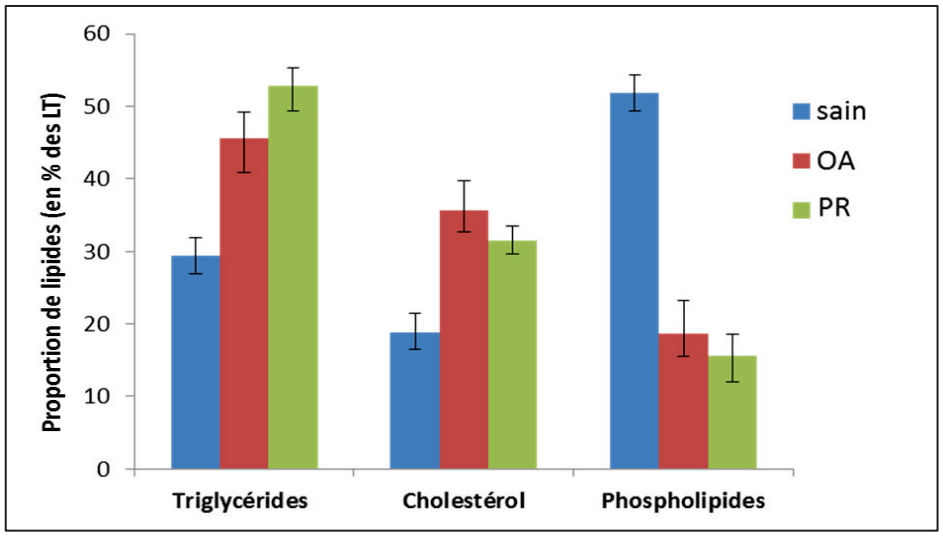


Figure 50. Analyse quantitative en pourcentage des lipides totaux (LT) pour les principaux composants lipidiques des liquides synoviaux. Hystogramme des valeurs médianes affectées de l'écart entre les valeurs experimentales minimale et maximale obtenues sur 2 échantillons LS animal sain, 4 échantillons LS OA et 2 échantillons PR

Puisque cette thèse est axée sur les lipides ayant un rôle structural (les phospholipides qui forment des assemblages moléculaires ; le cholestérol qui peut former des cristaux (cf. 3.3.2)) et dans la biolubrifcation les résultats suivants sont concentrés sur ces composants.

Phospholipides (PL)

La moyenne générale qui tient compte des valeurs obtenues par deux techniques de chromatographie (Annexes 11 et 12) indique pour le **liquide synovial sain** animal une concentration moyenne de phospholipides de **0.25 mg/ml** LS, **0.45 mg/ml** LS pour le **non inflammatoire** humain (OA) et **0.58 mg/ml** LS pour l'**inflammatoire** humain (PR) (figure 50).

Du fait que plusieurs échantillons étaient disponibles pour 2 prélèvements de liquide synovial non inflammatoire (OA) et 1 prélèvement de liquide synovial inflammatoire (AR), une

comparaison a pu être établie pour les résultats sur la concentration de **phospholipides totaux (PLT)** en utilisant deux protocoles de séparation différents. Ces résultats (Tableau 11) ont été obtenus suite à :

- protocole 1 - chromatographie sur couche mince en deux dimensions (CCM 2D – Annexe 13) ;
- protocole 2 - chromatographie sur couche mince et une chromatographie en phase gazeuse (Annexe 12).

Ces résultats montrent que ces deux techniques influencent la détermination de la quantification en phospholipides :

- le premier protocole permet de mesurer le phosphore lipidique dans les phospholipides
- le deuxième protocole permet de mesurer la concentration d'acides gras par rapport à un standard interne.

Ainsi, la différence entre les protocoles est probablement causée par :

- une perte de lipides sur la plaque de chromatographie en deux dimensions dans le cas du premier protocole ;
- une quantification de composants non phospholipidiques dans le cas du deuxième protocole.

Echantillons/ Méthode	**PLT (mg/ml) - protocole 1-**	**PLT (mg/ml) - protocole 2-**
OA (échantillon 1)	0.42	0.60
OA (échantillon 2)	0.46	0.76
PR (échantillon 3)	0.54	0.84

Tableau 11. Concentration de phospholipides totaux dans le liquide synovial humain pathologique OA et PR

En rapportant la concentration de chaque type de phospholipide à la concentration totale déterminée (PLT), le profil quantitatif a été obtenu (en %) de différentes classes de phospholipides décelées dans les échantillons analysés (figure 51) par la CCM 2D (Annexe 13). Ces résultats montrent que :

- le **PC** est **le phospholipide prédominant** dans les échantillons de liquide synovial analysés, que celui-ci soit sain ou pathologique, mais en quantité plus faible dans ceux pathologiques. Sa présence **permet d'avoir un coefficient de frottement très faible** [8,67]. Des études ont montré que même une faible différence de 10% de ce type de lipide avec tête chargé peut modifier de manière importante le coefficient de frottement [67];

- une quantité relative semblant assez grande de **SPH**, quantité plus élevée dans les échantillons pathologiques. Sa présence rigidifie la couche lipidique, ce qui permet d'avoir un coefficient de frottement très faible aussi [8, 67] ;

- une quantité relative de **LPC (Lyso-PC)** semblant plus grande dans les échantillons pathologiques. La génération de lysophospholipides (Lyso-PLs) est catalysée par l'activité enzymatique de PLA_2 qui est notamment plus accentuée dans les liquides synoviaux pathologiques [157]. Suite à cette action enzymatique, l'intégrité des couches lipidiques est atteinte et ainsi le LPC **peut être un « messager » dans l'inflammation articulaire** puisqu'il agit comme un agent chémostatique au site d'inflammation favorisant ainsi la réaction inflammatoire locale [158];

- la présence de **PE** et **PS** dans les échantillons pathologiques. Comme le PS est un marqueur de processus d'apoptose (implique une altération de la membrane plasmatique ce qui initialise ainsi la phagocytose), ceci explique son absence dans le liquide synovial sain. Aussi, des études ont mis en évidence que ces PLs **augmentent le coefficient de frottement** [67] ;

- une quantité relative de **PI** semblant un peu plus élevée dans l'échantillon sain que dans les échantillons pathologiques, sa présence **augmente l'accrochage des couches lipidiques sur le cartilage**, ce qui permettrait de diminuer l'usure du cartilage par la protection des couches lipidiques [67] ;

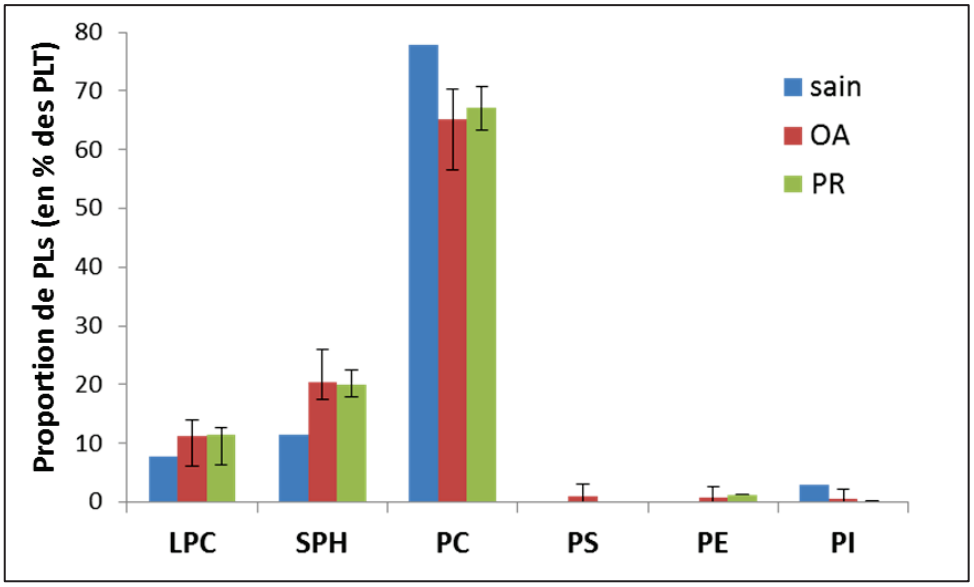


Figure 51. Quantités des principales classes de phospholipides en pourcentage de PLT dans le LS animal sain et LS humain pathologique (arthrose –OA /polyarthrite rhumatoïde PR). Hystogramme des valeurs médianes affectées de l'écart entre les valeurs experimentales minimale et maximale obtenues
sur 1 échantillon LS sain, 4 échantillons LS OA et 2 échantillons LS PR

Le nombre insuffisant d'échantillons sains d'origine animale utilisés pour ce protocole expérimental n'a pas permis de calculer une erreur statistique.

Cholestérol

Le dosage de cholestérol a été fait par une spectrométrie de masse utilisée en parallèle avec la chromatographie en phase gazeuse (Annexe 12). Les résultats présents dans le Tableau 12 indiquent une faible concentration dans le liquide synovial sain animal, concentration qui est beaucoup plus élevée dans les liquides synoviaux pathologiques.

LS	**Sain**	**OA**	**PR**
Cholestérol (mg/ml)	0.091	0.96 – 1.27	1.28 – 3.61

Tableau 12. Concentration de cholestérol dans 1 échantillon LS animal sain et 6 échantillons LS humain pathologique (4 échantillons OA et 2 échantillons PR)

Ces résultats sont corrélés avec la détection de cristaux en MET sur les échantillons pathologiques de liquide synovial (cf. 3.3.2), cristaux plus grands dans le cas inflammatoire.

4.3.5. Marqueurs inflammatoires

Les modifications dans le profil des composants du liquide synovial suite à l'action enzymatique de diverses enzymes sont connues pour se produire dans le cadre de l'évolution pathologique d'une articulation synoviale. Les principales enzymes qu'on peut distinguer lors de l'évolution d'une pathologie articulaire liées au liquide synovial sont les phospholipases et la phosphatase alcaline.

4.3.5.1.La phospholipase A_2 (PLA2)

L'infiltration des leucocytes au niveau de l'articulation atteinte d'un état pathologique entraine la formation de leucotriènes et en particulier de leucotriènes B_4 (LTB_4) formés à partir de l'acide arachidonique (cf. 1.5). Ce dernier est libéré par l'activation de la PLA2 lors de l'inflammation et est converti par l'enzyme 5-lipoxygénase en leucotriènes et en acides gras monohydroxylés, en particulier en acide 5-hydrohy-eicosatétraénoique (5-HETE).

La présence des marqueurs inflammatoires LTB_4 et 5-HETE dans les liquides synoviaux pathologiques a été détectée par la chromatographie liquide à haute performance HPLC (Annexe 12). Ces marqueurs ont été mis en évidence uniquement dans les liquides synoviaux pathologiques (Tableau 13).

Les résultats montrent une concentration plus élevée dans les liquides synoviaux inflammatoires étant donné que ce sont des marqueurs spécifiques pour une réaction inflammatoire.

Marqueurs inflammatoires / LS	**OA**	**PR**
5-HETE (mg/ml)	1.21 – 2.49	2.17– 3.04
LTB_4 (mg/ml)	0 – 0.03	0 – 0.03

Tableau 13. Concentrations de marqueurs inflammatoires dans le liquide synovial humain pathologique (4 échantillons OA et 2 échantillons PR)

4.3.5.2.La phosphatase alcaline (PAL)

Même si les analyses chimiques de l'hôpital des échantillons ont montrés qu'il n'y a pas de signe clinique de présence de cristaux, une analyse des précurseurs de ces cristaux a été établie.

La présence de la PAL, les interactions entre la PS et les ions de Ca^{2+} déterminent l'activation de processus de minéralisation et donc la précipitation des cristaux de phosphate de calcium dans le liquide synovial et sur la surface du cartilage qui favorisent l'usure du cartilage.

Ainsi, comme l'activation de la PAL peut être une source de minéralisation donnant des cristaux précoces les échantillons ont été soumis à un test d'activité par spectrophotométrie (annexe 14). Aucune activité n'a été détectée par cette technique ce qui confirme l'hypothèse que les cristaux identifiés en MET (cf. 3.3.2) sont des cristaux de cholestérol.

4.4.Discussion et conclusions

Si on détaille les résultats quantitatifs des analyses rapportées à la bibliographie (Tableau 14) on observe qu'elles sont en concordance ou un peu plus élevées aux valeurs trouvées dans la littérature.

LS	**Sain**		**OA**		**PR**	
Composant (mg/ml LS)	**Nos analyses**	*Biblio*	**Nos analyses**	*Biblio*	**Nos analyses**	*Biblio*
Protéines	**27**	*12 - 30*	**52 -66**	*24 - 44*	**68 – 74**	*26 - 63*
PLT	**0.2**	*0.1 – 0.2*	**0.2 - 0.7**	*0.2 – 0.3*	**0.3 - 0.8**	*1.5 – 3.7*
Cholestérol	**0.091**	*0.066-0.075*	**0.9 -1.27**	*0.27 - 0.8*	**1.28 -3.6**	*0.7 – 0.9*

Tableau 14. Synthèse des résultats des analyses par rapport à la bibliographie

Par spectroscopie infrarouge on ne peut pas obtenir des informations quantitatives, elle permet seulement d'obtenir des informations qualitatives sur la composition du liquide synovial par l'identification des pics correspondants à chaque composant principal. Afin d'avoir une quantité relative de chaque composant de liquide synovial à partir de ces spectres nous avons défini les rapports entre les absorbances des composants principaux. Ainsi les rapports suivants ont été définis :

- **C1** qui représente le **rapport** entre l'absorbance de **protéine** qui correspond à 1650 cm^{-1} et l'absorbance d'**acide hyaluronique** ;
- **C2** qui représente le **rapport** entre l'absorbance de **protéine** qui correspond à 1650 cm^{-1} et l'absorbance de **phospholipides**

Les valeurs pour ces rapports sont données dans le Tableau suivant :

LS	**C1**	**C2**
Sain	1.94	17.5
OA	1.68	12.3
PR	2.25	12

Tableau 15. Valeurs des rapports entre les absorbances des composants principaux

Ainsi on remarque :

- une **diminution du rapport C1 en OA** ce qui peut être expliqué par une diminution de la concentration de l'AH (cf. Tableau 4) et une **augmentation** du même rapport **pour la PR** du fait de l'augmentation de la concentration de protéines dans les inflammations (cf. Tableau 14)
- le rapport **C2 diminue** avec l'augmentation des phospholipides dans les cas pathologiques

On remarque une **augmentation de la concentration des protéines** et d'acide hyaluronique qui forment le gel glycoprotéique (cf. chapitre III) et une **diminution des phospholipides** (par rapport à la concentration des lipides totaux) qui forment les membranes vésiculaires (cf. chapitre III) dans les cas pathologiques. Ce résultat peut être interprété par une augmentation de la quantité de gel glycoprotéique dans les cas pathologiques qui peut être une explication du fait que dans ces cas le gel glycoprotéique n'est pas incorporé dans les vésicules lipidiques (cf. chapitre III).

Nous avons montré aussi que la **concentration de lipides augmente dans les pathologiques** avec une **diminution de la concentration de PLs** (lipides ayant un rôle important dans la structure) rapportée à la concentration des lipides totaux. Partant de ce résultat, on peut expliquer le changement de structures vésiculaires observées en microscopie électronique (cf. chapitre III) : grands vésicules lipidiques multilamellaires dans le cas sain donc une concentration assez importante de PLs pour former des membranes multilamelaires et petits vésicules unilamellaires pour le cas inflammatoire donc une grande concentration de lipides mais avec une concentration faible de PLs.

Dans les cas pathologiques on observe aussi une importante **augmentation de la concentration de Chl** comme dans les cas de TG (lipide ayant un rôle nutritionnel). Les concentrations élevées de Chl dans les cas pathologiques et les résultats négatifs de l'activité de la PAL nous permettent d'argumenter que les **cristaux** vus en MET (cristaux qui augmentent en dimensions dans les inflammations tout comme la concentration de Chl) sont des cristaux non minéraux de Chl.

Dans le cas des phospholipides totaux on a obtenu des valeurs plus élevées que dans la bibliographie pour les liquides synoviaux sains et non inflammatoires mais plus faibles pour le cas inflammatoire. Les valeurs faibles pour le liquide synovial arthritique peuvent être expliquées par l'obtention d'échantillons avec des pathologies précoces. Les résultats obtenus sur les différentes classes de phospholipides démontrent que le **phospholipide prédominant dans le liquide synovial** est le **PC**, phospholipide qui assure un **coefficient de frottement faible**. La diminution de sa concentration dans les cas pathologiques affecte les performances tribologiques du liquide synovial comme le **PE et PS** qui sont présentes en plus faibles quantités dans les échantillons pathologiques (PS seulement dans le cas OA) ce qui **augmente le coefficient de frottement**.

En ce qui concerne le **PI**, on observe qu'il a la même tendance que la **lubricine**, le PI permettant de **diminuer** aussi **l'usure du cartilage** par la protection des couches lipidiques. Dans l'OA, le PI décroit significativement, le cartilage doit ainsi être abimé tandis que la concentration de la lubricité augmente le plus dans ce cas-là du fait de cette usure du cartilage.

Nous avons mis en évidence **l'activation de PLA2** par la présence de marqueurs d'oxydation/ inflammatoires LTB4 et 5-HETE dans les échantillons pathologiques analysés avec une concentration qui augmente dans l'PR. Ces marqueurs résultants des réactions d'oxydation enzymatique des phospholipides contenus dans le liquide synovial peuvent être un indicateur

du **changement probable de la structure** du liquide synovial par rapport à l'état sain de fait de la réorganisation des structures lipidiques résultant en fonction de l'évolution locale de la pathologie. Ainsi partant de ce résultat, on peut expliquer plus avant le changement des structures vésiculaires observés dans le chapitre III, donc des grands vésicules lipidiques multilamellaires dans le cas sain versus petits vésicules unilamellaires pour le cas inflammatoire.

Pour déterminer la corrélation entre la structure et la composition du liquide synovial sain ou pathologiques nous sommes amenés à étudier maintenant le comportement tribologique des échantillons correspondants.

Chapitre V. Analyse des perturbations pathologiques du comportement tribologique

L'objectif des travaux exposés dans ce chapitre est de comprendre et de caractériser l'évolution tribologique des assemblages moléculaires dans les liquides synoviaux sains et pathologiques au cours du frottement et le rôle des interfaces lipidiques dans la biolubrification articulaire saine et pathologique.

Etant donné les deux principaux régimes dans la lubrification mis en œuvre lors de la marche (chapitre I) nous avons tout d'abord estimé les valeurs de la viscosité des différents types de liquides synoviaux prélevés et des liquides reproduites par synthèse chimique, afin d'évaluer l'influence de cette valeur de viscosité sur la lubrification hydrodynamique.

Nous avons ensuite analysé le rôle des différentes structures supramoléculaires lipidiques détectées par analyse structurale au chapitre III et biochimique au chapitre IV dans des conditions de lubrification limite laquelle entraine davantage de problèmes d'usure comme exposé au chapitre I.

Pour étudier cette lubrification limite nous avons utilisé le modèle expérimental tribologique ex vivo [7] décrit dans le chapitre I, qui permet de reproduire et d'étudier un contact modèle du point de vue articulaire et biologique en prenant en compte les paramètres correspondant aux cas sains et pathologiques issus des analyses de la structure et de la composition comme exposé au chapitre III. Les mesures et les visualisations effectuées au cours des essais tribologiques (marqueurs moléculaires fluorescents) permettent d'identifier et de comprendre l'évolution des structures supramoléculaires saines et pathologiques, identifiant ainsi les conséquences tribologiques (dégradations…) sur l'ensemble du contact.

Afin de corréler différentes structures avec différents comportements tribologiques nous présentons dans un premier temps les essais portant sur ces liquides reproduits en synthèse chimique à l'aide des marqueurs fluorescents nous ont permis de mettre en évidence différents mécanismes de lubrification.

5.1. Influence de la viscosité dans la lubrification hydrodynamique

Dans le régime de lubrification hydrodynamique (rappel : 50% du cycle de marche) la viscosité est un paramètre important pour le maintien d'une épaisseur suffisante du film lubrifiant afin de permettre le fonctionnement sans contact direct entre les rugosités des surfaces.

Afin d'obtenir une idée qualitative de la viscosité de tous nos échantillons, nous avons employé une méthode empirique utilisée en clinique (pour tester l'adhésion du liquide entre les doigts qui vont s'écartent et mesurer la distance d à laquelle "s'effectue le décrochage du film"). Nous avons observé que cette distance et donc la viscosité diminue en fonction de l'inflammation (Tableau 16) : entre 3-4 cm pour le liquide synovial sain, 2-3 cm pour le liquide synovial OA et 1-1.5 cm pour le liquide synovial PR. [148]. Afin de relier ces valeurs avec des valeurs plus quantitatives, pour certains échantillons nous avons pu mesurer la viscosité grâce à un rhéomètre en configuration cône / plan en fonction du taux de cisaillement. Pour cela, nous avons utilisé, pour chaque essai, 0.5 ml de liquide synovial, un entrefer de 50µm et un taux de cisaillement variant entre 0.05 et 5000 s-1. La température a été maintenue à 37°C à l'aide d'un flux d'air. Les résultats, pour un taux de cisaillement de 2.5 s^{-1}, sont présentés brièvement dans le Tableau 16 par rapport aux données bibliographiques.

Liquide synovial	**Sain**	**Non inflammatoire (OA)**	**Inflammatoire (PR)**
Test empirique: d (cm)	4 - 3	3 - 2	1.5 - 1
Viscosité (Pa*s)	1	0.12	0.07 - 0.05
*Viscosité (Pa*s) selon la bibliographie*	*10 - 34*	*0.1 - 1*	*0.01 - 0.1*

Tableau 16. Viscosité en fonction de l'état pathologique pour les différents types d'échantillons prélevés

Nous remarquons une diminution significative de la viscosité avec les pathologies. Cette diminution de la viscosité en fonction des pathologies peut être due à une modification des structures lipidiques ou à une dépolymérisation de l'AH.

En ce qui concerne l'AH la bibliographie montre que la viscosité d'une solution d'AH diminue avec la diminution de son poids moléculaire (Tableau 17) [150].

Solution AH	**AH 0.75 M MW**	**AH 2 M MW**	**AH 4 M MW**	**AH 5 M MW**
*Viscosité (Pa*s)*	0.29	8.65	43.35	46.69

Tableau 17. Propriétés rhéologiques des différentes solutions d'acide hyaluronique (AH) [8]

D'autres études montrent que la viscosité d'une solution d'AH est plus élevée que la viscosité d'une solution mêlant des vésicules DPPC avec l'AH. Ces études montrent aussi que pour une solution d'AH avec DPPC, quand les vésicules ne sont pas inclus dans l'AH, la viscosité diminue [33].

Les mesures de la viscosité pour nos solutions de liquide synovial synthétiques que nous avons obtenues sont présentées dans le Tableau 18 et sont en concordance avec la bibliographie. Nous observons ici que la viscosité diminue avec l'augmentation de la concentration de phospholipides (nous rappelons qu'en "gel-in 1" et "gel-out 2" nous avons une concentration de 3mg/ml DOPC tandis que dans les autres échantillons nous avons 0.3 mg/ml DOPC) mais elle est aussi grande quand le gel est incorporé dans les vésicules comparativement aux liquides avec le gel non-incorporé.

Liquide synthétique	**Gel-in 1**	**Gel-in 2**	**Gel-out 1**	**Gel-out 2**
Viscosité (Pa*s)	0.01	0.1	0.05	0.003

Tableau 18. Viscosité des différentes solutions de liquide synovial synthétique

Cette diminution de la viscosité dans les cas pathologiques peut entrainer d'après les théories de la lubrification HD présentées dans le chapitre I une diminution de l'épaisseur du film lubrifiant de quelques μm à quelques dizaines de nm, d'après le modèle de lubrification de Reynolds [151]. Cette diminution fait que l'épaisseur du film lubrifiant ne dépasse plus les pics de rugosités du cartilage ~1μm), ce qui peut générer de l'usure dans un régime de lubrification mixte.

5.2. Modèle du triplet tribologique pour le régime de lubrification limite

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre I, une étude tribologique *ex vivo* réaliste doit tenir compte de l'ensemble du triplet tribologique constitué (1) des **1er corps qui forment le contact**, (2) du **3eme corps qui sépare** les premiers corps et (3) du **mécanisme qui impose les sollicitations locales**. Ainsi, il est indispensable de revenir aux détails du modèle tribologique qui veut reproduire les principales caractéristiques du triplet tribologique (chapitre I).

Dans les articulations synoviales, les 1er corps du contact (les cartilages articulaires) sont séparés par le 3eme corps (le liquide synovial LS) et sont mis en mouvements par le mécanisme par l'intermédiare du système neuromusculaire qui génère les mouvements et du système ligamentaire qui assure les liaisons limitant et stabilisant les mouvements articulaires.

5.2.1. Choix des corps en contact (1er corps)

Pour visualiser *in situ* le contact lors des essais tribologiques (frottement) nous permettant l'étude du comportement tribologique du volume de lubrifiant et des interfaces lipidiques, nous avons utilisé deux types de premiers corps :

A. un matériau modèle *ex vivo* pour le cartilage articulaire ;
B. une contre face en verre transparent

A. Modèle ex vivo pour le cartilage articulaire

Comme nous l'avons déjà indiqué dans le chapitre I, pour simuler les propriétés mécaniques du cartilage articulaire, nous avons choisi un hydrogel HEMA sous forme d'ébauches des lentilles cornéennes (Bausch et Lomb Industrie).

Comme ces lentilles ont les caractéristiques du cartilage (module d'élasticité, porosité, hydrophilie) juste dans l'état hydraté, ces lentilles ont été hydratée 48h avant chaque utilisation dans les essais tribologiques dans une solution tampon pH 7.4 [78].

La rugosité de la surface frottante de la lentille HEMA est de quelques nanomètres RMS. [8]

B. Verre borosilicaté

Pour pouvoir visualiser *in situ* le contact pendant les essais de frottement, nous avons utilisé un verre contre face en verre borosilicaté de très faible rugosité (rugosité pic à pic de 1nm maximum).

Avant leur utilisation dans les essais tribologiques, les verres ont été immergés 2 fois dans un mélange d'eau ultra pure et détergent (Microson, Fischer-Bioblock, France) pendant 20 min à ultrason à 60°C et ensuite rincés pendant 5 minutes à l'eau ultra-pure [67] , afin d'éviter les dérives du coefficient de frottement dues à une accommodation du glissement dans les complexes créés par des impuretés présentes sur leurs surfaces frottantes.

5.2.2. Choix du lubrifiant (3eme corps)

Comme nous l'avons déjà présenté dans le chapitre I, en rapport avec les objectifs de cette thèse, pour le 3ème corps nous avons choisi de tester différents types de liquides synoviaux (synthétique, en cultures cellulaires ou en prélèvements) afin de comprendre le rôle tribologique des assemblages moléculaires volumiques et le rôle des multicouches lipidiques qui forment l'interface LS / cartilage. Pour ce faire, le volume de liquide synovial a été testé en présence ou en l'absence de bicouches phospholipidiques supportées par les surfaces de HEMA et verre.

Afin d'élaborer les bicouches lipidiques nous avons dû choisir le type de phospholipide et la technique de fabrication des bicouches. Comme les principaux phospholipides dans les articulations saines sont en phase fluide [67] nous avons choisi le DLPC (1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Ref : 850335C, Avanti Polar Lipids)) (figure 52 A) qui est aussi en phase fluide et mime bien le comportement tribologique des interfaces lipidiques du cartilage [67]. Concernant la technique nous avons choisi de déposer de bicouches lipidiques de DLPC en présence du Ca^{++} (ayant pour rôle d'accrocher les lipides sur la surface hydrophile de verre et HEMA) par la méthode d'éclatement des vésicules lipidiques [146,147] sur la lentille HEMA et sur la contre face en verre qui permet la visualisation.

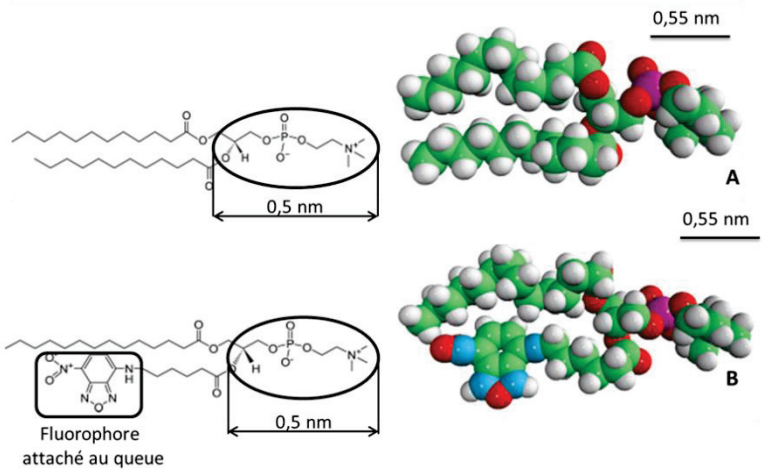


Figure 52. Structure chimique et vue 3D de molécules de DLPC (A) et NBD-PC (B) (source Avanti Polar Lipids)

La technique du dépôt, schématisée dans la figure 53 consiste à :

- incuber (5 mn) les surfaces frottantes dans la suspension diluée de petits vésicules lipidiques. Au cours de l'incubation, 2mM d'ions Ca++ sont ajoutés pour que les vésicules puissent s'accrocher et éclater à la surface (figure 53a).
- éliminer le surplus lipidique par rinçage, ce qui conduit à l'obtention d'une bicouche lipidique sur la surface frottante (figure 53b).

Les ions Ca^{++} ont pour rôle de rigidifier la bicouche en formant des liaisons ioniques entre les parties négatives (phosphates) des têtes lipidiques (figure 53c) [51].

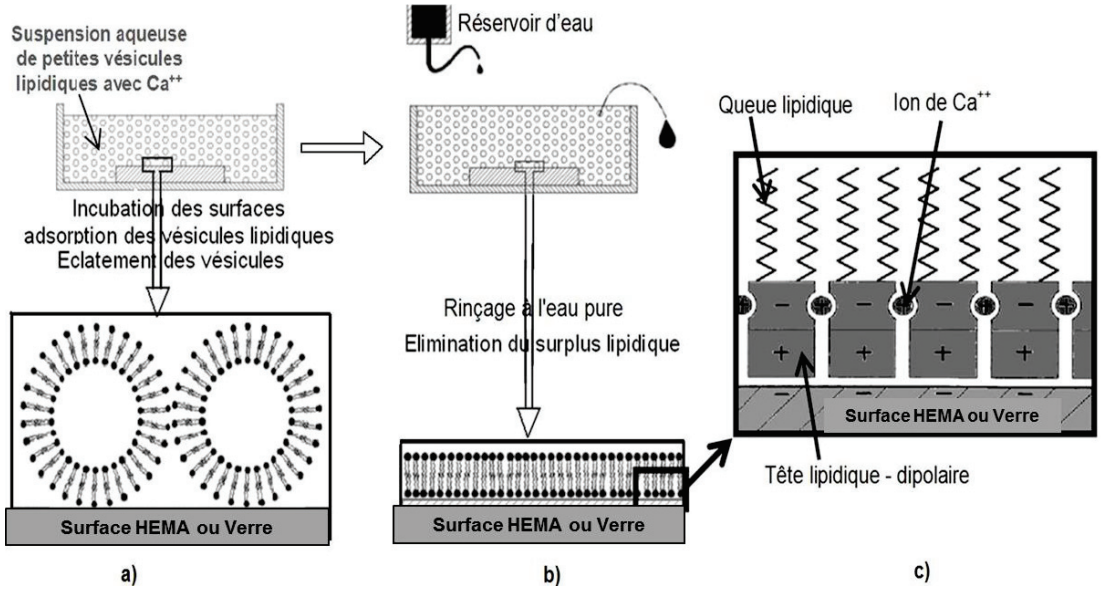


Figure 53. Dépôt des bicouches lipidiques par la méthode d'éclatement de vésicules lipidiques a) adsorption des vésicules lipidiques sur la surface de la lentille HEMA, b) après éclatement des vésicules et formation de bicouches, rinçage et élimination du surplus lipidique, c) détail de la structure interne d'une couche lipidique [8]

Les bicouches lipidiques que nous avons déposées sur les surfaces sont fluorescentes en lumière bleue, elles contiennent 1% de lipides NBD-PC (1-myristoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine) (810122, Avanti Polar Lipids), avec une partie fluorescente (NBD) liée chimiquement à l'une des queues lipidiques (figure 52B). Lorsque ce lipide est excité par une lumière bleue (465 nm), cette excitation lui fait émettre une lumière verte (535 nm).

L'intégrité de la bicouche lipidique (figure 54) a été visualisée en employant la microscopie optique de fluorescence : les zones plus claires correspondent à des détails plus fluorescents, par rapport aux zones sombres qui émettre moins de fluorescence, tandis que le contour octogonal noir correspond au contour du diaphragme de champ du microscope sur la surface transparente. Ainsi plusieurs situations peuvent se présenter :

- si la surface analysée ne contient pas d'éléments fluorescents en lumière bleue, le diaphragme n'apparaît pas dans l'image. C'est par exemple le cas d'une surface de verre sans bicouche lipidique (figure 54a) ;

- si la surface analysée contient des éléments fluorescents, les images obtenues en lumière bleue sont constituées d'une zone claire limitée par l'octogone du diaphragme. Cette zone claire peut être uniforme, comme dans le cas d'une surface de verre avec

bicouche lipidique intacte (figure 54b) ou révéler des détails, comme dans le cas d'une bicouche non homogène présentant des vésicules lipidiques de quelques dizaines de micromètres (figure 54c). Les bicouches non homogènes ont été exclues des études tribologiques de cette thèse.

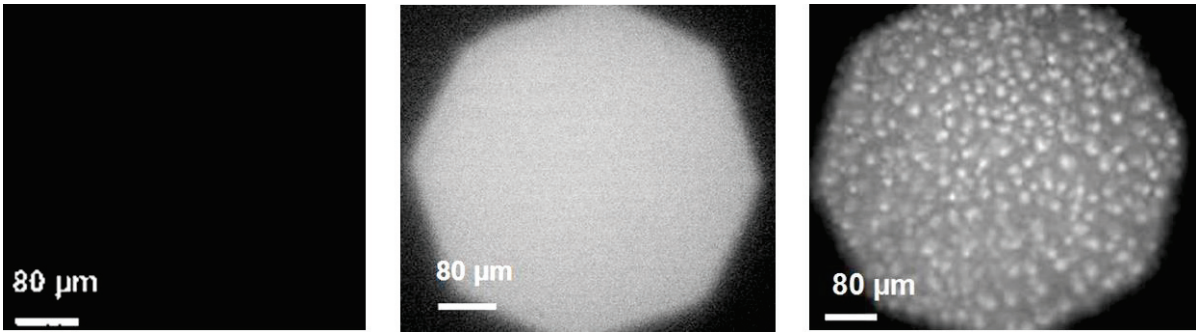


Figure 54. Etudes par microscopie optique de fluorescence – exemple d'images pouvant être obtenues suite au dépôt de bicouches phospholipidiques sur les surfaces des 1ers corps, ici le verre : a) surface de verre sans dépôt lipidique, b) surface de verre recouverte de bicouche lipidique homogène,
c) cas d'une bicouche lipidique non homogène avec des vésicules non éclatés.

5.2.3. Choix du mécanisme tribologique – dispositif expérimental

Les caractéristiques du mécanisme tribologique du modèle articulaire sont simulées par un dispositif expérimental mis au point dans le cadre de la thèse d'Ana-Maria Sfarghiu [8], et conçu de façon à :

- permettre une investigation tribologique du contact par la mesure du frottement en même temps que visualisation *in situ*

- fonctionner dans des conditions de sollicitations telles que les effets de portance hydrodynamique sont totalement négligeables, de sorte que le régime de lubrification est de type limite, exacerbant ainsi le rôle des interfaces

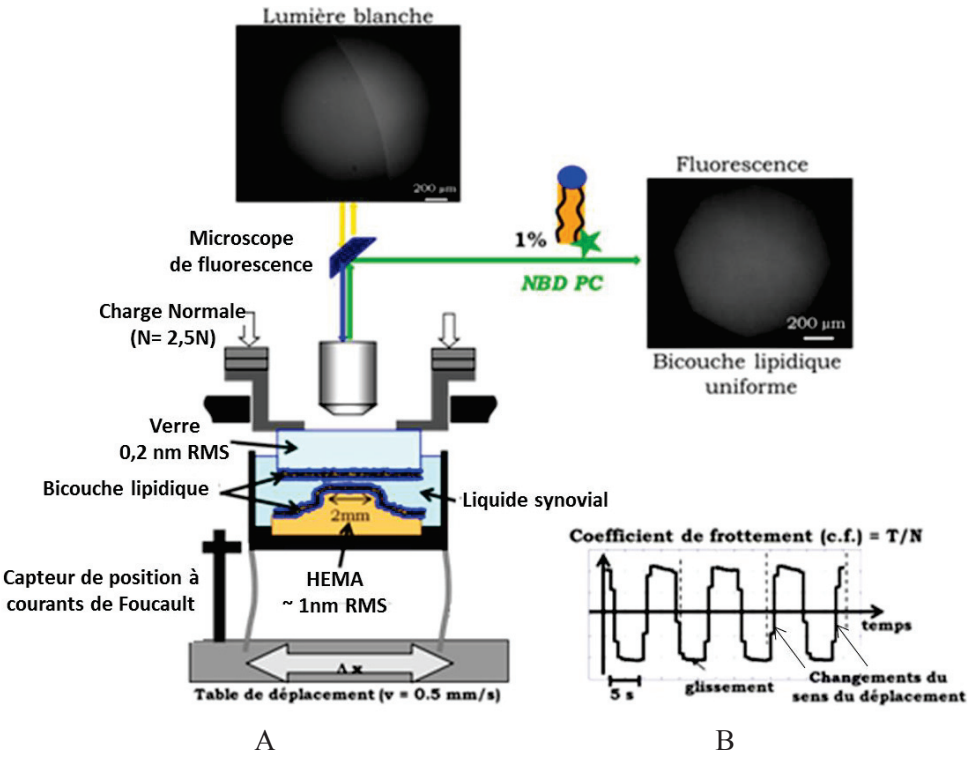


Figure 55. Schéma du dispositif expérimental :
A - tribomètre et mode de visualisation du contact ; B - exemple de courbe de frottement

La charge normale est appliquée par gravité à l'aide de masses annulaires. Le coefficient de frottement est obtenu à partir de la mesure de la force tangentielle dans la configuration expérimentale de la figure 55. Cette mesure est réalisée en utilisant un capteur de position à courants de Foucault qui délivre une tension proportionnelle à la déformation du système de lames flexibles [133]. Cette déformation élastique est elle-même proportionnelle à la force tangentielle.

Un étalonnage avec des masses marquées permet d'obtenir la valeur de la constante de proportionnalité entre la force et la tension, qui est de l'ordre de 0.1 N/V. Cette constante

dépend des conditions de démontage et de remontage du dispositif, nécessaires afin de l'utiliser sous le microscope. Par conséquent, un étalonnage est réalisé à chaque essai. La sensibilité, la gamme de linéarité, et la position du capteur sont telles que l'incertitude sur les mesures de forces comprise entre -1N et 1N est de 5.10^{-4}N.

Le rapport entre la force normale, imposée par gravitation, et la force tangentielle mesurée, correspond au coefficient de frottement. La variation de ce coefficient est enregistrée pendant les essais, donnant naissance à la "courbe de frottement". Comme le mouvement de translation du premier corps est alterne, la courbe de frottement présente des parties positives et négatives, chacune correspondant à une alternance de déplacement.

Les données pour la courbe de frottement sont enregistrées dans un fichier de type « txt », qui peut être exploité dans Microsoft Office Excel. L'enregistrement de la courbe d'étalonnage s'effectue de la même manière (figure 56).

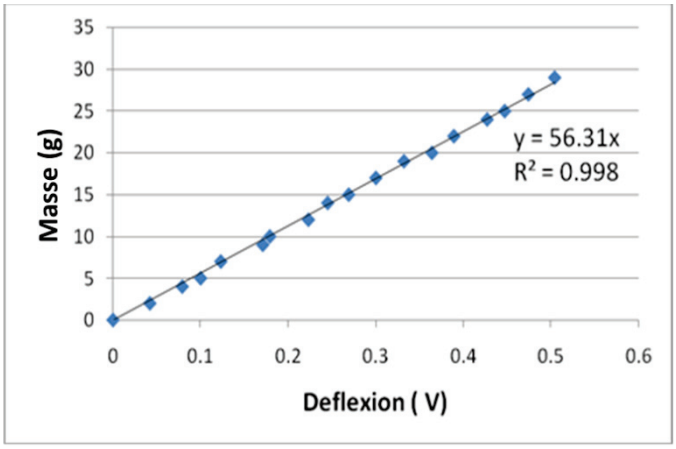


Figure 56. Exemple de courbe d'étalonnage

Le microscope optique droit (Zeiss) permet l'observation du contact à travers la contre face transparente (plaque en verre) (figure 55). Cette observation est réalisée *in situ* au cours du frottement soit en lumière blanche (classique) soit en fluorescence.

En lumière blanche il n'est pas possible de discerner des détails dans la zone de contact verre – lentille HEMA (figure 55.A).

En lumière fluorescente les mêmes paramètres d'acquisition de la caméra pour tous les essais ont été utilisés, afin de pouvoir comparer les différentes quantités de lipides fluorescents dans le contact. Avec cette lumière, nous avons pu observer l'évolution et la dégradation le cas échéant des interfaces lipidiques au cours du frottement, situations présentées dans la figure 57.

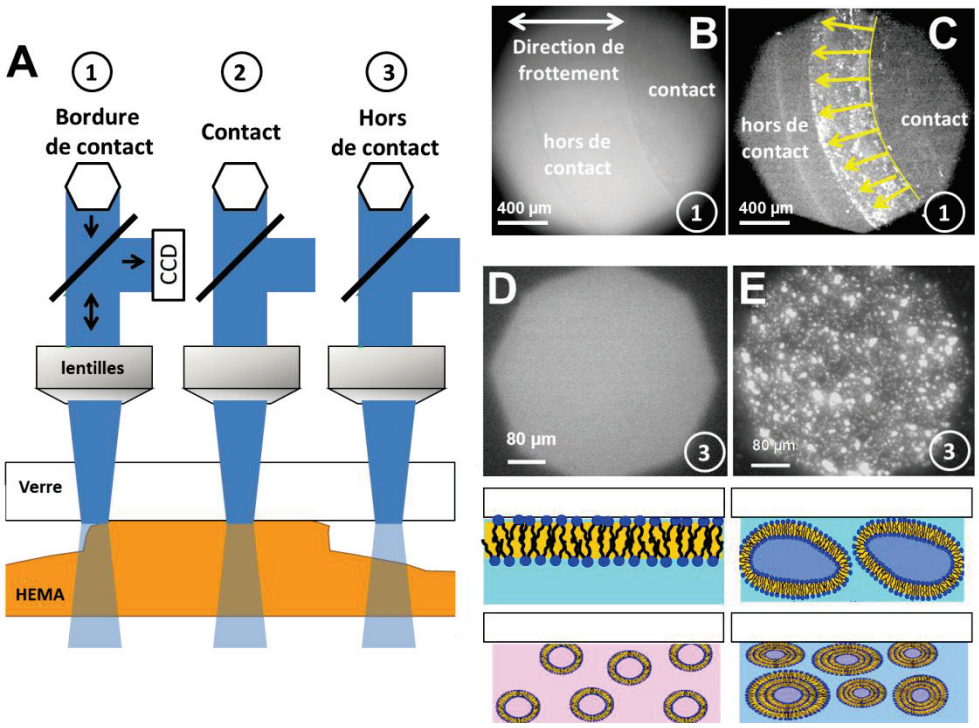
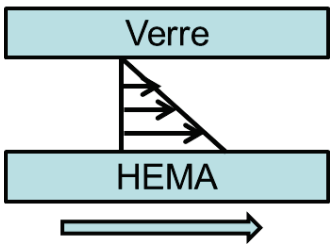


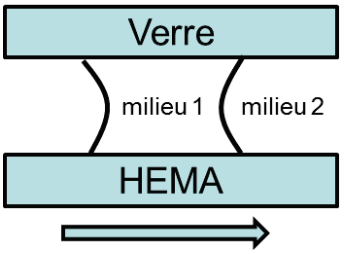
Figure 57. Localisation des différentes zones délimitées par le diaphragme du microscope lors des observations *in situ* du contact articulaire modèle, en lumière blanche et lumière fluorescente :
A : chemin optique avec trois emplacements différents de la zone enregistrée : (1) sur la bordure du contact verre/HEMA, (2) sur le contact et (3) hors du contact. L'image octogonale du diaphragme du microscope est visible dans toutes les images quand le focus est ajusté sur les interfaces verre/HEMA (B-C) ou verre/lubrifiant (D-E).
B-C : images obtenues en lumière blanche ou fluorescente sur des surfaces couvertes de bicouches lipidiques. La bordure du contact est visualisée en lumière blanche comme une transition nette. En lumière fluorescente cette transition correspond à une bande d'épaisseur (flèches jaune dans l'image C) dans laquelle l'accumulation de lipides fluorescents indique une dégradation des bicouches lipidiques.
D-E : visualisation en lumière fluorescente hors du contact d'une surface en verre : (D) couverte d'une bicouche lipidique ou de liquide gel-out ou ; (E) couverte de liquide gel-in

Ces visualisations permettent de suivre l'évolution des assemblages moléculaires au cours de frottement et à partir de ces visualisations on peut proposer des mécanismes d'accommodation de vitesses à l'intérieur de l'épaisseur du film lubrifiant. De point de vue tribologique cette accommodation de vitesses entre les corps en contact, dans notre cas HEMA qui se déplace à la vitesse de 0.5 mm/s et le verre qui est fixe (donc vitesse 0), pourra se faire par plusieurs mécanismes :

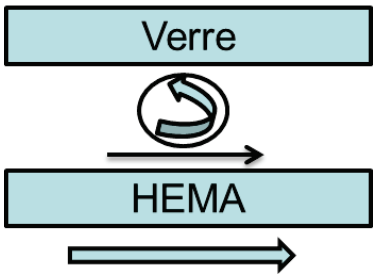
A. glissement dans une épaisseur de film lubrifiant homogène



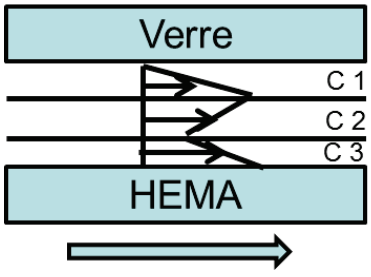
B. film lubrifiant avec séparation des phases et formation de ménisques



C. roulement des assemblages moléculaires dans le film lubrifiant



D. glissement dans plusieurs couches



$\eta C1 < \eta C2 < \eta C3$

Validation du mécanisme de lubrification limite

Comme les essais tribologiques ont été faits en présence ou en l'absence des interfaces lipidiques, nous avons dû nous assurer que les conditions expérimentales utilisées correspondent bien au cas de la **lubrification limite.**

En effet ce cas de lubrification est celui susceptible de mettre en jeu le rôle des interfaces lipidiques dans la biolubrification articulaire. En conséquence au cours des essais tribologiques avec des interfaces lipidiques il a fallu déterminer :

- **L'influence de la variation de charge normale appliquée (pression)**

Pour étudier la variation du coefficient de frottement avec l'augmentation de la charge normale, nous avons fait varier la charge normale entre 2.4 et 4 N (ce qui correspond à des pressions comprises entre 0.2 et 0.4 MPa compte tenu du diamètre de l'aire de contact ~ 2mm), avec une vitesse relative de déplacement constante v= 0.5 mm/s. Ces essais ont montré que le coefficient de frottement n'a pas varié, ce qui signifie qu'il n'est pas influencé par la variation de la charge normale.

- **L'influence de la variation de vitesse de cisaillement**

Pour les essais tribologiques effectués nous avons imposé des vitesses de cisaillement de 0.25, 0.5, 0.75 et 1.0 mm/s mais nous n'avons pas enregistré de variation du coefficient de frottement.

Par conséquent, **nous n'observons pas d'effets de portance hydrodynamique dans nos mesures pour les paramètres choisis (pression, vitesse relative).** Ainsi, pour assurer une bonne visualisation du contact modèle articulaire ex vivo en microscopie optique nous avons choisi d'utiliser une faible vitesse relative des surfaces de 0.5 mm/s et une pression de 0.3 MPa.

5.3.Résultats

En utilisant le dispositif expérimental et le modèle *ex vivo* décrit précédemment, nous avons étudié les différents types de liquides synoviaux avec ou sans interfaces de type bicouches lipidiques de DLPC (figure 52A). Comme dit également, nous avons utilisé des conditions expérimentales de sollicitations de sorte que les effets de portance hydrodynamique soient négligeables, favorisant la mise en évidence du rôle tribologique des assemblages moléculaires de type lipidique ou gel glycoprotéique : ainsi, une pression de 0.3 MPa et une vitesse relative de surface de contact de 0.5 mm/s ont été employées.

Pour chaque échantillon de liquide synovial étudié on a réalisé un à deux essais de mesures tribologiques.

5.3.1. Liquides synoviaux synthétiques

Nous avons reconstitué la composition et la structure de liquide synovial (Annexe 7) à partir de la composition de liquides synoviaux sains ou pathologiques déterminée par dosages biochimiques ou donnés par la littérature (chapitre IV).

La structure des liquides avant les essais tribologiques a été vérifiée en utilisant la microscopie confocale et la microscopie électronique, comme décrit au chapitre III et nous avons donc testé plusieurs types de liquides synoviaux (annexe 7):

- le "gel-in" qui simule le liquide synovial sain : la différence entre "gel-in 1" et "gel-in 2" se situe dans la concentration des phospholipides et la taille de vésicules : 3 mg/ml pour le premier cas avec de grands vésicules (500nm- quelques μm) et pour le deuxième cas 0.3 mg/ml phospholipides avec des vésicules plus petits (200 nm – 1 μm)

- le "gel-out" qui simule les cas pathologiques ("gel-out 1" avec des vésicules entre 200-500 nm qui simule le cas non inflammatoire (OA) et "gel-out 2" avec des vésicules entre 50 – 200 nm qui simule le cas inflammatoire (PR)

Le marqueur fluorescent NBD-PC (figure 52B) a été utilisé afin de visualiser les mécanismes d'accommodation des vitesses des assemblages lipidiques trouvant sur les interfaces ou en volume.

Les valeurs du coefficient de frottement pour essais de frottement de 60 min sont portées dans la figure 58. Nous observons une grande variation pour le coefficient de frottement sellons le liquide synovial est testé sans et avec bicouches lipidiques sur les surfaces frottantes. Nous notons que le coefficient de frottement est stable pendant le frottement et que la valeur présentée est la valeur enregistrée en fin de manipulation, mais représentative de toute la manipulation.

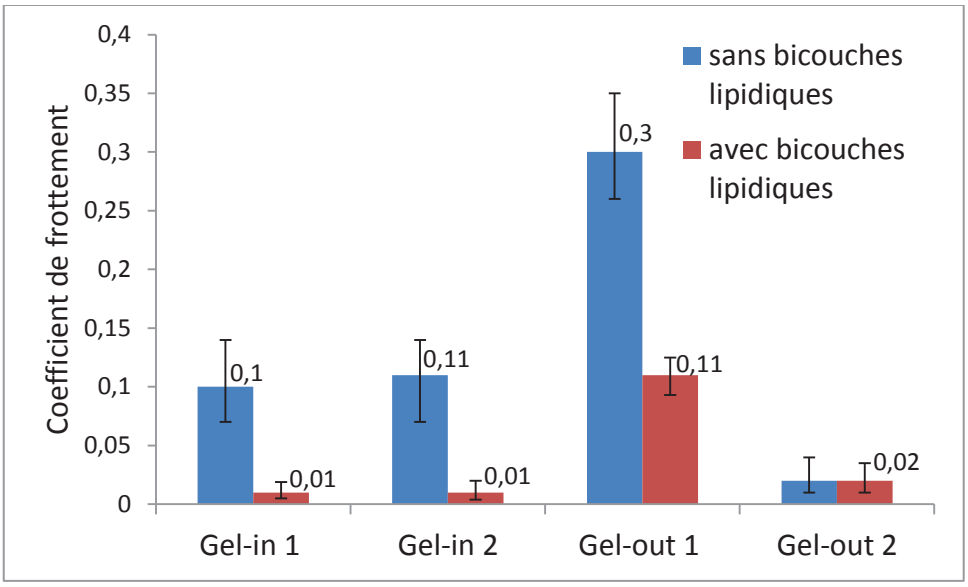


Figure 58. Valeurs du coefficient de frottement pour le contact modèle articulaire dans le cas des liquides synoviaux synthétiques fonction de la présence ou de l'absence de bicouches lipidiques sur les surfaces frottantes. Hystogramme des valeurs médianes affectées de l'écart entre les valeurs experimentales minimale et maximale obtenues sur 6 échantillons LS gel-in et 6 échantillons LS gel-out

Pour comprendre la variation du coefficient de frottements nous avons utilisé les visualisations en fluorescence du **contact pendant le frottement** avec ou sans interfaces lipidiques. Les images présentées par la suite sont celles visualisées après 60 min d'essai car ce sont les images les plus représentatives. Il s'agit de les corréler avec l'évolution du coefficient de frottement.

5.3.1.1.Cas gel-in

Nous n'avons pas observé de différence, en ce qui concerne le coefficient de frottement, entre le cas de "gel-in 1"et "gel-in 2", même si la taille de vésicules et la concentration de lipides sont différentes. Ainsi, pour les deux liquides synoviaux synthétiques gel-in nous avons obtenu un coefficient de frottement élevé et constant (environ 0.1) quand il a été cisaillé entre les surfaces de HEMA et verre non couvertes de bicouches lipidiques. Ce coefficient de frottement a été diminué d'un ordre de grandeur quand les surfaces frottantes ont été, au préalable, couvertes par des bicouches lipidiques (0.01) (figure 58).

Voyons à présent les images obtenues en microscopie de fluorescence après frottement.

- **Gel-in avec surfaces frottantes couvertes de bicouches lipidiques**

En microscopie de fluorescence, nous avons observé que malgré une même évolution du coefficient de frottement il y a des légères différences dans le glissement des assemblages lipidiques dans le contact, ainsi :

a) pour le cas "gel-in 1", des gros vésicules viennent hors du contact (flèche sur la figure 59A), tandis qu'à l'intérieur du contact, la fluorescence est uniforme, ceci est probablement dû à l'existence de seulement deux bicouches lipidiques qui forment l'interface avec verre et HEMA (figure 59B) ;

b) pour le cas "gel-in 2", des vésicules plus petits sont expulsés hors du contact (flèche sur la figure 59C), tandis que dans le contact il reste quelques vésicules lipidiques (flèche sur la figure 59D).

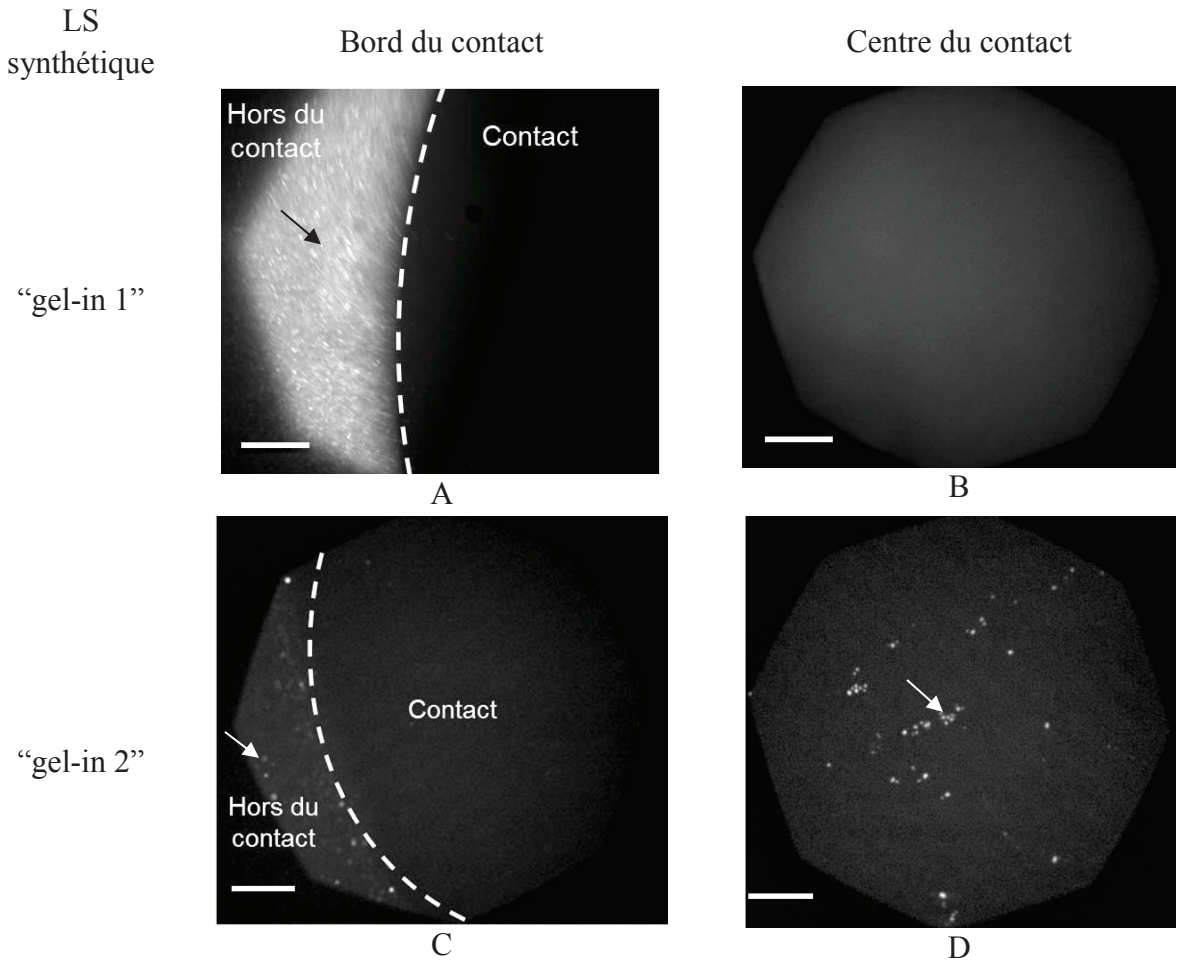


Figure 59. Visualisation en microscopie de fluorescence du contact modèle liquide synovial synthétique /articulation après frottement, pour les liquides "gel-in 1" (A et B) et "gel-in 2" (C et D) (la barre d'échelle represénte 400 μm)

Afin de mieux comprendre les évènements au cours du frottement, nous avons également visualisé les surfaces frottantes seules après les essais de frottement (figure 60). Ces images nous montrent que dans les deux cas de liquides synoviaux synthétiques gel-in, les bicouches lipidiques déposées sur les surfaces frottantes (verre/HEMA) restent intactes puisque l'on retrouve une fluorescence uniforme sur ces surfaces, comme en début de manipulation.

Nous pouvons donc penser que, dans ces cas-là, l'accommodation du glissement s'effectue entre les membranes lipidiques des vésicules présents dans le volume du liquide synovial et les interfaces lipidiques présentes sur le verre et la lentille HEMA (figure 61), ce qui conduit à un coefficient de frottement faible lorsque pour des surfaces frottantes couvertes de bicouches lipidiques. Dans le cas de "gel-in 2" les vésicules qui sont encore présentes dans le contact ont subi un glissement par roulement.

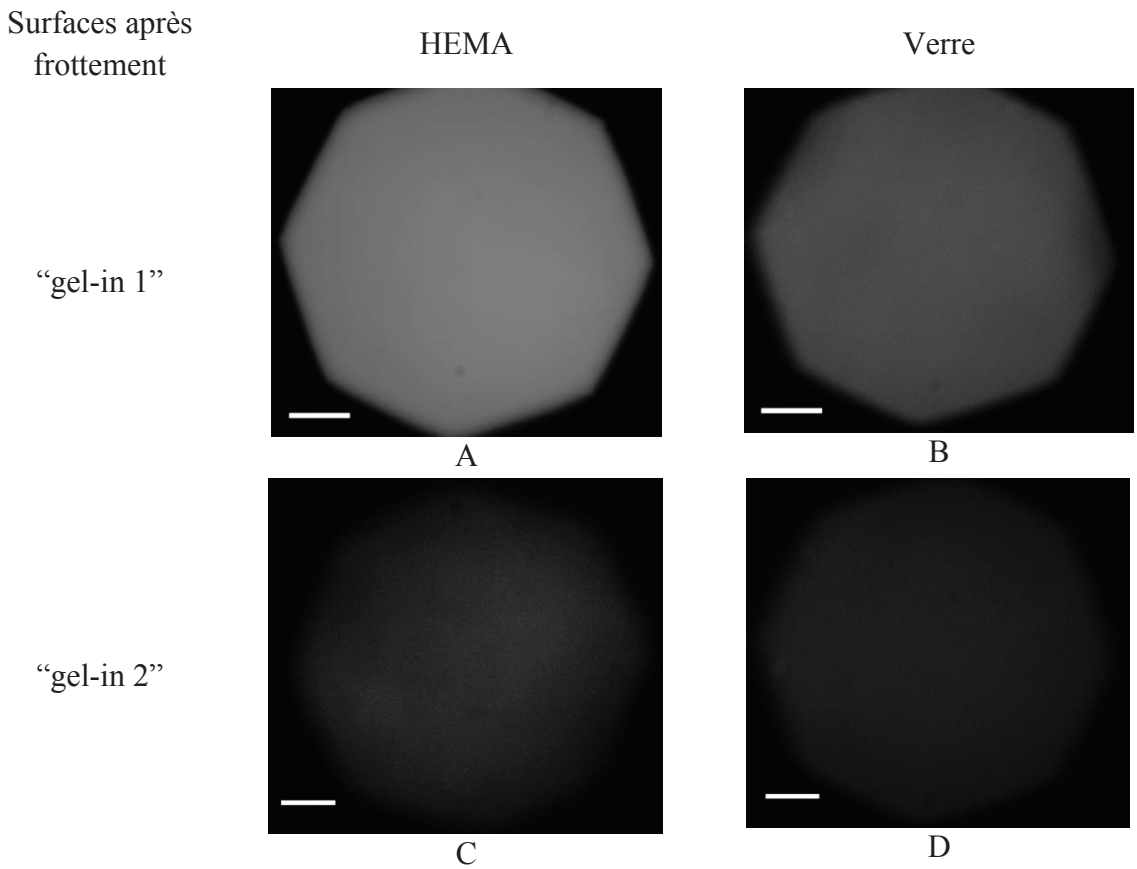


Figure 60. Visualisation en microscopie de fluorescence des surfaces frottantes couvertes de bicouches lipidiques, après frottement, dans le cas du liquide synovial synthétique "gel-in 1" (A et B) et "gel-in 2" (C et D) (la barre d'échelle réprésente 400 μm)

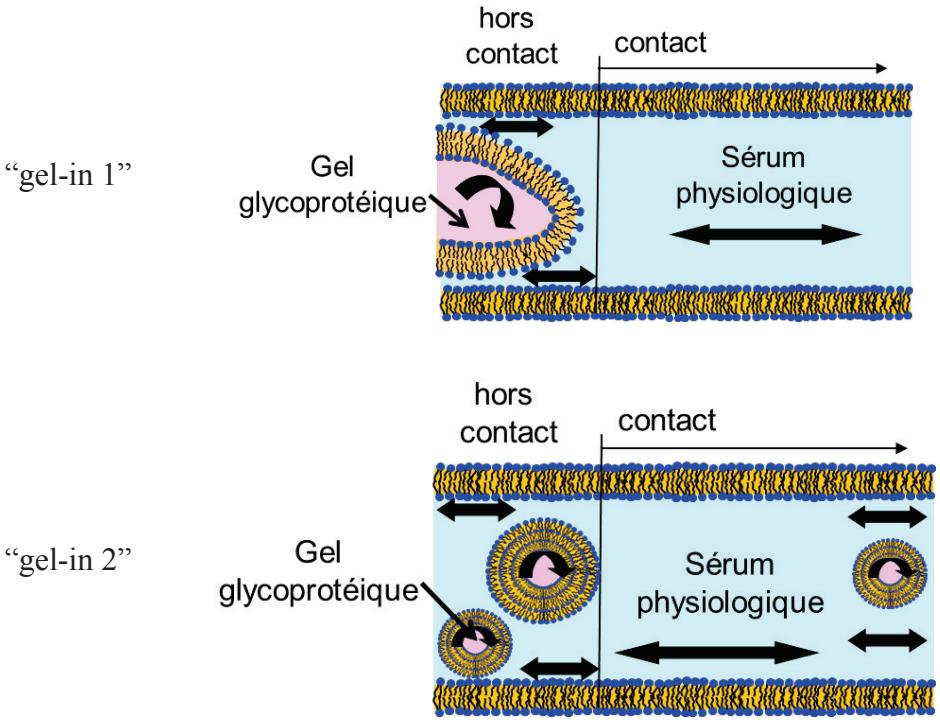


Figure 61. Accommodation de vitesses lors des essais de frottement avec bicouches lipidiques dans le cas des liquides synthétiques gel-in

- **Gel-in avec surfaces frottantes non couvertes de bicouches lipidiques**

En raison d'un problème informatique, les visualisations *in situ* n'ont pas été enregistrées. Ainsi, pour les essais de frottement sans bicouches lipidiques n'ont été enregistrées que des images des surfaces frottantes après frottement.

Les images de la figure 62 nous montrent que :

a) dans le cas de "gel-in 1", de gros vésicules sont accrochés sur la surface HEMA (flèche noire figure 62A), tandis que sur la surface en verre, nous trouvons des stries fluorescentes (flèche noir figure 62B) et des petits amas (correspondant flèche blanche figure 62B) ;

b) dans le cas de "gel-in 2", de petits vésicules sont absorbés sur HEMA (flèche blanche figure 62C) et des petits amas sont trouvés sur le verre (flècge blanche figure 62D).

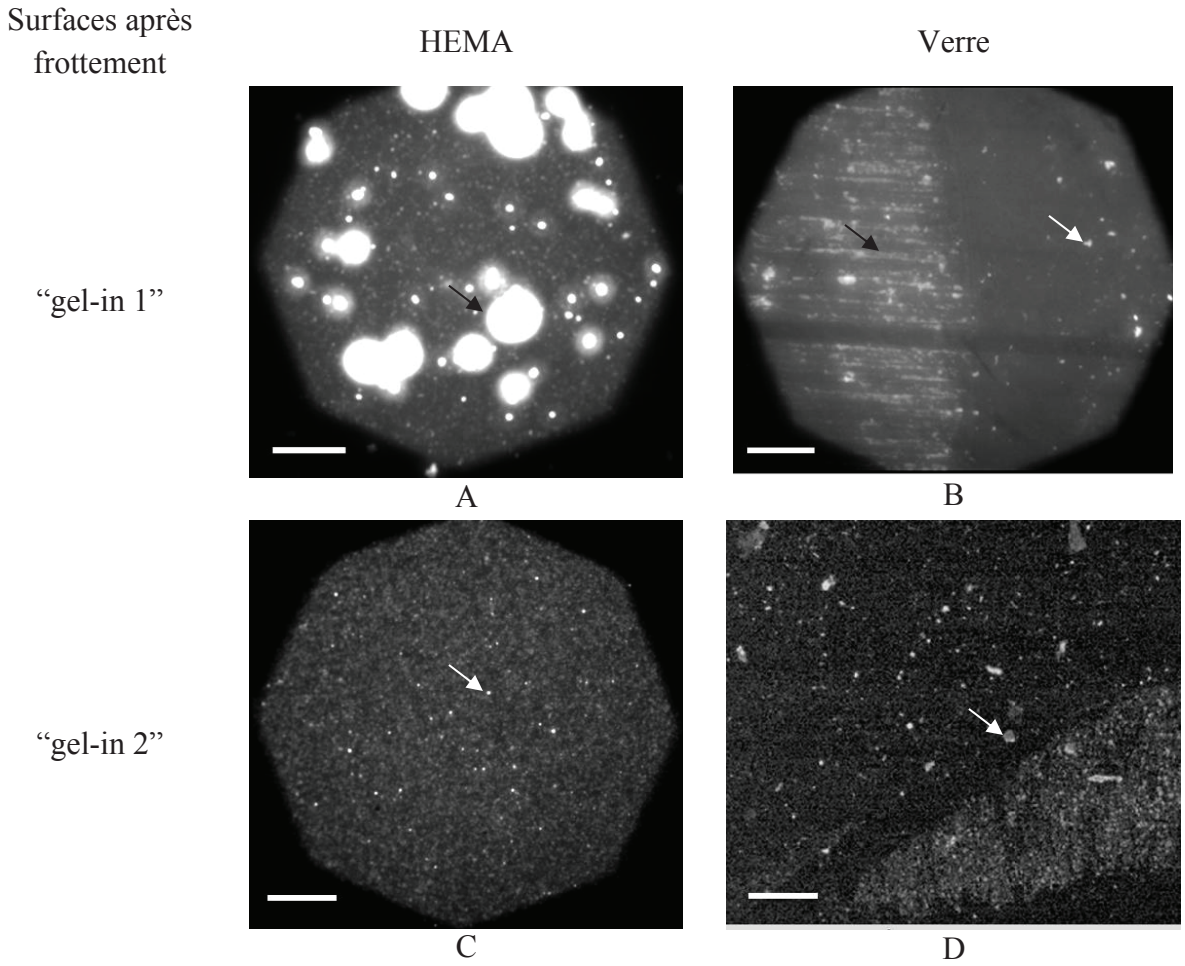


Figure 62. Visualisation en microscopie de fluorescence des surfaces frottantes après frottement sans bicouches lipidiques, dans le cas du liquide synovial synthétique "gel-in 1" (A et B) et "gel-in 2" (C et D) (la barre d'échelle représente 400 µm)

Ces observations suggèrent que l'accrochage des vésicules sur HEMA empêche leur roulement dans le contact, ce qui génère l'éclatement de ces structures vésiculaires et l'échappement du gel glycoprotéique qui s'accroche plus ou moins sur les surfaces en contact et sera couvert partiellement par des bicouches lipidiques en générant les amas fluorescents visualisés sur la surface de verre.

Par conséquent, l'accommodation des vitesses se fait soit par l'éclatement des vésicules et glissement dans le gel expulsé des vésicules soit formation de ménisques qui pontent les surfaces et augmentent le coefficient de frottement (figure 63).

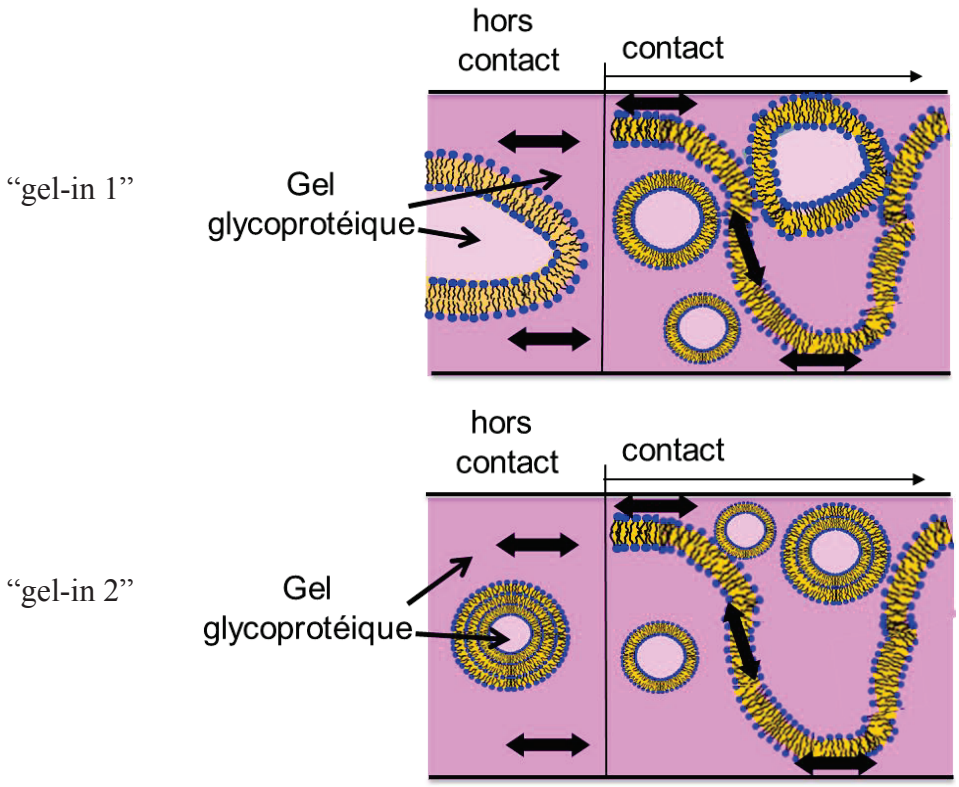


Figure 63. Accommodation de vitesses pour les essais de frottement sans bicouches lipidiques dans le cas de liquides synthétiques gel-in

5.3.1.2.Cas gel-out

Comme montré dans la figure 58, le coefficient de frottement avec bicouches lipidiques pour les deux cas gel-out est plus grand que pour les deux cas gel-in, tandis que avec bicouches lipidiques nous remarquons une différence entre "gel-out 1" et "gel-out 2", qui peut s'expliquer par le pourcentage lipidique différent dans les deux cas.

Pour comprendre les mécanismes d'accommodation de vitesses dans ces cas, analysons les images de fluorescence.

- **Gel-out avec surfaces recouvertes de bicouches lipidiques**

En microscopie de fluorescence nous avons observé des différences dans le glissement des assemblages lipidiques dans le contact.

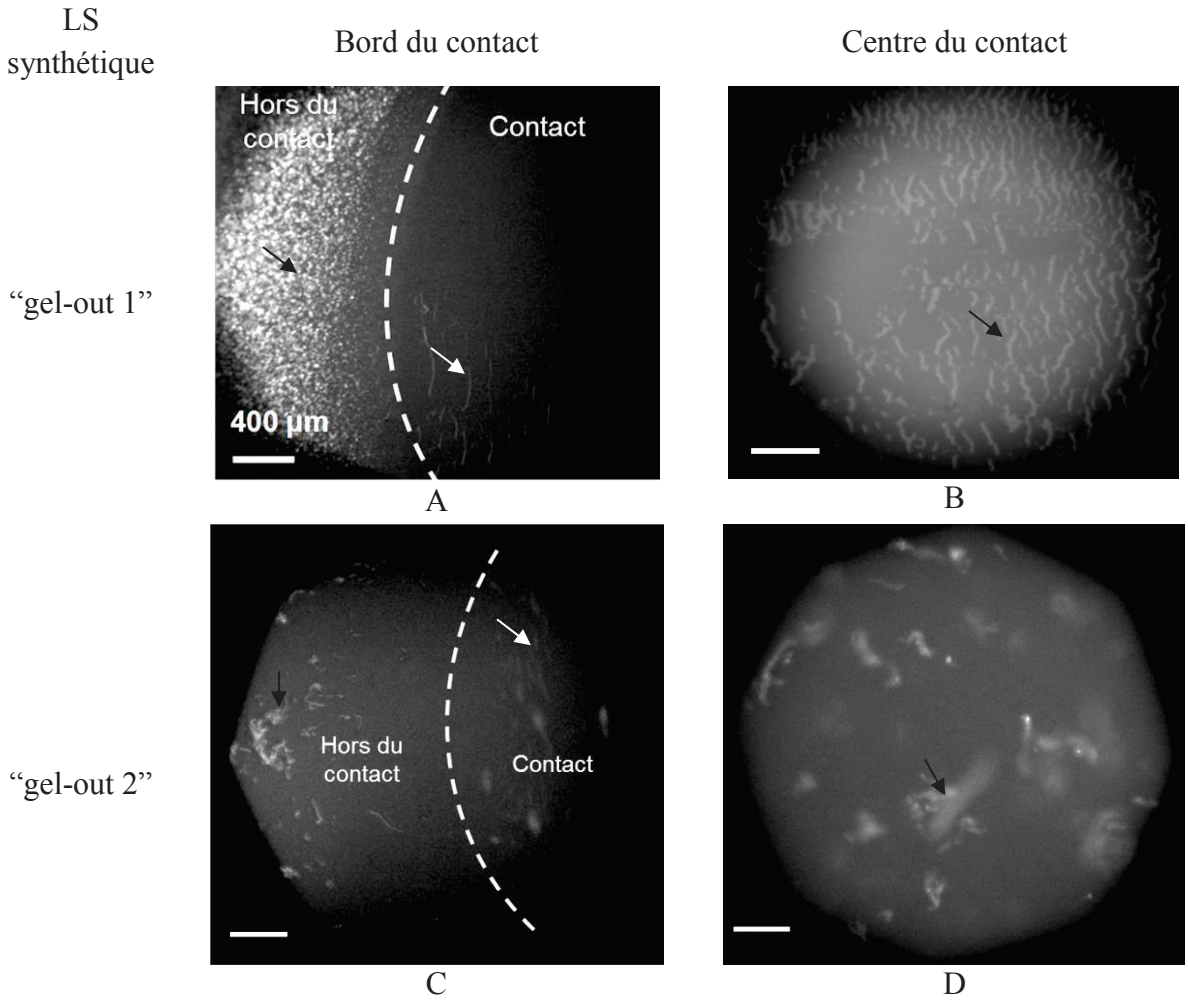


Figure 64. Visualisation en microscopie de fluorescence du modèle de contact liquide synovial/articulation après frottement, avec bicouches lipidiques, dans le cas du liquide synovial synthétique "gel-out 1" (A et B) et "gel-out 2" (C et D)
(la barre d'échelle représente 400 µm)

Ainsi :

a) pour le cas "gel-out 1", nous remarquons une éjection de lipides hors de contact comme dans le cas de "gel-in 1" (flèche noire sur la figure 64A), en rechanche nous observons la présence de petits rouleaux au bord du contact (flèche blanche sur la figure 64A) et de plus grands rouleaux à l'intérieur du contact, perpendiculaires à la direction du frottement (flèche noire sur la figure 64B); la formation des rouleaux peut être expliquée par la présence de gel-out susceptible de s'accrocher sur les bicouches lipidiques des surfaces frottantes et de les détruire en roulant les lipides autour du gel ;

b) pour le cas "gel-out 2", le lubrifiant ayant initialement une fluorescence uniforme (figure 57 D) devient non uniforme avec des amas fluorescents éjectés hors du contact (flèche noire sur la figure 64C), des petits amas fluorescents au bord du contact (flèche

blanche sur la figure 64C) et des grands amas fluorescents dans le contact (flèche noir sur la figure 64D).

Les observations des surfaces frottantes après frottement montrent, pour le cas de "gel-out 1", des gros rouleaux sur la surface HEMA (flèche noir sur la figure 64A) et des petits rouleaux (flèche blanche sur la figure 64B) et amas (flèche noire sur la figure 64B) sur la surface en verre. Pour le cas de gel-out 2, nous observons des petits amas sur HEMA (flèche sur la figure 64C) et une fluorescence non uniforme sur la surface en verre (figure 65D).

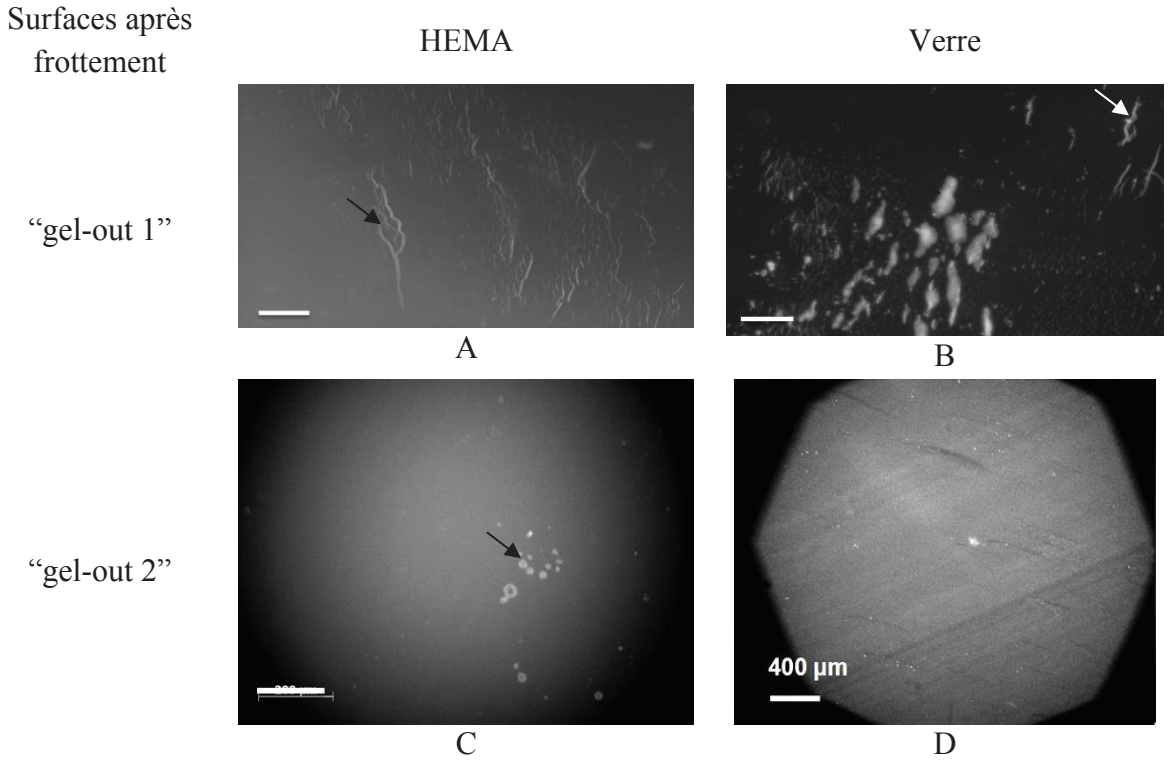


Figure 65. Visualisation en microscopie de fluorescence des surfaces frottantes après frottement avec bicouches lipidiques, dans le cas du liquide synovial synthétique "gel-out 1" (A et B) et "gel-out 2" (C et D) (la barre d'échelle représente 400 µm)

D'après ces observations en microscopie de fluorescence et en tenant également compte des coefficients de frottement obtenus, nous suggérons un mécanisme d'accommodation des vitesses (figure 66) dans ces assemblages lipidiques du type :

- glissement dans le gel glycoprotéique qui s'adsorbe sur les couches lipidiques des surfaces frottantes, en les détruisant et en les enroulant pour former de gros rouleaux sur HEMA et de petits rouleaux sur verre dans le cas "gel-out 1";
- glissement dans le gel out qui se colle sur les surfaces HEMA et verre, favorisant le dépôt de bicouches lipidiques non uniformes sur verre et détruit en même temps la couche sur HEMA par la formation d'amas sur HEMA ; ce type d'accommodation des vitesses est proposé pour le "gel-out 2" et pour celui-ci, nous ne retrouvons pas la formation de rouleaux peut-être en raison d'une dépolymérisation de la molécule

d'AH qui peut donner un coefficient de frottement plus faible, par une baisse de la viscosité ou par un étalement des lipides sur les surfaces.

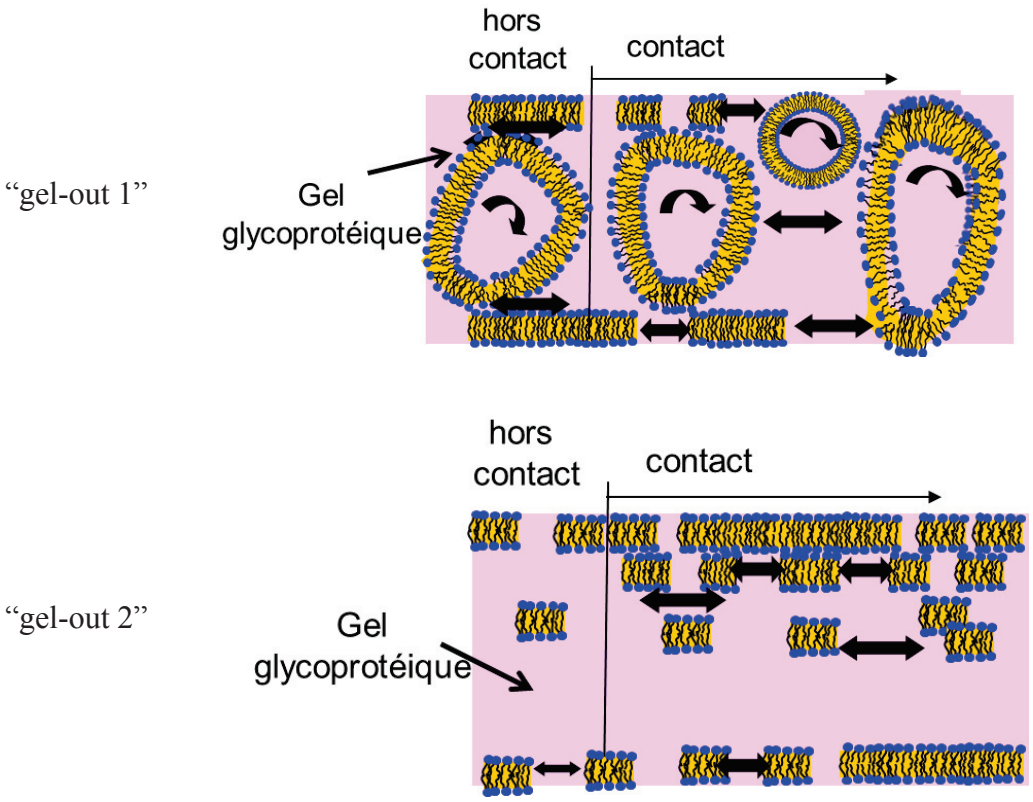


Figure 66. Accommodation de vitesses pour les essais de frottement avec bicouches lipidiques, dans les cas des liquides synthétiques gel-out

- **Gel-out avec surfaces frottantes non couvertes de bicouches lipidiques**

En raison d'un problème informatique les visualisations *in situ* lors du frottement n'ont pu être enregistrées. Ainsi, pour les essais de frottement sans bicouches lipidiques n'ont été enregistrées que les images de surfaces frottantes.

L'observation en fluorescence de ces surfaces après frottement (figure 67) montre :

a) dans le cas "gel-out 1", la formation d'un dépôt lipidique non uniforme sur HEMA avec de petits vésicules adsorbés (figure 67A) tandis que sur le verre nous remarquons des amas également avec un dépôt lipidique non uniforme (figure 67B) ;

b) dans le cas "gel-out 2" un dépôt lipidique non uniforme sur HEMA et verre (figure 67 C et D).

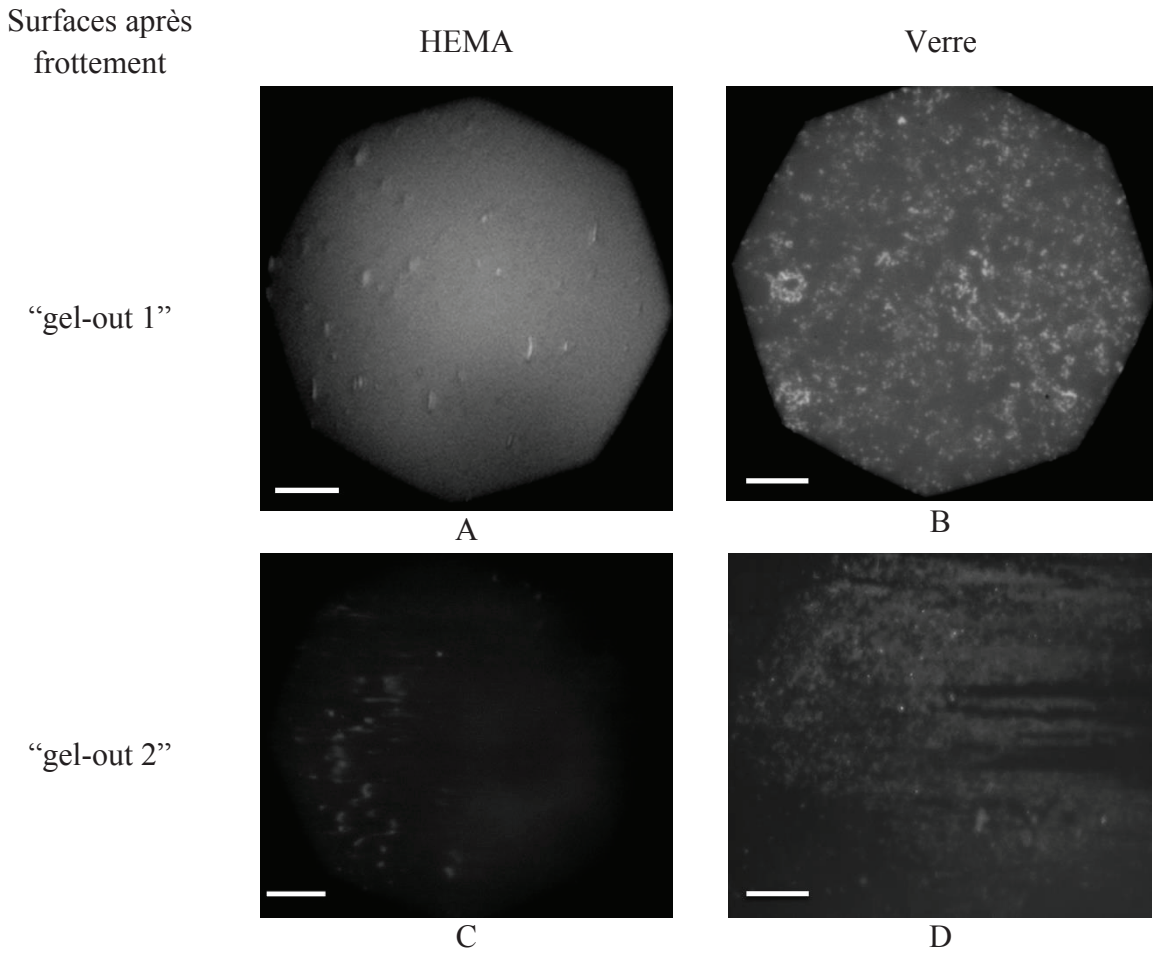


Figure 67. Visualisation en microscopie de fluorescence des surfaces frottantes après frottement sans bicouches lipidiques, dans le cas du liquide synovial synthétique "gel-out 1" (A et B) et "gel-out 2" (C et D) (la barre d'échelle représente 400 µm)

Au regard de ces observations, le mécanisme d'accommodation des vitesses dans les assemblages moléculaires lipidiques proposé pour ces cas-là est (figure 68) :

- pour le cas "gel-out 1", l'accrochage de gel-out sur les surfaces en contact avec le glissement dans la couche de gel entre les surfaces et les vésicules, ce qui génère la rupture de vésicules avec la formation de ménisques ;
- pour le cas "gel-out 2", glissement dans le gel-out qui se colle sur les surfaces HEMA et verre, favorisant ainsi le dépôt de bicouches lipidiques non uniformes sur verre avec éclatement des vésicules : cette évolution conduit à un coefficient de frottement faible, par formation de multicouches lipidiques non uniformes.

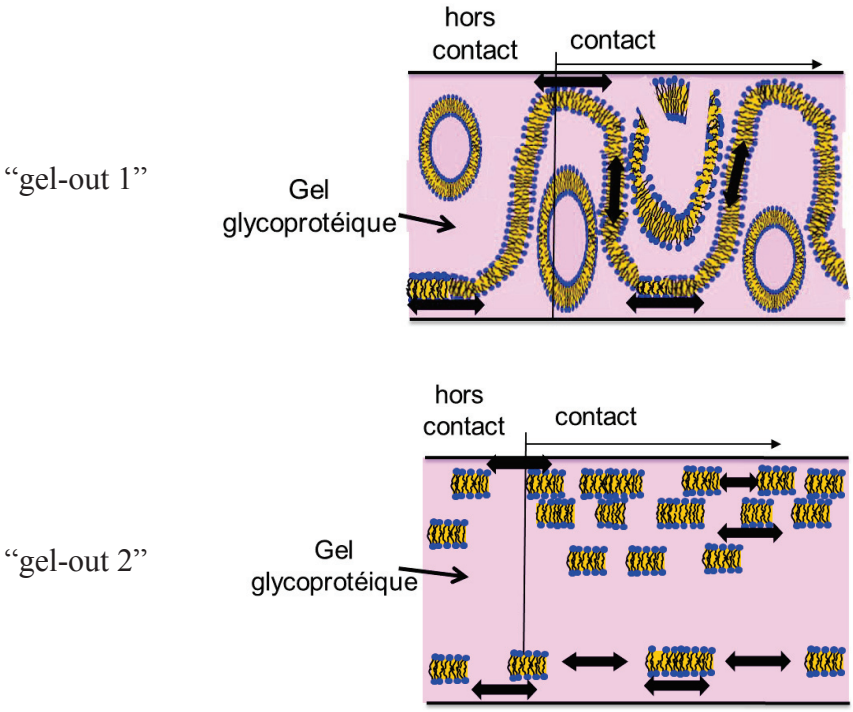


Figure 68. Accommodation de vitesses pour les essais de frottement sans bicouches lipidiques dans le cas des liquides synthétiques gel-out

5.3.2. Liquides synoviaux obtenus à partir de cultures cellulaires (surnageants)

Nous avons testé deux types de liquides synoviaux reproduits à partir de surnageants (sain et inflammatoire) qui ont été obtenus par cultures cellulaires à partir de synoviocytes (Annexe 8) maintenus en culture pendant 10 jours ou 30 jours.

- **Surnageant maintenu en culture pendant 10 jours**

Etant donné la quantité faible de surnageants pour ce type de liquide, nous avons seulement réalisé des essais tribologiques avec bicouches lipidiques sur les surfaces frottantes.

Pour le surnageant sain nous avons obtenu un coefficient de frottement plus faible (0.04) sans dégradation des bicouches lipidiques (figure 69A) par rapport au surnageant inflammatoire pour lequel le coefficient de frottement a augmenté jusqu'à 0.07 avec une dégradation importante de la bicouche lipidique et la formation de rouleaux (flèche blanche sur la figure 64B) et des amas fluorescents (flèche noire sur la figure 64B) qui s'accumulent au bord de contact ou qui sont éjectés hors du contact.

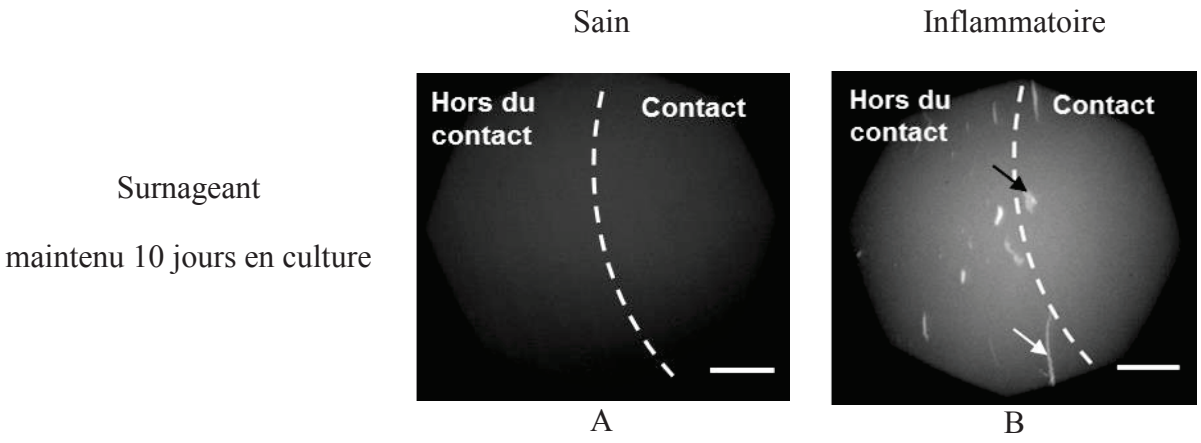


Figure 69. Visualisation en microscopie de fluorescence du contact modèle liquide synovial/articulation après frottement, avec bicouches lipidiques, pour les surnageants maintenus 10 jours en culture (la barre d'échelle représente 200 μm)

- **Surnageants maintenu en culture pendant 30 jours**

Les valeurs du coefficient de frottement après un essai de 60 min avec les surfaces frottantes non couvertes de bicouches lipidiques ou couvertes de bicouches lipidiques sont portées sur la figure 70.

Ainsi, pour le surnageant sain nous observons une augmentation du coefficient de frottement à 0.12 sans bicouches lipidiques et une diminution à 0.03 quand les surfaces frottantes ont été au préalable, couvertes par des bicouches lipidiques, tandis que pour les surnageants inflammatoires sans bicouches lipidiques nous trouvons un coefficient de frottement de 0.07 et lorsque les surfaces sont couvertes de bicouches lipidiques nous trouvons 0.06.

En microscopie de fluorescence nous avons constaté que:

a) pour le surnageant sain, une fluorescence uniforme dans le cas d'essai tribologique avec les surfaces couvertes de bicouche lipidique (figure 71A);

b) pour le surnageant inflammatoire, une dégradation importante de la bicouche lipidique avec la formation de rouleaux au bord du contact (correspondant à la flèche noire figure 71B) et de petits amas fluorescents dans le contact.

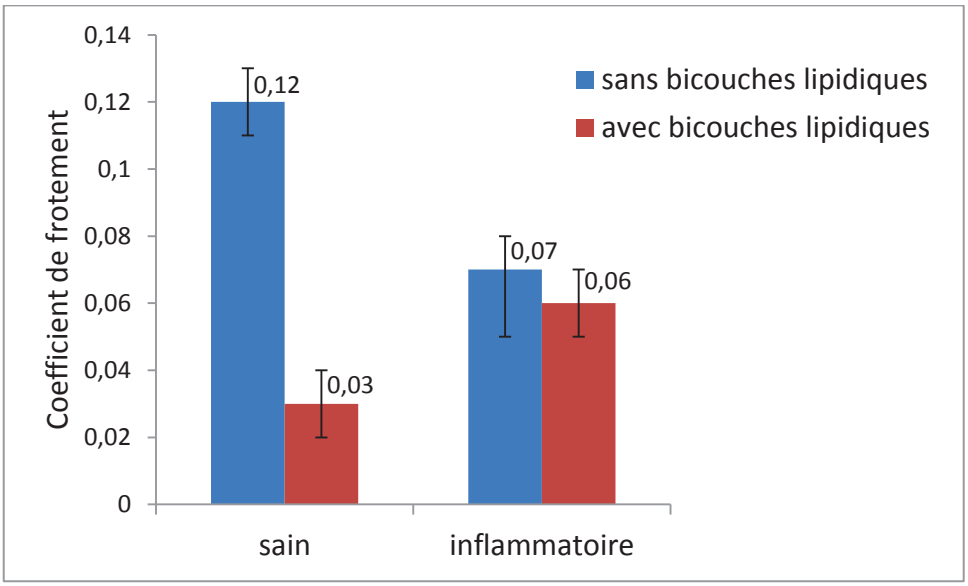


Figure 70. Variation du coefficient de frottement pour le contact modèle articulaire en présence ou non des bicouches lipidiques sur les surfaces frottantes dans le cas des surnageants maintenus 30 jours en culture. Hystogramme des valeurs médianes affectées de l'écart entre les valeurs experimentales minimale et maximale obtenues sur 3 échantillons surnageants sains et 3 échantillons surnageants inflammatoires

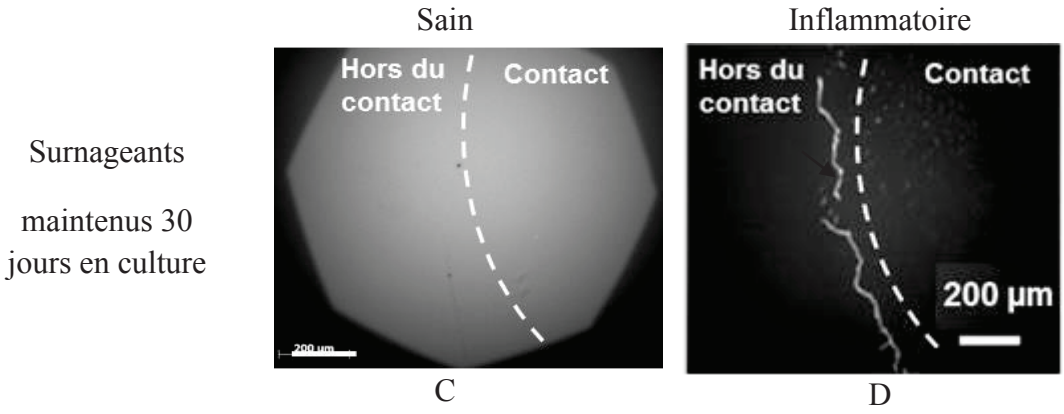


Figure 71. Visualisation en microscopie de fluorescence du contact modèle liquide synovial/articulation après frottement, pour les surnageants maintenus 30 jours en culture (la barre d'échelle représente 200 µm)

Prenant en compte les coefficients de frottement et les images en fluorescence obtenues nous proposons les mécanismes d'accommodation de vitesses suivants:

- le coefficient de frottement faible, la non dégradation des bicouches lipidiques observée sur les images en fluorescence mais aussi la structure supramoléculaire

(chapitre III) pour le surnageant **sain** nous font penser à une accommodation de vitesses entre les membranes lipidiques comme dans le cas de gel-in pour les essais de frottement avec bicouches lipidiques (figure 61) ;

- dans le cas de surnageant inflammatoire la présence de rouleaux en corrélation avec le grand coefficient de frottement nous fait penser à une accommodation de vitesses par écoulement entre les interfaces lipidiques autour du gel glycoprotéique comme dans le cas de (figure 66).

5.3.3. Prélèvements de liquide synovial sain et pathologique

Les valeurs du coefficient de frottement après test de frottement de 60 min sont figurées sur la figure 72.

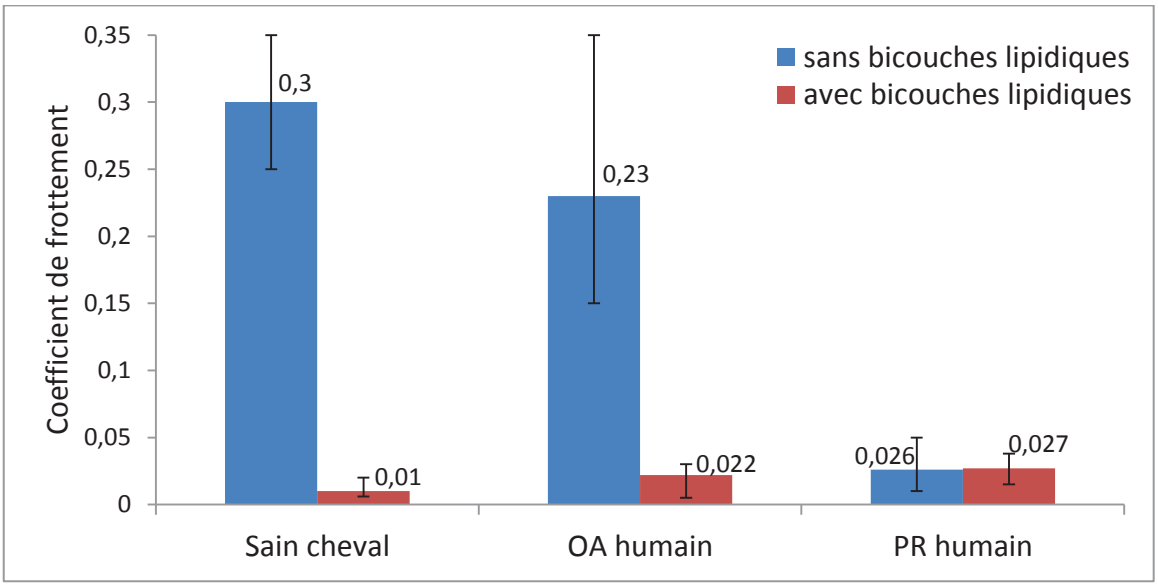


Figure 72. Variation du coefficient de frottement pour le contact modèle articulaire fonction de la présence ou non de bicouches lipidiques sur les surfaces frottantes, dans le cas sain (cheval) et le cas pathologique OA/PR (humain). Hystogramme des valeurs médianes affectées de l'écart entre les valeurs experimentales minimale et maximale obtenues sur 2 échantillons LS sain, 6 échantillons LS OA et 4 échantillons LS PR

Ainsi :

a) pour les échantillons de liquide synovial sain de cheval, nous avons obtenu un coefficient de frottement élevé (0.25) quand il a été cisaillé entre les surfaces de HEMA et verre non couvertes de bicouches lipidiques et un coefficient de frottement faible (0.008) quand les surfaces frottantes ont été au préalable couvertes par des bicouches lipidiques;

b) pour le liquide synovial non inflammatoire OA nous avons obtenu des valeurs proches du cas sain, donc un coefficient de frottement élevé (0.23) quand le liquide a été cisaillé entre surfaces sans bicouches lipidiques et un coefficient de frottement faible (0.022), mais environ trois fois plus grand que celui obtenu pour le cas sain, quand le liquide a été cisaillé entre surfaces recouvertes de bicouches lipidiques;

c) dans le cas inflammatoire PR nous avons obtenu des valeurs faibles de coefficient de frottement, semblables dans les deux cas : avec (0.026) et sans (0.027) bicouches lipidiques.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'accommodation de glissement en frottement nous analysons aussi les images en microscopie de fluorescence pour ces échantillons. Ainsi nous observons :

- dans le cas du liquide synovial animal sain une fluorescence homogène (figure 73A) ;
- une faible dégradation avec la formation de rouleaux très fins hors du contact (flèche blanche, figure 73B) dans le cas de liquide synovial humain non inflammatoire ;
- dans le cas du liquide synovial inflammatoire une fluorescence homogène mais d' intensité nettement atténuée (figure 73C).

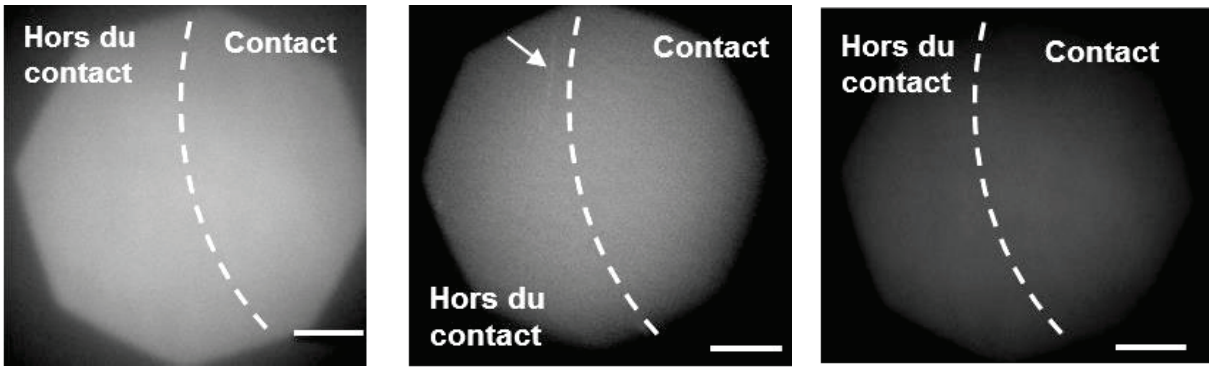


Figure 73. Visualisation en microscopie de fluorescence du contact modèle liquide synovial/ articulation après frottement, avec bicouches lipidiques, pour le liquide synovial prélevé : A – cheval sain, B- humain OA, C- humain AR (la barre d'échelle représente 200 μm)

Pour le cas sain le comportement tribologique et la structure supramoléculaire (cf. chapitre III) similaires au gel-in et les images de fluorescence ne révélant aucune dégradation des bicouches lipidiques, nous font penser à une accommodation de vitesses, similaire à celle de gel synthétique "in", entre les membranes lipidiques qui couvrent les surfaces frottantes et celles de vésicules du volume pour le cas de frottement avec bicouches lipidiques (figure 61) et par l'éclatement des vésicules et glissement dans le gel expulsé des vésicules (figure 63) pour le frottement sans bicouches lipidiques. Les valeurs plus élevées du frottement sans bicouches lipidiques des liquides synoviaux prélevés aux liquides reconstitués par voie

synthétique peuvent être dues à une viscosité beaucoup plus grande dans le cas des prélèvements sains par rapport aux reconstitués “gel-in”.

Dans le cas de prélèvements humains OA, au regard des images de fluorescence montrant une très légère dégradation des bicouches lipidiques par la formation de rouleaux très fins et le comportement tribologique similaire au gel synthétique “out 2”, nous pensons que le coefficient de frottement dépend de l’accommodation de vitesses par la formation de rouleaux, comme présentés dans la figure 66. Le fait que les rouleaux soient plus petits dans le cas présent peut provenir d’une légère dépolymérisation de l’acide hyaluronique expliquant aussi la baisse de la viscosité constatée dans le paragraphe 5.1. Comme pour le cas sain, nous pensons que le glissement pour le frottement sans bicouches lipidiques s’effectue dans la couche de gel entre les surfaces et les vésicules, ce qui peut générer la rupture de vésicules avec formation de ménisques (figure 68). La valeur du coefficient de frottement sans bicouches lipidiques est plus faible que dans le cas sain mais plus grande que pour les liquides synthétiques ; ceci peut également s’expliquer par une valeur de viscosité qui se trouve entre celles des deux liquides spécifiés auparavant.

Dans le cas inflammatoire (PR) le coefficient de frottement faible et les images de fluorescence qui ne révèlent aucune dégradation des bicouches lipidiques nous font penser à un mécanisme de glissement similaire au “gel-out 2” avec une accommodation de vitesses entre les dépôts de bicouches lipidiques générés par les vésicules lipidiques du liquide synovial et éclatent sous l'effet des sollicitations tribologiques (figure 66 et 68).

5.4.Discussion et conclusions

Le coefficient de frottement un ordre de grandeur plus grand pour les essais effectués sans bicouches lipidiques par rapport à ceux effectués avec bicouches lipidiques nous montre l'importance des interfaces lipidiques dans la biolubrification articulaire. Par conséquence, une destruction des bicouches lipidiques formant l'interface liquide synovial / cartilage pourra augmenter fortement le coefficient de frottement et l'usure dans l'articulation.

D'autre part les résultats obtenus en présence des bicouches lipidiques montrent que :

a) Une structure du lubrifiant formée par vésicules remplis de gel glycoprotéique ("gel-in") et entourés de multicouches lipidiques minimise le coefficient de frottement et l'usure par glissement dans les couches aqueuses piégées entre deux membranes lipidiques qui forment la paroi des vésicules du lubrifiant ou l'interface lubrifiant / corps en contact. Ce comportement validé par les reconstitutions synthétiques "gel-in" a été mis en évidence aussi pour les lubrifiants types " surnageants sains" et les liquides synoviaux prélevés sur des articulations animales saines. Cela est en accord avec la structure saine "gel-in" observée pour ces types de lubrifiant et décrite dans le chapitre III. Dans ces cas on n'a pas observé de variations du comportement tribologique dans le régime de lubrification limite avec l'augmentation de la quantité des lipides ("gel-in 1") ou avec le nombre des multicouches lipidiques formant la paroi des vésicules ("gel-in 2"), malgré une différence nette de la viscosité. C'est pour cela que dans les perspectives après ce travail il paraitrait intéressant d'étudier les différences du comportement tribologique entre " gel-in 1 " et " gel-in 2 " dans les conditions de lubrification hydrodynamique.

b) La destruction des structures vésiculaires avec apparition du gel glycoprotéique entre les vésicules mais sans augmentation de la concentration lipidique ("gel-out 1 ") génère une augmentation du coefficient de frottement des interfaces lipidiques par un enroulement du gel glycoprotéique dans les bicouches lipidiques formant l'interface lubrifiant / corps en contact, ce qui augmente leur usure. Ce comportement validé par les reconstitutions synthétiques "gel-out 1" a été mis en évidence aussi pour les lubrifiants de types " surnageants inflammatoires " et les liquides synoviaux prélevés sur des articulations humaines pathologiques non inflammatoires (OA). Cela est en accord avec la structure pathologique "gel-out" observée pour ces types de lubrifiants et décrite dans le chapitre III. Pour ces cas on pense que les conditions inflammatoires en cultures cellulaires ne sont pas les mêmes que celles des prélèvements PR. En effet, le processus inflammatoire *in vivo* entraîne beaucoup d'autres processus en sus de l'activation des cytockines (le seul processus reproduit dans nos surnageants inflammatoires) : par exemple, une augmentation de la concentration lipidique par l'extravasation de plasma sanguin de la membrane synoviale.

c) La destruction des structures vésiculaires avec apparition du gel glycoprotéique entre les vésicules et avec augmentation de la concentration lipidique ("gel-out 2") génère

une réduction du coefficient de frottement d'environ 5 fois par rapport au cas "gel-out 2" mais une augmentation d'environ deux fois par rapport au cas sain. La diminution du coefficient de frottement peut être expliquée par l'augmentation de la quantité lipidique et la diminution de la viscosité du "gel-out 2" par rapport au "gel-out 1". L'augmentation du coefficient de frottement est expliquée par l'usure des interfaces lipidiques dans le cas de "gel-out 2" par rapport au "gel-in" (non usure). Ce comportement est dû à une accommodation des vitesses par glissement dans le gel glycoprotéique piégé entre les membranes lipidiques qui forment la paroi des vésicules du lubrifiant ou l'interface lubrifiant / corps en contact, glissement favorisé par une quantité importante des lipides dans le volume de lubrifiant. Si cette quantité est insuffisante pour permettre le glissement on va favoriser plutôt un roulement comme le cas "gel-out 1". Ce comportement validé par les reconstitutions synthétiques "gel-out 2" a été mis en évidence aussi pour les liquides synoviaux prélevés sur des articulations humaines pathologiques inflammatoires (PR).

L'ensemble de ces résultats montre l'importance des assemblages moléculaires de type lipidique dans le volume du liquide synovial (vésicules multilamellaires) et des interfaces liquide synovial / cartilage (multicouches lipidiques) dans l'obtention du faible frottement et faible usure des articulations synoviales saines. En conséquence, la destruction des structures lipidiques dans le volume du liquide synovial ou sur la surface du cartilage apparait comme un paramètre important à prendre en compte dans la détection précoce des pathologies articulaires.

Chapitre VI. Synthèse et perspectives

Les maladies articulaires sont, pour la plupart, consécutives au vieillissement ou à un traumatisme et évoluent vers l'usure des cartilages, ce qui se traduit par un handicap sévère. Pour l'instant, aucun traitement permettant la réparation du tissu cartilagineux n'est vraiment efficace. Cela est dû principalement aux difficultés liées à l'identification des causes de ces maladies qui sont liées notamment à la complexité structurale et biochimique du liquide synovial qui présente à la fois une fonction lubrifiante et une fonction de nutrition des cartilages.

C'est dans ce contexte que le but de cette thèse a été d'analyser l'évolution des propriétés structurales, biochimiques, nanomécaniques et tribologiques des fluides synoviaux de l'état sain aux pathologies articulaires incipientes, afin de comprendre le rôle des assemblages supramoléculaires actifs dans la biolubrification.

Ainsi un premier objectif a été d'analyser le liquide synovial sain afin de comprendre le rôle de la structure supramoléculaire dans l'obtention des durées de vie pour les contacts articulaires de plus de 70 ans, ce qui représente une performance tribologique remarquable jamais rencontré ex vivo.

Ainsi différentes techniques d'analyse structurale (microscopies électroniques avec plusieurs méthodes de préparation dans des conditions cryogéniques ou variation d'humidité couplées aux techniques de microscopie confocale et microscopie à force atomique) ont été employées afin d'identifier les structures supramoléculaires représentatives du volume du liquide synovial sain. A partir de prélèvements animaux sains (rat, chien, cheval) et de dosages biochimiques nous avons montré que le liquide synovial sain contient des assemblages moléculaires sous forme de vésicules remplis de gel glycoprotéique (acide hyaluronique et protéines). Ces vésicules sont entourés de 3 à 7 bicouches lipidiques (figure 74A) et sont assemblés entre eux en formant des réseaux lipidiques (figure 74B). D'autres travaux récents [35] ont également montré l'existence de multicouches lipidiques sur la surface du cartilage articulaire (interface tribologique) et d'autres études montrent que ces multicouches sont fixées sur la surface frottante du cartilage par l'intermédiaire d'une molécule glycoprotéique appelée généralement lubricine, ce qui assure leur résistance tribologique [160] (figure 74C). La reconstitution à partir de substances commerciales (voie synthétique) du volume du lubrifiant biologique ainsi que de l'interface liquide synovial / cartilage (figure 74D) nous a permis d'étudier ces performances tribologiques par rapport aux prélèvements animaux sains.

Pour ce faire, un modèle biotribologique expérimental a été utilisé afin de reproduire ex vivo les propriétés mécaniques et physico-chimiques des composants articulaires. Ainsi, les cartilages articulaires ont été reconstitués en utilisant un matériau polymérique de type hydrogel. Les assemblages moléculaires du fluide synovial (multicouches lipidiques et vésicules du gel d'acide hyaluronique et d'albumine) ont été reconstituées *ex vivo* en utilisant

des techniques de physique nanostructurale comme le dépôt lipidique par éclatement de vésicules et différentes techniques de fabrication des vésicules uni- et multilamellaires. L'évolution de ces assemblages moléculaires a été visualisée *in situ*, au cours d'essais de frottement, par microscopie optique en fluorescence obtenue avec des marqueurs moléculaires phospholipidiques spécifiques.

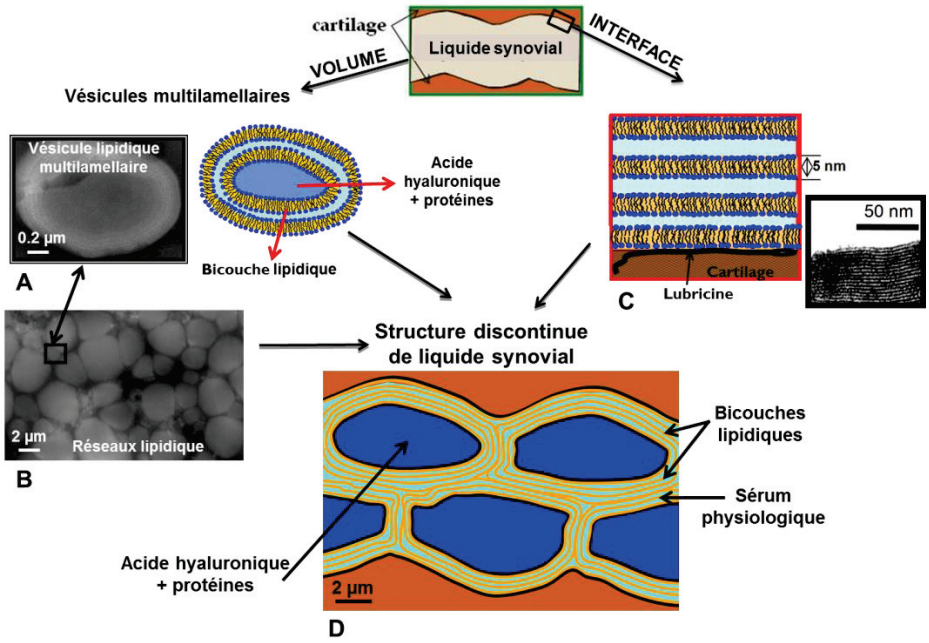


Figure 74. Structures supramoléculaires, observées dans l'articulation **saine,** qui forment la structure discontinue du liquide synovial : A- vésicule lipidique multilamellaire observé en MET avec coloration négative; B- réseaux lipidiques du volume du liquide synovial observés en Wet-STEM ; C- multicouches lipidiques sur la surfaces du cartilage observées en MET après inclusion en résine et D- modèle de la structure discontinue du liquide synovial

Les résultats expérimentaux (visualisation en fluorescence et mesure du coefficient de frottement) permettent de localiser où et comment s'effectue le glissement dans les assemblages moléculaires de la synovie ce qui contribue à expliquer l'origine des valeurs de coefficient de frottement mesurées. Par exemple, si le glissement se localise dans le gel glycoprotéique le coefficient de frottement est de 0.1, alors qu'il n'est que de 0.01 lorsqu'il se localise dans les multicouches lipidiques.

L'ensemble de ces résultats tend à indiquer que les assemblages supramoléculaires du fluide synovial sain génèrent, par des actions physicochimiques, la formation d'un « motif tribologique élémentaire » constitué d'une couche de sérum physiologique (quelques nm d'épaisseur) piégée entre deux bicouches lipidiques. Ce motif tribologique élémentaire localise l'accommodation des vitesses et impose un coefficient de frottement très faible (0.01) pour l'articulation saine. Ce mécanisme d'accommodation de vitesse n'est rendu possible que par la présence des vésicules lipidiques remplies de gel qui compense la rugosité des cartilages articulaires, tout en uniformisant la pression de contact.

D’autre part nous avons mis en évidence que l’absence des interfaces lipidiques sur les surfaces frottantes entraîne une augmentation du coefficient de frottement d’un ordre de grandeur et la destruction de la structure volumique des liquides synoviaux synthétiques semblable à celle des prélèvements animaux. Par conséquent, la mise en évidence de cette destruction *in vivo* pourra être un signe précoce de certaines pathologies.

Afin d’étudier l’évolution des assemblages moléculaires volumiques du liquide synovial et/ou ceux formant l’interface avec les cartilages dans le cas pathologique nous avons effectué une analyse comparative biochimie / structure des prélèvements pathologiques humains. Cette analyse a ensuite été utilisée dans le but d’analyser les conséquences de cette évolution sur les propriétés tribologiques à partir des reconstitutions de liquides synthétiques ou en cultures cellulaires.

Les résultats de ces analyses montrent que dans les prélèvements pathologiques non inflammatoires, la taille des vésicules et le nombre des couches lipidiques les entourant restent semblables au cas sain. Par contre l’analyse biochimique montre que dans ces prélèvements il y a une légère activation de l’action enzymatique de la phospholipase A2, ce qui pourra entraîner une destruction partielle de la structure en réseaux des vésicules et la présence de gel glycoprotéique entre ces vésicules. Cela a été confirmé par : a) des mesures de forces atomiques en AFM qui mettent en évidence une masse gélatineuse molle entre les vésicules, b) une réduction d’environ 50% de la concentration des lipides structuraux (PL). La conséquence tribologique de cette destruction structurale a été analysée à partir des liquides synthétiques “gel-out 1". Cette analyse a montré une augmentation du coefficient de frottement et de l’usure des interfaces lipidiques avec une localisation des vitesses par glissement ou roulement dans le “gel-out 1". En outre il ne faut pas oublier que ces pathologies sont souvent corrélées avec un endommagement de la surface frottante du cartilage et donc de l’absence d’interface lipidique qui pourra expliquer le coefficient de frottement grand qui est obtenu dans ce cas. Cet endommagement du cartilage a été suggéré par les dosages biochimiques de la lubricine qui montrent une augmentation de sa concentration d’environ 50% dans le volume du liquide synovial pathologique non inflammatoire par rapport au liquide synovial sain.

Dans les pathologies inflammatoires nous remarquons une diminution significative de la viscosité des prélèvements avec l’apparition de vésicules unilamellaires 2 à 5 fois plus petits que dans le cas sain et une diminution de la concentration des phospholipides d’environ 60% tandis que la concentration de lipides totaux augmente d’environ un ordre de grandeur par rapport au cas sain. Outre les variations de concentration lipidique mentionnées ci-dessus, cette modification structurale peut également être due à l’activation de l’action enzymatique de la phospholipase A2 deux fois plus importante environ que dans des cas pathologiques non inflammatoires. La conséquence tribologique de cette modification structurale a été analysée à partir des liquides synthétiques “gel-out 2" qui montrent l’augmentation du coefficient de frottement et de l’usure des interfaces lipidiques avec une localisation des vitesses par glissement dans le “gel-out". En revanche, la baisse de viscosité dans cette

structure, due principalement à l'augmentation de la concentration lipidique, entraîne une baisse du coefficient de frottement dans le cas sans interfaces lipidiques. Mais pour qu'un lubrifiant soit efficace il doit posséder deux propriétés : faible valeur de frottement et grande séparation des surfaces en contact, d'où l'amortissement dû à la viscosité. En raison de la faible viscosité ce type de liquide synovial pourra bien fonctionner en frottement mais pas en amortissement, d'où sa non efficacité dans les articulations synoviales. Etant donné la multitude d'études visant à vérifier le rôle des différents liquides synoviaux en amortissement [101] nous n'avons pas étudié cette propriété tribologique au cours de cette thèse.

Parallèlement à cela, les analyses lipidomiques sur les différents liquides synoviaux prélevés ont montré un changement de la quantité des différentes classes de phospholipides du cas sain au pathologique. Ainsi, ces analyses montrent que le phospholipide prédominant dans tous les échantillons est le PC avec une diminution d'environ 20% dans les cas pathologiques, cas où l'on trouve aussi du PE et du PS, lipides qui sont responsables d'une augmentation du coefficient de frottement entre les interfaces lipidiques [67].

D'autre part, la présente étude a mis en évidence l'augmentation de la concentration du cholestérol dans les liquides synoviaux pathologiques, ce qui entraîne la formation des cristaux dans ces liquides et qui pourra influencer leur comportement tribologique. Par la suite il parait intéressant d'analyser les mécanismes tribologiques générés par la présence de ces cristaux.

Comme l'analyse des prélèvements humains spontanés a montré beaucoup de variabilité inter-individu et afin d'étudier donc plus finement l'évolution de la lubrification pathologique nous avons aussi développé dans cette thèse des modèles de lubrifiants obtenus à partir de cultures cellulaires de synoviocytes humains en rajoutant l'action de facteurs pathologiques de type inflammatoire (ajout des cytokines). Les résultats de ces modèles cellulaires montrent que les lubrifiants obtenus sous action des cytokines présentent des vésicules plus petits, inclus dans un gel tandis que les lubrifiants non inflammatoires présentent des vésicules plus grands et sans gel à l'extérieur. Ces structures ont des comportements tribologiques similaires à ceux des liquides prélevés et des liquides synthétiques constitués de vésicules avec gel glycoprotéique : (i) seulement à l'intérieur des vésicules (bonnes propriétés lubrifiantes) ou (ii) à l'intérieur et l'extérieur des vésicules (mauvaises propriétés lubrifiantes).

Dans l'ensemble, les résultats de la présente étude montrent l'importance de la structure supramoléculaire et la composition biochimique par l'obtention des bonnes performances tribologiques d'une articulation synoviale (coefficient de frottement et usure faibles). Comme la statistique effectuée sur les prélèvements humains était insuffisante il faudra l'étendre en utilisant des modèles animaux pour contrôler et plus précisément les différents changements structuraux/biochimiques/tribologiques au cours d'une pathologie.

Par ailleurs, la bibliographie relative à la biochimie des liquides synoviaux animaux révèle une différence dans les analyses lipidomiques entre différentes espèces animales, cela est dû, en grande partie, à leur métabolisme différent. Il faudra donc vérifier par la suite s'il y a des différences entre différentes espèces animales pour les concentrations de lipides ayant des rôles structuraux.

La reproduction synthétique des différentes structures de liquides synoviaux nous a montré que cette structure a une grande importance dans l'obtention des performances tribologiques, aussi, il serait par la suite intéressant d'analyser la structure et les propriétés tribologiques des différents substituts commerciaux de liquide synovial. Ces substituts sont utilisés en clinique depuis 1980 et à partir de cette date il a été de plus en plus développé le principe de " visco-supplimentation " par injection de solutions à base d'acide hyaluronique (voir annexe 16). Ces solutions ayant principalement un rôle antiinflammatoire et d'amortissement, elles sont très vite métabolisées ce qui fait qu'elles n'ont pas de temps pour agir sur la biolubrification. C'est pour cela que la nanostructuration de ces liquides par incorporation de vésicules lipidiques pourra augmenter leurs performances tribologiques.

Ce travail a également contribué à la mise au point des techniques des cultures cellulaires afin d'obtenir des fluides synoviaux reconstitués (surnageants) correspondant aux cas sains et inflammatoires. Ces reconstitutions ont donné des résultats comparables aux différents cas sains et pathologiques, ce qui ouvre la voie d'un développement de ces techniques en rajoutant d'autres facteurs pathologiques. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer l'effet de la déficience en protéoglycannes sur les propriétés tribologiques du liquide synovial. D'autre part, ces techniques de cultures cellulaires pourront être utilisées pour développer la synthèse de composants moléculaires de type protéique (type HSPG et lubricin) qui ont été identifiés responsables d'une pathologie articulaire. Pour cela un collaborateur majeur de cette thèse (l'équipe « Adénovirus-Vecteur ») pourra mettre en pratique sa grande expérience en clonage et en l'expression de protéines recombinantes dans différents systèmes cellulaires. Ainsi, des protéines humaines (h) recombinantes (r) de type lubricine ou HSPG (rhLub, rhPG) pourront être clonées et surexprimées en différentes cellules afin de faciliter leur production dans un but thérapeutique.

A long terme, l'analyse mise au point au cours de cette thèse pourra être utile pour diagnostiquer de manière précoce les pathologies articulaires afin de pouvoir apporter des solutions thérapeutiques, non prothétiques, en privilégiant des techniques d'ingénierie et/ou de thérapie génique comme celles décrites dans le paragraphe précédent.

Annexe 1 : Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)/ mode Wet STEM

La microscopie électronique à balayage (MEB / *SEM en anglais*) environnementale *(ESEM)* comporte différents modes.

Le mode ESEM standard permet l'observation d'échantillons hydratés dans une atmosphère humide sous faible pression. Dans le mode SEM traditionnel, la colonne entière est placée sous vide poussé. Dans la configuration ESEM [134], la colonne est divisée en différentes parties placées sous vide différentiel de façon à conserver l'atmosphère humide dans la chambre d'échantillon (figure 77).

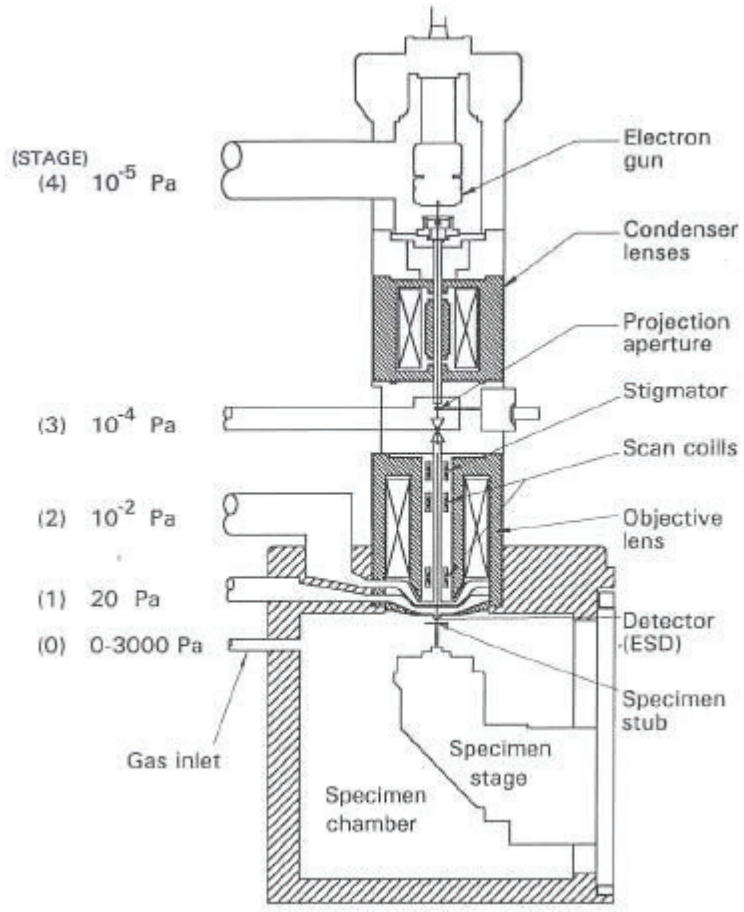


Figure 77**.** Schéma d'un microscope standard ESEM

Dans la chambre d'observation les collisions entre le faisceau d'électrons incident et les molécules de gaz produisent des ions positifs qui neutralisent les charges négatives sur la surface de l'échantillon observé de telle sorte qu'il n'est pas nécessaire de déposer un revêtement métallique isolante des échantillons. De plus ces collisions entrainent une amplification du signal d'électrons secondaires qui sont collectés par le détecteur de signal d'image.

Pour cette étude, on a utilisé le mode Wet STEM (figure 78) un mode ESEM particulier récemment développé par Bogner et al. [90,91]. Dans ce mode, les deux secteurs semi-annulaires du détecteur normalement utilisé pour les électrons rétrodiffusés sont placé sous l'extrémité d'un ancien port objet MET sur lequel est placé l'échantillon frappé par le faisceau incident. Dans ce mode, l'échantillon est observé en transmission. Nos échantillons de suspensions de liquides synoviaux ont été déposés sur la face arrière de grilles MET en cuivre recouvertes d'un film de carbone continu, les barreaux de la grille MET donnant ainsi naissance à des bassins de rétention (figure 78).

On a utilisé un microscope FEI XL30 ESEM FEG de la plateforme CLYM à Villeurbanne, qui possède une résolution nominale de 2 nm, une tension d'accélération entre 0,2 et 30 kV, un grossissement compris entre 15 et 500 000, la pression dans la chambre de l'échantillon pouvant s'élever jusqu'à 20 Torr . Le port objet est placé sur une platine Peltier qui contrôle la température entre - 20 ° C et + 20 ° C. Le contrôle de la pression et de la température dans la chambre de l'échantillon permet de réduire l'épaisseur du film de liquide observé de façon à pouvoir collecter les électrons transmis à travers le film liquide (les électrons rétrodiffusés sont également collectés) (figure 78).

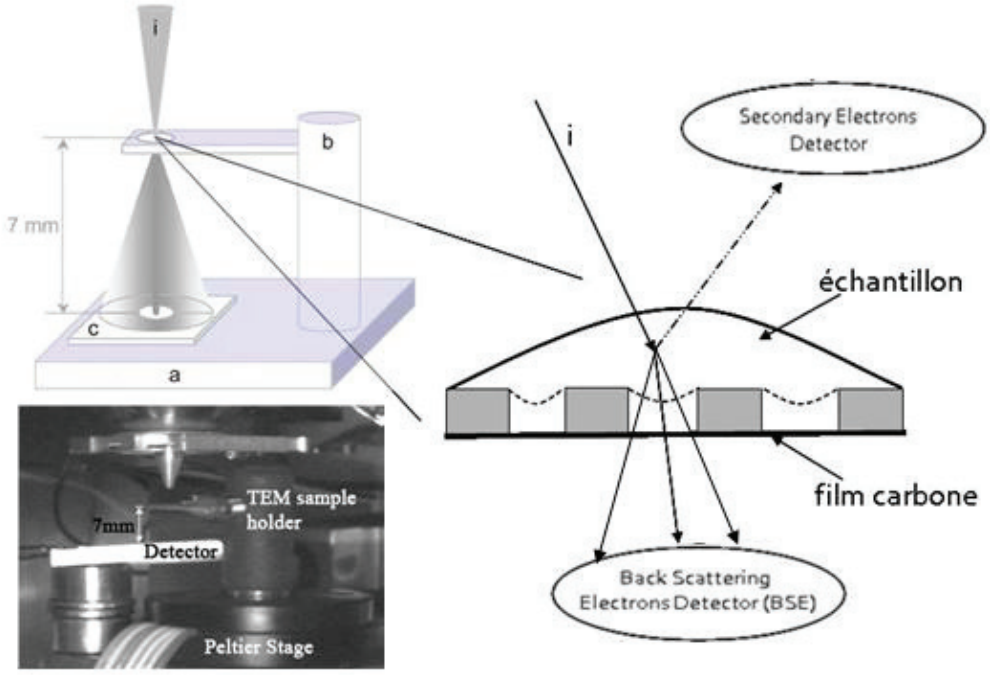


Figure 78. Schéma du dispositif d'observation en mode Wet STEM:
a) platine Peltier; i) faisceau focalisé d'électrons incidents;
b) tête de porte-objet MET; c) détecteur annulaire,
et du film de liquide déposé sur la grille MET recouverte d'un film de carbone

Procédure

Une goutte de 5 µl de liquide synovial a été déposé à l'aide d'une micropipette sur le dos de la grille MET recouverte d'un film en carbone continu.
Sur la base des études antérieures effectuées par Bogner et al [90,91], une séquence de pompage à pression inférieure à 10 Torr a été optimisée en utilisant le réglage de la température grâce à la platine Perlier pour contrôler l'évaporation dans la goutte d'échantillon de façon obtenir un film mince transparent aux électrons [135].
Un film mince d'échantillons humides est alors obtenu in situ, son épaisseur étant contrôlé par l'évaporation de la goutte initiale. Puis une épaisseur de couche désirée peut être maintenue constante sur la base du diagramme d'équilibre (p, T) entre phases de l'eau (figure 79) : par exemple, une pression de 5,3 torrs est nécessaire à une température de l'échantillon de 2 ° C pour maintenir dans une couche liquide d'échantillon.

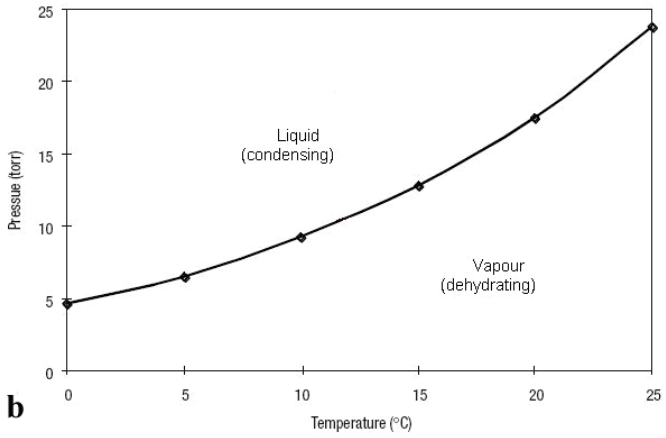


Figure 79. Diagramme de phase d'eau [90]

Avantages

Ce mode permet l'observation d'échantillons liquide sans étape de préparation, le film liquide est observé directement en transmission.

Inconvénients

Au départ le film liquide de l'échantillon peut être trop épaisse pour être observé en transmission, on est amené alors à déshydrater le film par évaporation comme expliqués précédemment pour augmenter la résolution. Mais la déshydratation obtenue par procédure du pompage peut affecter la structure observée.

Annexe 2 : Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission (MET) est utilisée pour visualiser la matière dans son volume, simultanément dans l'espace réel et dans l'espace réciproque de l'espace réel. (espace de Fourier).

Son principe [136] peut être compris à partir de celui d'un microscope photonique classique : un faisceau d'électrons est condensé sur une partie d'échantillon (taille de l'ordre de quelques nanomètres au dixième de millimètre). Une lentille magnétique (objectif) permet de former une image de l'objet avec les électrons qui interagissent avec la matière traversée. L'échantillon doit est très mince : de 10 à quelques centaines de nm d'épaisseur. A la sortir de la lentille objectif les électrons sont repris par un jeu de lentilles pour former une image agrandie de l'objet.

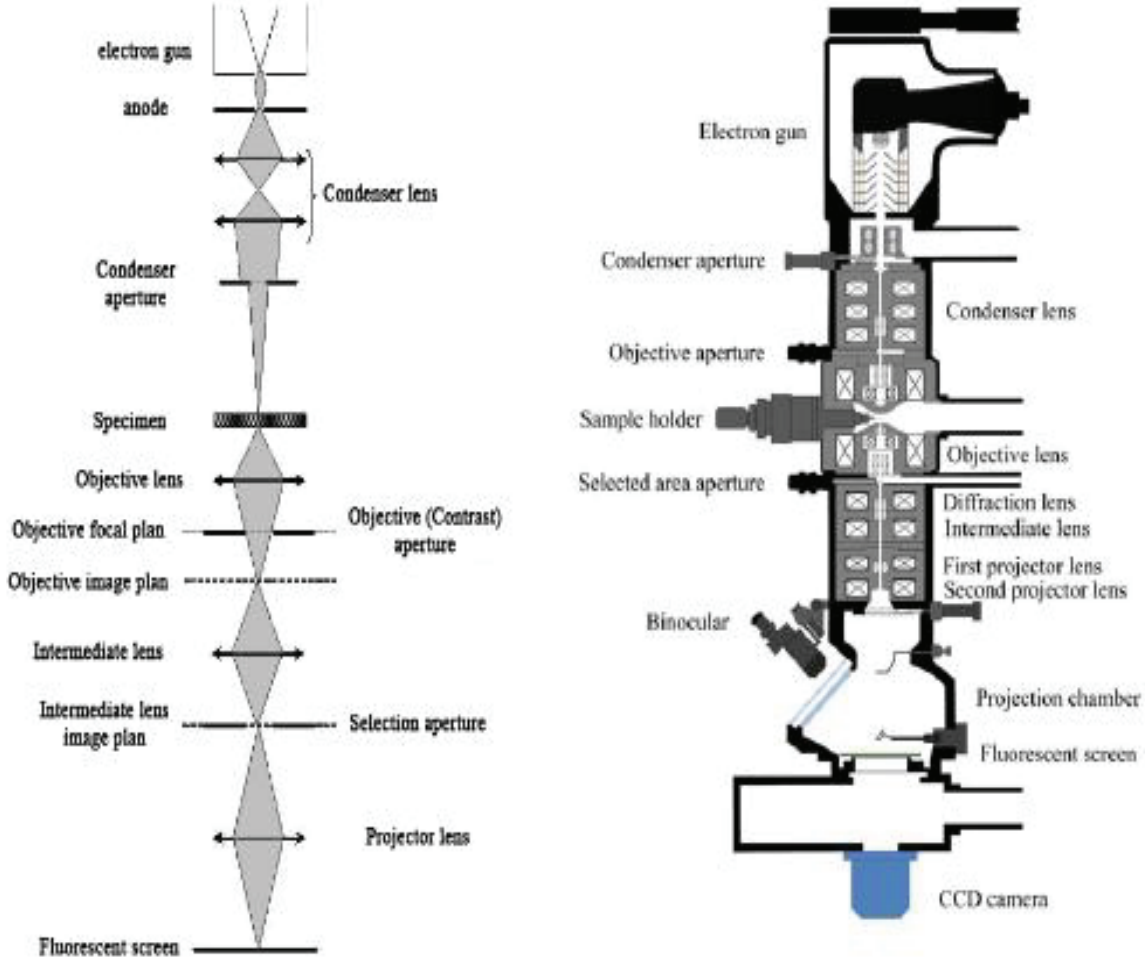


Figure 80. Schéma optique d'un microscope électronique à transmission (à gauche) et coupe transversale du microscope TOPCON 02B (à droite).

Dans le canon le faisceau d'électrons est produit par un filament chauffé (figure 80) à très haute température ou extrait d'un filament par effet de champ puis accéléré par une forte tension (de l'ordre de 50.000 à 3.000.000 V). Les électrons du faisceau peuvent être traités soit comme des particules, soit comme des ondes. Dans cette dernière approximation la physique de la formation de l'image est alors analogue à celle de l'optique photonique, et en première approximation, la formation de l'image peut être traitée par l'optique géométrique.

L'amélioration des performances par rapport à un microscope optique tient à la très faible longueur de l'onde associée à l'électron accéléré : elle est de l'ordre de 1 picomètre (10^{-12} m) contre 500 à 800 nanomètres (environ 10^{-6} m) pour les photons de la lumière visible.

Pour nos échantillons on a utilisé au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures le microscope TOPCON 02B, dont les caractéristiques sont les suivantes : résolution point par point de 0.18 nm, la tension d'accélération entre 20 et 200 kV et un grandissement entre 1400 et 800000.

Annexe 3 : Technique de coloration négative pour l'observation MET

La coloration négative [137] consiste à renforcer dans un échantillon le contraste de particules ou vésicules présentant une transparence aux électrons très voisins de celle de la matrice.
Elle consiste à entourer dans l'échantillon ces particules et vésicules d'un composé chimique dense aux électrons, ce qui permet d'observer ces structures en clair sur fond noir.

Procédure

L'échantillon doit être préalablement dispersé dans un solvant (synovie diluée) : solution tampon phosphate (PB) pH=7. La solution doit être suffisamment concentrée pour que suffisamment de matière puisse être visualisée sur un même carreau de grille.

Le contrastant utilisé est l'acide phosphotungstique (APT) qui est un sel du métal lourd tungstène (W), en concentration de 2 % dans l'eau, le tout ajusté à pH=7 correspondant au milieu de dilution de l'échantillon. Le pH 7 a été ajouté avec NaOH ou $Ca(OH)_2$.
On utilise une grille support en cuivre à mailles serrées (200 à 300 meshs) impérativement recouverte d'un film support continu en carbone. Une goutte de l'échantillon dilué a été déposée sur cette grille pendant 5 minutes puis l'excès de solvant est pompé à l'aide d'un papier filtre. On a ensuite déposé immédiatement sur la préparation une goutte de contrastant. Après 30 secondes de contact, l'excédent de liquide est retiré avec un papier filtre. Après une dizaine de minutes de séchage à l'air l'échantillon est prêt pour l'observation (figure 81).

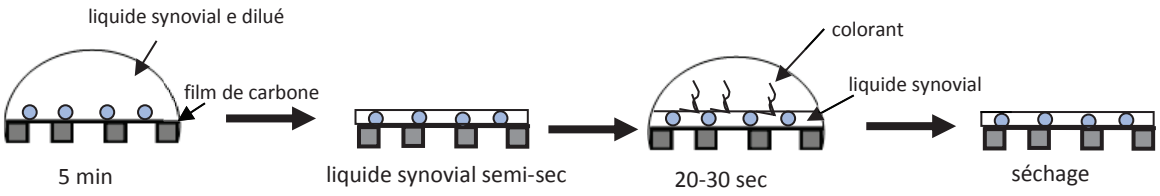


Figure 81. Procédure de préparation par coloration négative (schéma)

Avantages

Cette technique est rapide à mettre en œuvre, elle ne nécessite aucun appareillage particulier. Elle se révèle efficace pour la mise en évidence des membranes lipidiques.

Inconvénients

Chimiquement la préparation n'est pas toujours stable dans le temps, il est recommandé de procéder à l'observation sans délai. Le résultat des observations dépend notablement des différentes dilutions effectuées, ce qui affecte la statique concernant la caractéristique de structures observées. La mise en œuvre peut être perturbée par la présence de sels conduisant à un mauvais étalement du contrastant et/ou à la création de textures parasites.

Annexe 4 : Microscopie Electronique à Balayage à basse température (Cryo MEB)

Ce mode d'échantillons congelés et maintenus congelés pendant l'observation est particulièrement adaptée aux échantillons hydratés comme le liquide synovial. Il permet de s'affranchir des techniques classiques de préparation (fixation, déshydratation) qui utilisent des solvants et induisent des extractions et des modifications ou des déplacements de nombreux constituants cellulaires. Il permet l'observation d'échantillons immobilisés dans leur état natif.

Préparation des échantillons : congélation haute pression

La congélation haute pression (environ 2000 bars avec une vitesse de congélation d'environ 12000°C/s) empêche la formation de cristaux de glace qui détruisent les structures cellulaires. Une goutte de synovie est déposée dans une coupelle et introduite rapidement dans l'appareil de congélation haute pression (EM PACT Leica). Après congélation la coupelle est stockée dans l'azote liquide.

Observation MEB en mode cryo

Les observations sont réalisées sur un microscope FEG Quanta 250 (FEI) équipé d'un cryo transfert Alto 2500 (Gatan). La cupule contenant l'échantillon est introduite, sous vide, dans la chambre de transfert dont la température est maintenue à – 150°C, à l'aide d'une canne spécifique. A l'aide d'une petite lame pointue, on réalise une fracture dans l'échantillon. Il est introduit dans la chambre du microscope, régulée également à -150°C, et observé à 5 KV (pour éviter les phénomènes de charges). L'échantillon est alors sublimé pendant 2 minutes environ à – 90°C pour faire ressortir les structures de surface puis refroidi de nouveau à – 150°C. Il est ramené dans la chambre de transfert où il est métallisé au Platine et réintroduit dans la chambre d'observation du microscope. Les observations sont réalisées à 15 KV
Quand on observe les échantillons, il faut maintenir la température inférieure à -130 ° C (la température de recristallisation) sous vide pour éviter la contamination et pour empêcher la sublimation (inférieur à -130 ° C, le taux de sublimation de la glace est très faible, de l'ordre de 0.001nm/sec).

Avantages

La fixation chimique est évitée par la congélation haute-pression, donc l'échantillon est observé aussi proche que possible de son état naturel. Pas de déshydratation donc les structures « délicates » de l'échantillon sont maintenues intactes. On n'utilise pas des solvants, qui peuvent également abimer des composants de l'échantillon

Inconvénients

Cette technique nécessite un appareillage onéreux.

Annexe 5 : La cryofracture

La cryofracture [137] permet de réaliser, après fracture, une réplique des surfaces de fracture d'un échantillon congelé.

Elle comporte plusieurs étapes successives : congélation de l'échantillon, fracture à froid, métallisation et destruction de l'échantillon sous la réplique. La congélation permet de réaliser des fractures d'échantillons hydratés ou mous où trop ductiles à température ambiante.

Procédure

Une microgouttelette d'échantillon est déposée dans une coupelle en cuivre semie creuse sur laquelle on retourne une autre coupelle de manière à réaliser un sandwich.. L'ensemble des deux coupelles enfermant l'échantillon est alors congelé rapidement dans de l'azote pâteux (-210 °C), puis transféré dans de l'azote liquide ou il peut rester avant d'être fracturé.

Chaque «sandwich» est introduit dans un porte-objet, préalablement refroidi dans l'azote liquide, puis transféré dans un cryofract Reichert Jung . À l'intérieur du cryofract, le porte-objet est maintenu à -150 °C, sous un vide de 10-8 à 10-9 Torr. La fracture s'effectue par ouverture du porte-objet qui permet de séparer les deux coupelles (figure 82). Un système de canons électroniques permet d'obtenir des répliques de chaque fracture, en réalisant un ombrage de platine, sous un angle de 45 °, suivi par évaporation de carbone sous un angle de 90° (épaisseur moyenne de 100 Å). Ces deux évaporations garantissent l'obtention de très fins grains de platine et de carbone compatibles avec l'observation en MET. Avant de sortir les échantillons de l'appareil, une goutte de collodion à 1%, dans l'acétate d'isoamyle, est déposée sur chaque coupelle. Elle permet, après évaporation du solvant, d'augmenter la résistance de la réplique et de faciliter son transport dans les différents bains de nettoyage.
Après retour à température ambiante, la réplique est récupérée par dissolution partielle de la cupule dans un mélange d'acides.

Les répliques subissent alors différents bains dans de la javel concentrée (1 heure), dans de l'acide fluorhydrique (5 minutes) et dans des bains de concentration croissante d'éthanol (maximum 50%).
Les répliques sont alors récupérées sur grille support de microscope de 600 mesh

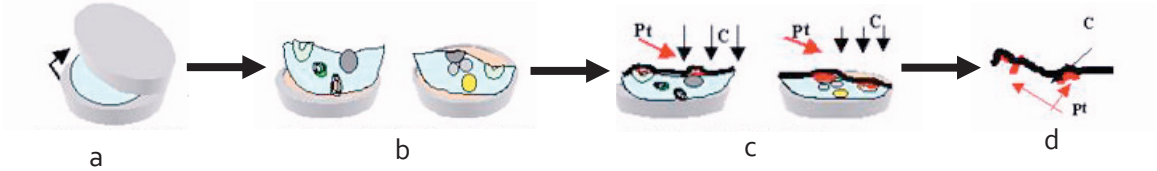


Figure 82**.** a) L'ouverture de la coupelle provoque la fracture de l'échantillon ;
b) Echantillon fracturé : les 2 coupelles sont côte à côte ;
c) Ombrage au Pt avec un angle de 45° et empreinte au C sous un angle de 90° ;
d) Réplique après décollement du support et dissolution de l'échantillon

Avantages

Permet d'observer des échantillons dans leur état hydraté sans déformation, ni déplacement dus aux processus de préparations chimiques. Elle permet, grâce à l'ombrage, d'avoir une approche 3D de la morphologie.

Cette technique permet d'observer les membranes cellulaires. La fracture se fait de façon aléatoire dans l'échantillon, préférentiellement au niveau des membranes et entre les bicouches lipidiques.

Inconvénients

La réplique ne contient plus l'échantillon, mais seulement un moulage de sa surface dans la zone de fracture ce qui exclu la possibilité de faire de l'analyse. La bonne réalisation de cette technique nécessite de connaître un agent chimique capable de dissoudre l'échantillon sans altérer la réplique.

Cette technique nécessite un appareillage onéreux.

Annexe 6 : La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie de force atomique (AFM) a été utilisée pour imager les assemblages supramoléculaires du liquide synovial et pour caractériser leur comportement mécanique (module d'élasticité).

Principe de l'AFM

L'élément central de l'AFM est la sonde, qui est un micro-levier sur lequel est montée une pointe (figure 83). Cette pointe interagit directement avec la surface étudiée. Par l'intermédiaire d'un tube piézo-électrique, la pointe peut être déplacée suivant les directions X et Y (dans le plan de l'échantillon) et Z (perpendiculairement à l'échantillon). Ce dispositif peut être utilisé en mode imagerie ou mesure de force.

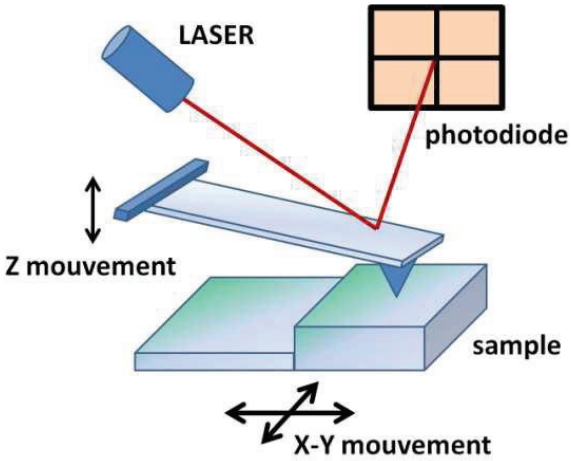


Figure 83. Principe de l'AFM

Le principe d'imagerie par AFM

Le principe d'imagerie AFM consiste à mesurer la déflexion verticale du levier par un faisceau laser qui est réfléchi vers une photodiode à quadrants. Une boucle d'asservissement maintient la déflexion dZ du levier constante en agissant sur le tube piézoélectrique (ou piézo) dont les variations de tension servent à la construction topographique des images.

Le principe de la mesure de force par AFM

Le principe de la mesure de force AFM (figure 84) consiste à mesurer la déflexion du levier de l'AFM lors de son approche (compression) et de son retrait (décompression) de la surface testée. La boucle d'asservissement qui maintient constante la position du levier est coupée et ainsi le système d'acquisition du signal est capable de tracer la variation de la déflexion dZ détectée par la photodiode en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon imposée par le piézoélectrique suivant l'axe Z. Cette variation est présentée sous la forme d'une courbe déflexion / distance, appelée courbe de force. L'allure générale d'une courbe de force pour une surface solide est présentée sur la figure 84.

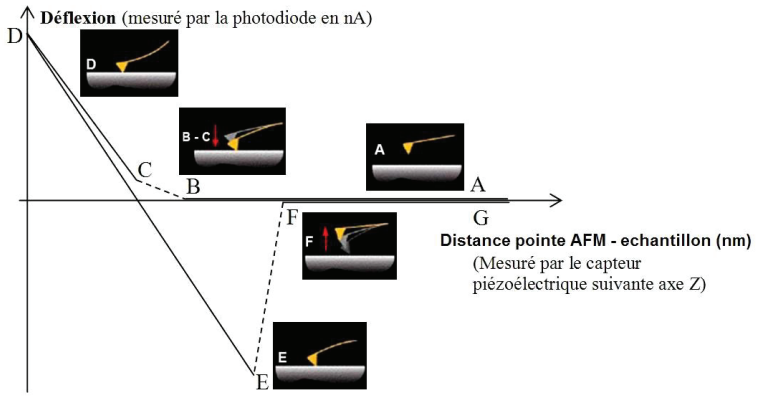


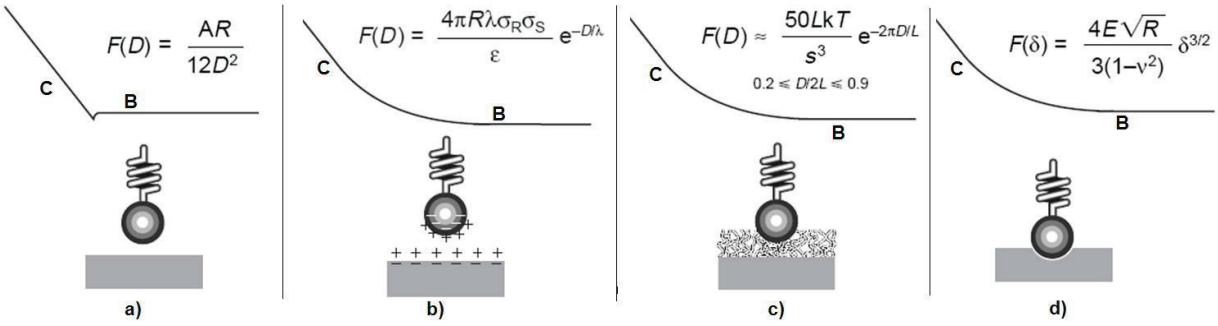
Figure 84. Représentation d'une courbe force- distance AFM

Durant « l'approche » du levier, on distingue les points suivants [8] :

- le point A représente la position du levier lorsque la pointe est suffisamment éloignée de la surface testée et aucune force n'agit pour fléchir le levier.
- le point B représente la position du levier lorsqu'il commence à fléchir à cause des forces qui agissent au voisinage de la surface testée.
- le point C correspond à la position du levier lorsque la pointe commence à pénétrer dans la surface, la pente de la courbe située entre le point C et le point D correspond à la rigidité du contact « levier – surface testée ».
- la portion B – C est représentée en pointillés car elle est spécifique pour chaque type de surface testée et son allure est donnée par la force dominante qui agit au voisinage de la surface. La figure 85 montre différentes allures pour la portion B-C de la courbe de force en fonction du type de force dominante. Ainsi :
  - Si la force dominante est de type **Van der Waals,** on observe que la portion B-C a un profil attractif qui commence à une distance située à quelques nanomètres de la surface testée (figure 85a). Ce type d'allure est plus visible dans les courbes AFM en milieu liquide où les valeurs typiques pour les forces Van der Waals sont situées entre 10^{-10} N et 10^{-9} N, selon le liquide. Notons, qu'il existe dans certains liquides une forme répulsive de la force de Van der Waals.
  - Si la force dominante est de type **électrostatique** on observe que la portion B-C a un profil répulsif qui commence à une distance située à quelques dizaines de nanomètres de la surface testée (figure 85b). Cette force est due à la présence de charges électriques qui :
    - dans le cas de mesures AFM à l'air, proviennent du piégeage des charges électriques entre la pointe et la surface. Ces forces peuvent être énormes pour les surfaces isolantes.
    - dans le cas de mesures AFM en milieu liquide, sont dues à la dissociation des groupements surfaciques sur le levier et la surface. Ces forces dépendent de la

concentration en ions dans la solution et éventuellement du pH, de la pression osmotique de la solution.

- Si la force dominante est de type **moléculaire (balai – brosse moléculaire)** on observe que la portion B-C a un profil répulsif qui commence à une distance très proche de la surface testée (1 – 2 nm, figure 85c)
- Si la surface testée n'est pas rigide, la force dominante est de type **élastique**. On observe alors que la portion B-C a un profil répulsif qui commence à une distance proportionnelle à la raideur du contact surface testée –levier AFM. Dans ce cas la portion B-C est utilisée pour déterminer les caractéristiques élastiques des surfaces testées (expériences de nano indentation, figure 85d).



A	Hamaker constant	T	Absolute temperature	Λ	Characteristic length of bond
a	Monomer length	U	Bond energy	λ	Debye length of the medium
D	Probe–sample separation distance	x	Elongation of polymer	θ	Angle related to the geometry of the tip–sample contact
E	Elastic modulus				
k	Boltzmann's constant	δ	Indentation depth	σ_R	Surface-charge density of sphere
L	Brush thickness in a good solvent	ε	Dielectric of the medium	σ_S	Surface-charge density of sample
L^*	Inverse Langevin function	γ	Surface energy between tip and sample	τ	Period over which the bond will rupture
N	Number of units in polymer				
R	Radius of probe sphere	γ_L	Surface energy of the liquid	τ_0	Reciprocal of the natural bond frequency
s	Mean distance between polymers	ν	Poisson ratio		

Figure 85. Différentes allures pour la partie B-C de la courbe de force en fonction du type de force dominante [160]

Procédure expérimentale

Afin de pouvoir imager les assemblages supramoléculaires et déterminer leurs propriétés mécaniques par AFM, un volume de ~250 µl de liquide synovial a été incubé pendant ~30min sur des plaques de verre couvertes d'une couche de polylysine (molécule connue pour permettre l'accrochage de vésicules sans éclatement) d'épaisseur nanométrique. Le volume de liquide synovial ou surnagent non accroché sur ces plaques après incubation a été enlevé par rinçage en solution tampon PBS pH 7.4 (figure 86).

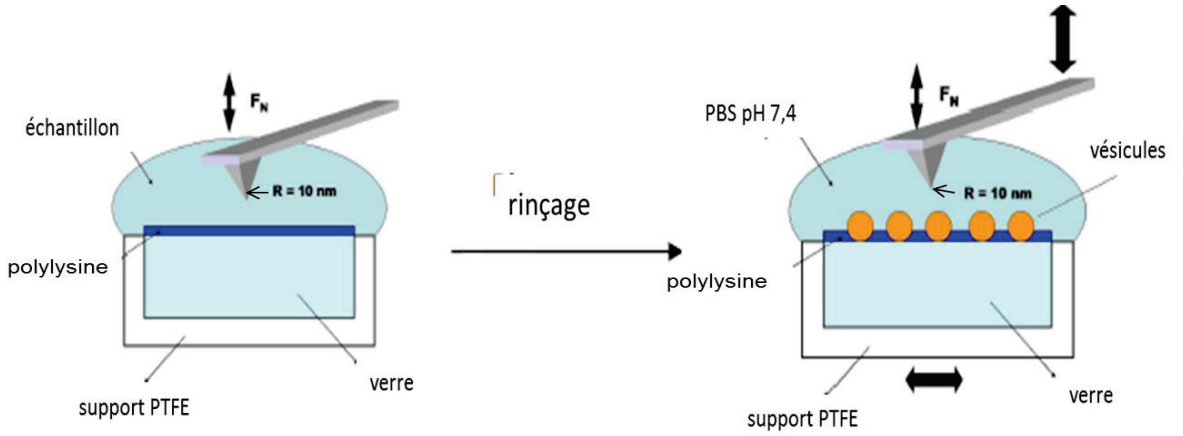


Figure 86. Configuration expérimentale pour les mesures morphologiques et mécaniques des assemblages supramoléculaires présents dans les différents types de liquides étudiés

La morphologie des structures supramoléculaires accrochées aux plaques couvertes de polylysine a été visualisée par imagerie AFM (mode tapping) et ces structures imagées ont été testées mécaniquement en utilisant l'AFM comme nano-indenteur en exerçant une force normale adaptée.

Les courbes AFM force-distance en approche puis au contact reflètent l'indentation de la pointe dans un échantillon déformable et traduisent l'élasticité de cet échantillon (figure 87).

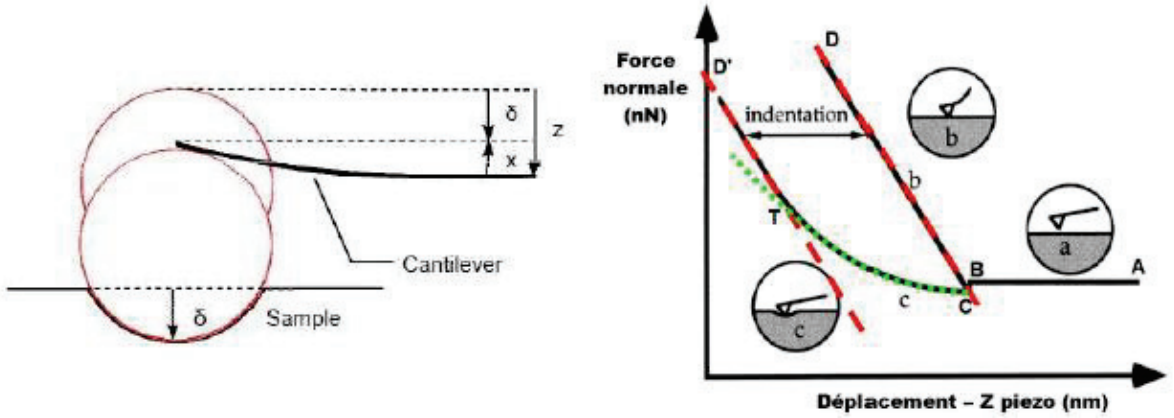


Figure 87. Schéma de l'indentation par rapport à la déflection du levier.
Allure générale d'une courbe AFM force-distance d'approche
sans (b) ou avec (c) indentation (B)

Pour un échantillon non déformable, la déflection d du levier après contact est égale en module à l'amplitude du mouvement du piézo dans la direction d'approche z : d=z. Dans le cas d'un échantillon déformable, la pointe indente l'échantillon ; cette indentation δ conduit à une plus petite déflection du levier x = z-δ (figure 76), x égale à F/K, F étant la force normale et K la raideur du levier.

Pratiquement la courbe force normale-indentation est obtenue par comparaison des courbes force-distance à l'approche puis au contact enregistré respectivement sur l'échantillon et sur une surface de référence rigide, ici le verre (figure 87 et 88). Ce dépouillement a été effectué dans notre cas en utilisant le logiciel C++ [160].

Les mesures de force ont été réalisés en utilisant des pointes AFM coniques de nitrure de silicium (NSC36 µmasch, San Jose, CA, USA), avec une raideur entre K = 0.15 - 1.5 N/m. La raideur des leviers a été déterminée par la méthode de bruit thermique en utilisant un AFM de type MFP-3D Asylum Stand Alone. Le rayon de courbure de la pointe est d'environ 10 nm avec un angle de cône de 40°.
Des centaines de cycles d'approche-retrait ont été effectuées sur les structures supramoléculaires identifiées par imagerie AFM et la déflexion du levier a été enregistrée par rapport à la position Z du piézo. La vitesse d'approche a été fixée à 500nm.s^{-1} valeur pour laquelle l'effet de la vitesse sur les propriétés mécaniques de l'échantillon peut être négligé.

A partir des courbes force-distance comme indiquées ci-dessus les courbes force normale – indentation ont été déduites, dont un exemple en est reproduit en figure 88. Il peut être montré que le modèle de Hertz s'applique à nos expériences / cas d'un indenteur conique (Radmacher et al, 1998 –

), et que la courbe force normale - indentation peut être alors lissée par une loi puissance d'exposant A.

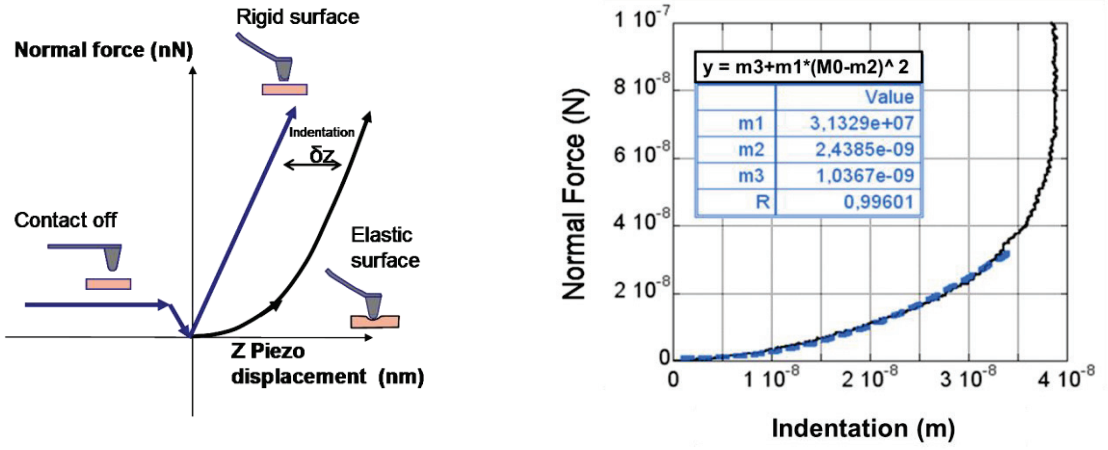


Figure 88. Exploitation des données AFM: A -représentation schématique d'une courbe AFM d'approche au contact (force normale fonction du déplacement Z du piézo) pour une surface élastique et une surface rigide (verre). B - exemple de courbe force normale – indentation calculée dans notre cas de l'indenteur conique et lissage par une loi puissance dont les résultats sont reproduits dans le Tableau en insert ; dans ce cas l'exposant puissance A est égal 2 [159]

Etant donné le modèle de Hertz (Radmacher et al., 1998) le module d'élasticité apparent E' de l'échantillon se déduit de la formule :

$$E' = \frac{\pi A}{2tan\alpha}$$

où A est le paramètre de lissage de la loi puissance et α est le demi-angle d'ouverture du cône.

Résultats

Les résultats concernant les valeurs de module d'élasticité apparent vont être à présent exposés pour le liquide synovial pathologique et les surnageants. La mesure de la *valeur exacte* du module d'élasticité nécessitant la détermination complexe du zéro de l'indentation on présentera ici une comparaison qualitative des modules d'élasticité relatifs aux différentes parties de la structure [159].

Pour les prélèvements de **liquide synovial humain** on a testé deux prélèvements : non inflammatoire et inflammatoire.

Pour le cas non inflammatoire le module d'élasticité à l'intérieur des vésicules est 1.28 ±0.06 MPa (pour 48 points de mesure) et plus faible à l'extérieur des vésicules 0.12 ±0.04 MPa (pour 62 pointes de mesure).

Pour le cas inflammatoire, on n'a pas pu mesurer le module d'élasticité à l'intérieur des vésicules car au cours de l'imagerie l'amas « gélatineux » a été balayé sur les vésicules et l'on n'a pas pu trouver de vésicules non couverts de l'amas « gélatineux ». Dans ce cas-là, le module d'élasticité mesuré est de 6.5 ±1.16 MPa (pour 10 points de mesure). En raison de la dérivation de la pointe AFM sur ces échantillons, on n'a pas eu suffisamment de courbes pour pouvoir procéder à une statistique.

Pour les **surnageants** les histogrammes des valeurs de module d'élasticité apparent sont reproduits en figure 90. On voit que pour le cas sain à l'intérieur des vésicules la valeur moyenne du module d'élasticité est plus grand : entre 3.37±0.123 (*10 jours en culture*) et 0.66±0.1230.051 (*30 jours en culture*), que pour le cas pathologique : entre 0.13±0.001 (*10 jours en culture*) et 0.39±0.0026 (*30 jours en culture*). Ceci correspond à la structure vésiculaire observée egalement dans le cas sain tandis que le surnageant inflammatoire est testé comme un amas gélatineux.

10 jours en culture

30 jours en culture

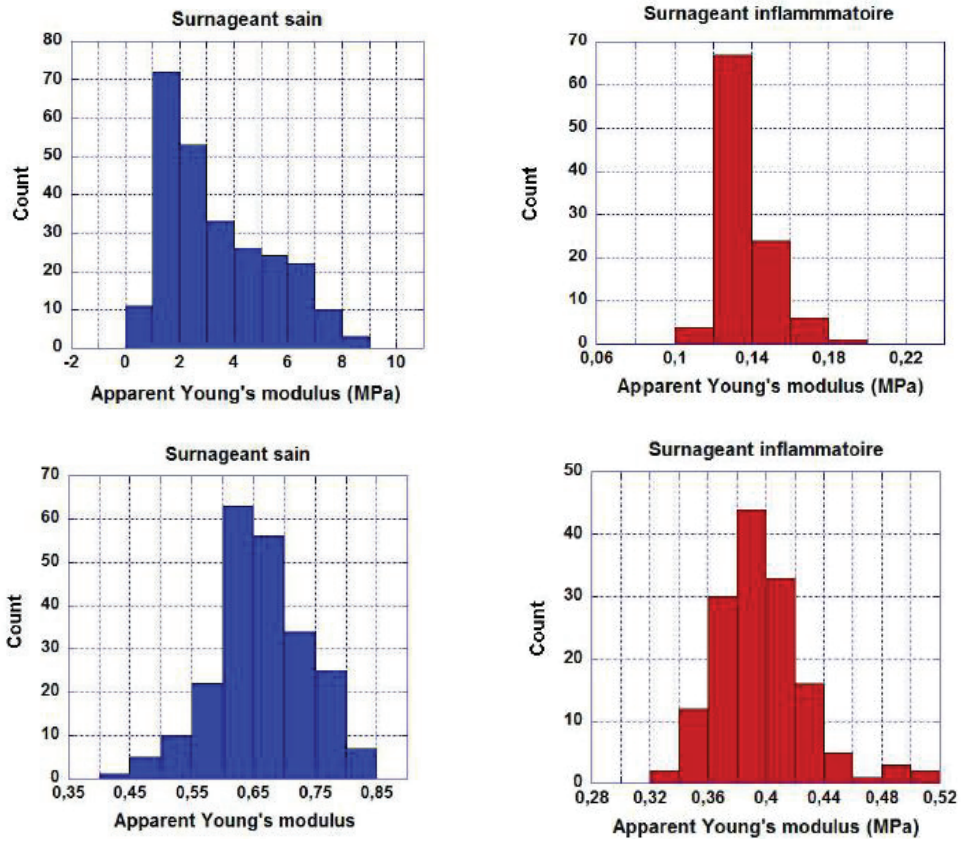


Figure 90. Histogrammes des valeurs de module d'élasticité apparent pour les surnageants

Annexe 7. Obtention de liquides synoviaux synthétiques

Parce que la composition du liquide synovial est très complexe (chapitre IV) et chaque composant peut jouer un rôle biologique particulier, il est très difficile de reproduire la composition exacte de ce liquide. Pour cette raison, dans cette étude, on s'est focalisé sur la reproduction de la structure supramoléculaire du liquide synovial en utilisant les composants principaux qui peut agir sur l'influence tribologique:

- acide hyaluronique (AH - H7630, Sigma- Aldrich) connu pour son rôle en viscosité ;

- albumine (BSA - A3059, Sigma-Aldrich) connue pour sa capacité de réticuler avec l'acide hyaluronique en formant le gel glycoprotéique ;

- lipides qui forment les multicouches lipidiques qui couvrent les interfaces tribologiques. Il y a plusieurs types de lipides dans le liquide synovial, mais dans cette étude on s'est concentré sur les phospholipides parce qu'elles jouent le rôle le plus important dans la tribologie. On choisit le phospholipide plus souvent dans les articulations synoviales, le POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Avanti Polar Lipids).

On a utilisé des marqueurs fluorescents (concentration molaire 1%) pour voir la structure supramoléculaire en microscopie confocale, donc Bodipy (bore-dipyrométhene) (excitation/ émission 558/568) pour marquer les lipides et BSA fluorescéine (excitation/ émission 490/520) pour marquer le gel glycoprotéique.

Matériel utilisé :

- 3mg/ml et 0.3 mg/ml POPC avec 1 % Bodipy
- 3 mg/ml AH
- 20 mg/ml BSA avec 1% BSA fluorescéine
- PB (tampon phosphate) pH =7.4 avec 0.05% sodium azide (antibactérien)
- 0.2 mg/ml $CaCl_2$
- 60/1 (m/m) Dicetylphosphate en chloroforme (stabilisateur)
- 0.002 % BHT (antioxydant) – solution 0.001 mg/ml BHT
- l'eau ultra pure

On a préparé 4 solutions de liquide synovial synthétique:

- Gel-in 1 - avec le gel glycoprotéique incorporé dans des vésicules multilamellaires (MLV) lipidiques et une concentration des lipides de 3 mg/ml
- Gel-in 2 - avec le gel glycoprotéique incorporé dans des vésicules multilamellaires (MLV) et vésicules unilamellaires (LUV) lipidiques et une concentration des lipides de 0.3 mg/ml
- Gel-out 1 - avec le gel glycoprotéique non-incorporé dans des vésicules multilamellaires (MLV) et vésicules unilamellaires (LUV) lipidiques et une concentration des lipides de 0.3 mg/ml

- Gel-out 2 - avec le gel glycoprotéique non-incorporé dans des vésicules unilamellaires (LUV) lipidiques et une concentration des lipides de 3 mg/ml

Pour toutes les solutions on a utilisé un gel glycoprotéique qui contient 3 mg/ml AH et 20 mg/ml BSA.

Les poudres lipidiques ont été solubilisées dans un mélange de chloroforme/éthanol (9v/1v) avec 1% Bodipy. L'évaporation de la solution lipidique avec dicetylphosphate et BHT a été faite sous évaporateur rotatif pendant 60 min à 35°C sous pression réduite afin de réaliser un étalement uniforme des lipides sur la paroi interne d'un tube d'essai.

Le dicetylphosphate est une molécule amphiphile chargée négativement et il sera incorpore dans la membrane de vésicule lipidique. Il conférera aux vésicules une charge de surface négative qui permettra des répulsions électrostatiques entre les vésicules, il empêchera donc l'agrégation des vésicules. Le BHT empêchera l'oxydation des lipides.

Le milieu aqueux dans lequel on va dissoudre les lipides est le gel glycoprotéique. La structure des vésicules multi lamellaires va se créer spontanément quand on ajoute le gel glycoprotéique sur la couche sèche des lipides. Pour incorporer tout le gel dans les vésicules, on a mélangé la solution contenant les MLV et le gel sous évaporateur rotatif à 35°C sans mettre le système de pression réduite pendant 12, en rajoutant une solution $CaCl_2$ (gel-in).

Pour la solution de gel-in 2, pour inclure tout le gel glycoprotéique dans les vésicules, on a séparé la solution lipidique en deux : la moitié de la quantité des lipides a été utilisée pour obtenir des vésicules multilamellaires (MLV) qui vont incorporer une partie de gel glycoprotéique et l'autre moitié pour former des vésicules unilamellaires (LUV) qui vont incorporer le reste de la quantité de gel. Pour obtenir des vésicules unilamellaires, la solution contenant les vésicules multilamellaires a été soumise à 6 cycles congélation- décongélation de 5 min en azote liquide et 10 min en bain-marie à 45°C suivis par vortex 1 min après chaque cycle.

Pour obtenir le liquide synovial gel-out 1 on a obtenu des MLV et LUV comme dans le cas de gel-in 2 et ensuite la solution gel glycoprotéique + lipides a été mélange sous vortex pendant 15 min. Pour le gel-out 2 on a utilisé la totalité des lipides pour obtenir de LUV qui ont été après mélangés avec le gel glycoprotéique sous vortex pendant 15 min. Dans les deux cas de gel-out, les LUV ont été calibrés à 50 nm par extrusion.

Pour éviter les éventuelles modifications de la structure, les manipulations vont être réalisées immédiatement après la préparation de la synovie, sans aucune conservation.

Annexe 8. Obtention de liquides synoviaux à partir des cultures cellulaires

Du milieu de culture, appelé par la suite surnageant obtenu à partir de cultures cellulaires de synoviocytes humains ou 'fibroblast-like synoviocytes' (FLS), a été fourni par l'équipe Retrovirus et Pathologie Comparée, UMR-754 INRA-Université Claude Bernard Lyon.

Ces cultures de synoviocytes humains à demi-confluence ont été multipliées jusqu'à confluence (5 x 10^6 /mL) et maintenues pendant 10 ou 30 jours de culture à 37°C et 5 % CO_2.

Le milieu de culture a été recueilli après ce laps de temps et concentré 30 fois et dissous en PBS pH = 7.4 après centrifugation. On suppose que, à une telle concentration, le surnageant obtenu a une consistance et composition proche des prélèvements de liquide synovial.

Deux séries d'aliquotes (5 x 10^6 cellules) de synoviocytes humains (FLS) à 80 % de confluence ont été traitées en parallèles :

- Surnageant « sain » obtenu à partir de cultures cellulaires de synoviocytes – FLS témoins

- Surnageant « inflammatoire » obtenu à partir de cultures cellulaires de synoviocytes traitées avec des cytokines inflammatoires

Ces échantillons ont été conservés au frigo à 4°C pendant quelques jours jusqu'à la date de mise en œuvre des expériences.

Annexe 9. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une des méthodes utilisées pour l'identification des molécules organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés vibrationnelles.

L'échantillon est soumis à un rayonnement électromagnétique dans la gamme de longueur d'onde du centre infrarouge (2,5 μm < λ < 50 μm). Le champ électrique induit par l'onde électromagnétique peut interagir avec un moment dipolaire d'une entité moléculaire présente dans le matériau. Lorsque la fréquence de champ coïncide avec la fréquence de vibration d'un mode propre de la molécule, l'interaction créée engendre la vibration de certaines liaisons et l'absorption de l'énergie de l'onde excitatrice correspondante. La fréquence à laquelle est absorbé le rayonnement dépend de la nature des liaisons, de la masse des atomes concernés et de l'environnement proche du groupement considéré. Par convention, les spectres infrarouges obtenus expérimentalement ne sont pas indexés en longueur d'onde ou en fréquence mais en nombre d'onde exprimé en cm^{-1}[138].

On a utilisé un Spectromètre IR-TF Thermo Scientific Nicolet iS10 à transformée de Fourier, accompagné du logiciel d'acquisition et de traitement des données OMNIC v6.2. Sa gamme spectrale s'étend de 7400 à 350 (1,35 μm à 28,6 μm) avec une résolution de 0,125.

Une quantité de 250 μL de liquide synovial a été séchée afin d'évaporer l'eau à l'étuve pendant 12 h, puis plusieurs spectres dans la gamme 4000-700 cm^{-1} ont été acquis pour chaque échantillon.

Annexe 10. Dosage de protéines par la Méthode de Bradford

La méthode de Bradford [139] est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (mesuré à la longueur d'onde 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie (réactif de Bradford) après liaison avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés.

On utilise la protéine de référence albumine (BSA). On constitue une gamme étalon de tubes correspondant à un volume identique (1 ml) de 800µl d'eau additionnés à 200µl de colorant Bradford. Dans l'eau sont incorporées des concentrations croissantes et connues de la protéine de référence : dans le cas de la figure 2.1 par exemple, la quantité de BSA varie de 0 à 10 µg. Lorsque les tubes sont observés en transmission à la longueur d'onde de référence 595nm, l'absorbance entraine une coloration dépendant de la concentration de protéines contenue dans les tubes comme schématisé sur la figure 91.

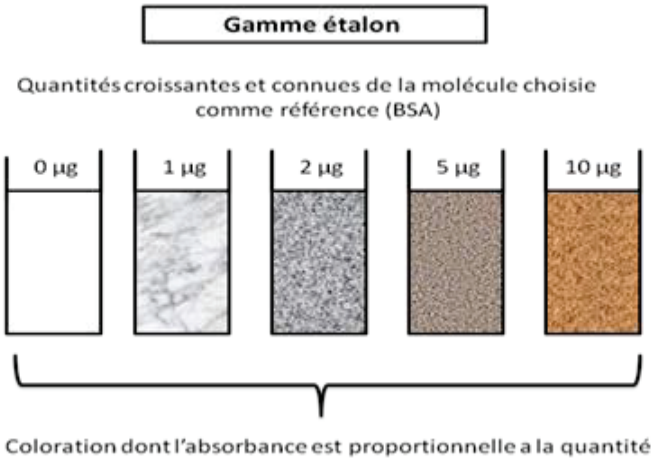


Figure 91. Schéma de la gamme étalon (5 tubes)

Une autre série des trois tubes est constituée en prélevant le même volume de liquide synovial dilué 10 fois (10 µL de liquide synovial et 90 µL d'eau pure), après centrifugation pendant 3 minutes. Dans chaque tube on ajoute 798 µL d'eau filtrée, 200 µL de réactif Bradford et 2 µL de liquide synovial.

L'absorbance mesurée à 595 nm sur la gamme étalon permet de tracer la courbe d'étalonnage présentée sur la figure 92, où les points expérimentaux s'alignent sur une droite d'équation $y=ax + b$: dans l'exemple présent $a=0.067$, $b=0$. La quantité de protéines présente dans la solution correspond au rapport absorbance / ($a= 0.067$).

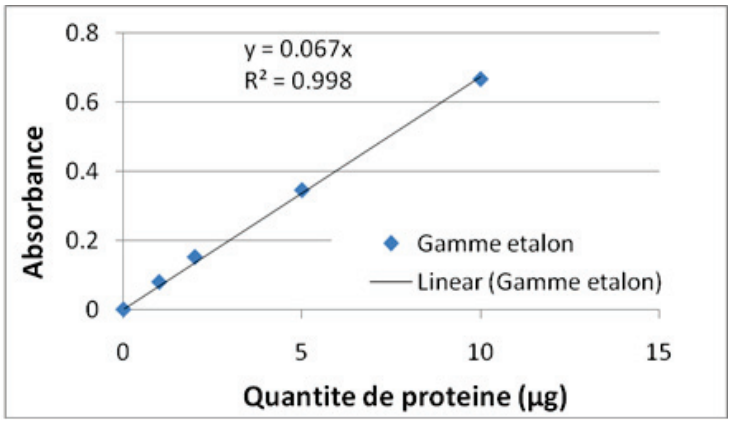


Figure 92. Courbe d'étalonnage

L'absorbance est mesurée pour le liquide synovial et on calcule la quantité des protéines en utilisant la formule déduite de la courbe étalon :

$$\text{Quantité proteines} = \frac{\text{Absorbance}}{0.067}$$

Annexe 11. Détection de la lubricine par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La concentration en protéines de chaque échantillon de liquide synovial a été déterminée par la méthode de Bradford [139], et l'équivalent de 0,5 ug de protéines par puits (dans 100 ul de PBS) a été incubé pendant une nuit dans une Plaque ELISA de 96 puits. Les puits ont été rincés trois fois avec du tampon de lavage (PBS - 0,05% Tween 20) et incubés dans un tampon de blocage (BSA à 2% dans du PBS) pendant 1 heure.

Après rinçage trois fois avec du tampon de lavage, les puits ont été incubés 2 h à température ambiante avec une solution contenant l'un ou l'autre des deux anticorps de chèvre anti-lubricine humaine, l'un dirigé contre le domaine N-terminal (Lubricin N-16; Santa Cruz, sc-50080), l'autre contre le domaine C-terminal (Lubricin C-17; Santa Cruz, sc-50078).

Les puits ont été rincés trois fois avec du tampon de lavage, puis incubés pendant 1h à température ambiante avec une solution d'anticorps anti-IgG de chèvre conjugué à la peroxydase (Sigma, A5420). Après rinçage, une solution de substrat chromogène de la peroxydase (3,3'-Diaminobenzidine) a été ajoutée à chaque puit. La plaque a ensuite été placée dans un lecteur de plaques ELISA, et la densité optique a été mesurée à 405 nm.

Annexe 12. Quantification de différentes classes de phospholipides (PLs), de la composition en acides gras et des marqueurs d'inflammation

Le principe d'analyse lipidomique est schématiquement présenté dans la figure 93.

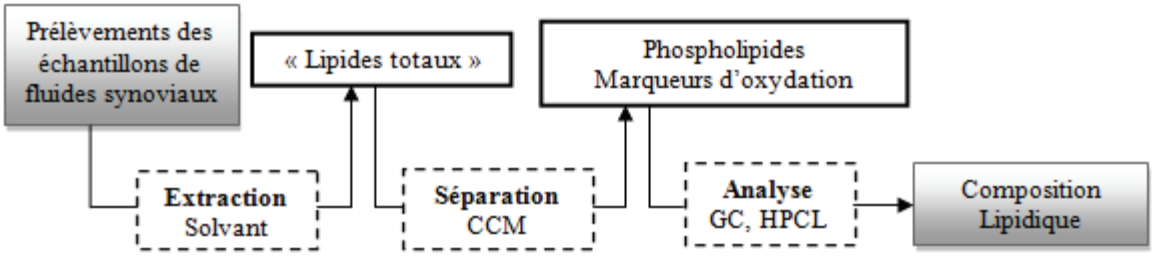


Figure 93. Protocole d'analyse lipidomique appliqué aux échantillons de fluides synoviaux
CCM – chromatographies sur couches minces, GC - chromatographie gazeuse,
HPLC - chromatographie liquide à haute performance

La quantité totale des lipides présents dans l'échantillon (les « lipides totaux ») est extraite puis séparée grâce à une technique chromatographique, le but est d'obtenir les phospholipides et les marqueurs d'oxydation caractérisant un état articulaire pathologique.

Le protocole est le suivant :

- Extraction des lipides totaux et séparation des classes de PL par chromatographie sur couche mince (CCM) : PC, PE, PS, PI, Sph ; des hydroxylés : Ag-OH et di-OH (5-HETE / 8,15-diHETE) et du cholestérol.
- Analyse par GC (chromatographie en phase gazeuse) et HPLC (Chromatographie en phase liquide à haute performance) des espèces moléculaires séparées.

1. Extraction lipidique

Les lipides sont extraits des échantillons biologiques à l'aide d'un mélange éthanol/chloroforme ($CHCl_3$/EtOH 2/1, v/v) et sont ensuite séparés des résidus non solubilisés par centrifugation.

Dans le tube contenant l'échantillon (1 mL liquide synovial, 3 mL éthanol et 1% BHT 5×10^{-5} M), nous ajoutons les standards internes puis 6 mL de chloroforme:

-500 µL PC (1mg/mL)

-50 µL PE (1mg/mL)

-20 µL PS (2 mg/mL)

-20 µL Sph (2mg/mL)

-3 µL 13-OH 18 :3n-3 (8,1 nmol)

-140 µL (20 nmol) 8,15 - di HETE (0.15 nmol)

-42 µL (5 nmol) Stigmasterol (50 µg/ µL)

Après fermeture sous azote des tubes, vortexer 1 min et centrifugation (5 min, 25°C, 200 Rpm×10). Le mélange se sépare en deux phases (phase solide et phase liquide).

Nous transférons alors la phase inferieure contenant les lipides dans un autre tube (lavage du tube avec acétone et séchage avec l'azote) que nous faisons ensuite évaporer sous jet d'azote.

Sur les phases restantes, nous ajoutons à nouveau 3 mL d'éthanol et 6 mL de chloroforme et nous mettons de nouveau dans la centrifugeuse. Les phases organiques obtenues sont réunies puis évaporées à sec et conservées à - 20°C.

2. Séparation par CCM

Par la suite, des chromatographies sur couches minces (CCM) successives sont réalisées. La première permet de séparer différentes classes de lipides dont la composition sera analysée en détail (les phospholipides, les acides gras mono- et di-hydroxyles et le cholestérol par rapport aux étalons sur la plaque de migration). Une deuxième CCM permet de séparer et de caractériser les lipides d'une même classe (ici, les phospholipides).

2.1.Séparation par CCM (PL totaux, AgOH et diOH, cholestérol)

Dans le tube contenant les extraits lipidiques (évaporés à sec sous azote), nous ajoutons 100 µL du mélange chloroforme/éthanol (2 :1, v/v) et on vortexe.

On va mettre 20 µL d'échantillon dans un autre tube pour l'analyse des acides gras totaux. On évapore à sec et on ajoute 500µL de toluène/MeOH (50:50) et on met en attente au frigo pour la transestérification pour la GC.

On dépose simultanément l'échantillon et les standards de migration (10 µL diOH, 20 µL 5-HETE, 20µL cholestérol, et stigmastérol) sur une plaque de silice de chromatographie sur couche mince (CCM). Pour une meilleure récupération, on rince le tube contenant l'échantillon avec 100 µL $CHCl_3$/Ethanol (2:1, v/v). Nous vortexons et nous déposons sur la plaque. La plaque de silice est mise dans une cuve où se trouve le solvant de migration qui contient 25 mL n-hexane, 75 mL diéthyl éther et 1 mL d'acide acétique glacial.

Après la séparation et le séchage de la plaque, la révélation des standards de migration se fait par vaporisation de dichlorofluorescéine 0.02% (100 mg dans 500 mL EtOH/H_2O 95/5). Pour visualiser les différentes tâches, la plaque est placée sous une lampe UV à 254 nm. La plaque apparaît en vert fluorescent et les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de

taches sombres. La zone de silice, correspondant au dépôt, est située à la même hauteur que le standard de migration plus 1 cm au-dessus et au-dessous (figure 94).

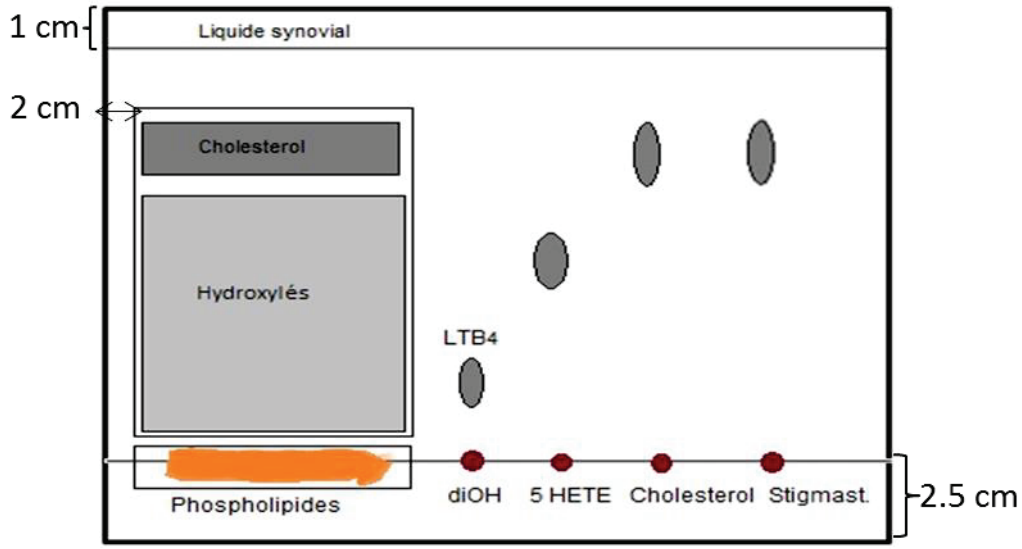


Figure 94. Schéma de séparation par CCM des phospholipides totaux (PLT) et des acides gras mono- et di-hydroxylés contenus dans le liquide synovial

Les bandes de silice correspondant au cholestérol, aux PLT et aux AgOH et diOH sont grattées et récupérées dans des tubes en verre.

Extraction des molécules dans la silice:

- 2 mL mélange $CHCl_3$/EtOH (2 :1, v/v) et 1 mL MeOH pour le PL
- 5 mL MeOH pour AgOH et diOH
- 2 mL mélange $CHCl_3$/EtOH (2 :1, v/v) et 1 mL MeOH pour le cholestérol
-

Les tubes sont fermés sous azote, nous les plaçons dans le vortexe et la centrifugeuse (5 min, 25°C, 200 Rpm×10). La phase supérieure est récupérée pour préparer la séparation des PL totaux par CCM et de l'autre côté, pour préparer les échantillons pour HPLC (l'identification de LTB_4 et 5-HETE). Nous répétons l'extraction de la silice et la centrifugation 2 fois supplémentaires (comme décrit précédemment), les phases obtenues sont rassemblées et évaporées à sec sous azote.

2.2.Séparation des PLs totaux par CCM

L'extrait des PL totaux (évaporés sous azote) est repris par 100 µL $CHCl_3$/EtOH (2 :1, v/v). Nous déposons sur plaque CCM (Poutisil LK5 Silica Gel 150 Å Size 200 × 200 × 0.25 mm) 80µL de l'échantillon. Les 20 µL restants seront utilisés pour l'analyse des PL totaux.

Pour l'analyse des PL totaux, les 20µL sont évaporés à sec sous azote et nous y ajoutons 500 µL toluène/MeOH (50 :50, v:v) (transestérification → GC).

Les standards de migration sont déposés simultanément en utilisant les capillaires : PE, PC, PS, PI, Sph. Pour la séparation des PL par CCM, nous avons utilisé le système de solvants $CHCl_3$/MeOH/Methylamine (40% dans l'eau) (60/20/5, v/v/v). Après la migration, nous avons laissé la plaque 5 min à sécher + séchage sous azote. La révélation des standards de migration se fait par vaporisation de dichlorofluorescéine 0.02% (100 mg dans 500 mL EtOH/H_2O). La visualisation des différentes tâches se fait sous une lampe UV à 254 nm. La zone de silice correspondant au dépôt est située à la même hauteur que le standard de migration plus 1 cm au-dessus et au-dessous (figure 95). Les bandes de silice correspondant au PE, PC, PS, PI et Sph sont grattées et récupérées dans des tubes en verre.

L'extraction des molécules de la silice se fait en ajoutant 1 mL MeOH et 2 mL $CHCl_3$/EtOH dans chaque tube. Après la fermeture sous azote, vortex et centrifugation. Nous récupérons la phase liquide (supérieure) 3 fois et nous mettons les tubes pour évaporation.

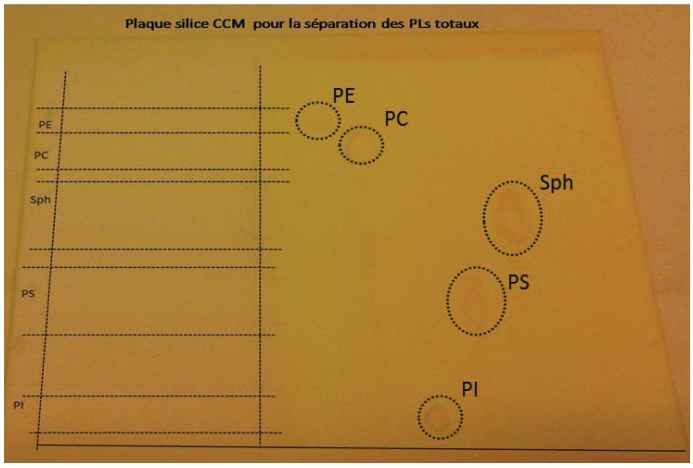


Figure 95. Séparation des classes de PLs contenues dans les échantillons de LS

Une fois les classes de lipides séparées, la chromatographie gazeuse (GC) permet de déterminer la composition des chaines acyles des phospholipides dans les échantillons. Les phospholipides sont d'abord hydrolysés en « acides gras » qui sont ensuite « méthyles ». Les esters méthyliques des acides gras sont des structures plus volatiles qui peuvent être séparées par la GC. Les chromatogrammes obtenus ont permis de déterminer le profil des phospholipides dans les échantillons (les classes de PL) ainsi que leur composition en acides gras.

3. **Transestérification et quantification des AG par GC**

Les acides gras des PLs séparés par CCM sont transméthylés en présence de 500µL du mélange toluène/MeOH (1 :1) et 500 µL du mélange BF_3/MeOH 14%. Le tube est fermé sous azote et mis dans le vortex. Il est chauffé à 100°C pendant 90min. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace et en ajoutant 1,5 mL de carbonate de potassium (K_2CO_3) à 10% afin de stopper la réaction. Les esters méthyliques des acides gras ainsi obtenus sont extraits par 2 mL d'isooctane pestipur, ensuite les tubes sont refermés sous azote.

Nous centrifugeons (5 min, 25°C, 200 Rpm×10) et ainsi, nous obtenons une séparation tri-phasique : la phase organique supérieure est récupérée dans des tubes en verre puis nous faisons une évaporation à sec du solvant sous jet d'azote. Ensuite, 3mL d'isooctane pestipur sont ajoutés dans le tube AG, nous les conservons à 4°C pour la transestérification.

Dans les tubes PI et Sph, on ajoute 500 µL de toluène/EtOH, on ferme sous azote, vortex et on les conserve à 4°C pour transestérification.

Tous les échantillons sont ensuite analysés par GC.

Dosage des marqueurs de l'inflammation

Des marqueurs de l'inflammation (LTB4 et HETE) dans les échantillons de fluides synoviaux étudiés ont ensuite été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Dans les tubes contenant le PE, PC et PS, nous ajoutons : 100 µL EtOH, 1 mL tampon borate de sodium 0.1 M + $CaCl_2$ (6 .10-3 M) pH 7.4 et 1 mL diéthyl éther. Le tube est fermé sous azote, mis dans le vortex et mis à soniquer durant 5 minutes. Ensuite, 2 µL PLA_2 (coupe les AG dans la position 2) sont ajoutés et laissés sous agitation à 37°C (bain marie) pendant une nuit. Ensuite la réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace. 5 mL de diéthyl éther sont ajoutés et le pH est corrigé dans la phase inferieure (pour arriver à pH 3) en ajoutant 3 gouttes de HCl 1 N (pour la récupération des AGs), fermeture sous azote, vortex et centrifugation (5 min, 25°C, 200 Rpm×10). La phase organique supérieure est récupérée dans des tubes en verre puis une évaporation à sec du solvant est faite sous jet d'azote. L'extraction est répétée 2 fois supplémentaires.

Après l'évaporation, 500 µL de toluène/MeOH et 500 µL de BF_3/MeOH sont ajoutés dans les tubes PI et Sph, nous plaçons dans le vortex et les tubes sont mis à chauffer à 100°C pendant 90 min. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace et en ajoutant 1.5 mL de carbonate de potassium (K_2CO_3) à 10%. Les esters méthyliques des acides gras ainsi obtenus sont extraits par 2 mL d'isooctane pestipur. Les tubes sont alors refermés sous azote, centrifugés (5 min, 25°C, 200 Rpm×10) et la phase organique supérieure est ensuite récupérée dans des tubes en verre. Une évaporation à sec du solvant sous jet d'azote est faite. 100 µL d'isooctane est ajouté dans chaque tube, ils sont fermés sous azote, placés dans le vortex et transferés dans des vials (pour GC).

Dosage du cholestérol

L'extrait de cholestérol total (évaporé sous azote) est repris dans un faible volume $CHCl_3$/EtOH. Après le vortex, tout le volume est transféré dans un flacon conique (lavage 3 fois avec acétone, vortex et de nouveau 3 lavages avec CH_2Cl_2).

Un faible volume de $CHCl_3$/EtOH est ajouté, une évaporation sous azote est effectué, s'en suit un ajout de 100 µL N,O-Bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) pour la dérivation.

La fermeture est faite sous azote et tout ceci est chauffé à 60°C pendant 30 min puis l'échantillon est analysé par GC-MS^2.

Annexe 13. Séparation et quantification des classes de phospholipides en fonction du type de « tête » par une CCM 2D

Cette analyse biochimique a été développée par Bodennec et al [97] selon les étapes suivantes :

1.Extraction du matériel lipidique des tissus:

Afin d'extraire les lipides totaux du liquide synovial nous avons utilisé la méthode mise au point par Folch et al [75]. Cette méthode est réalisée en présence du « Folch 2 / 1 » mélange de chloroforme / méthanol (2:1, v/v). Ce mélange permet l'extraction homogène, à température du laboratoire, de la plupart des composés lipidiques présents dans le liquide synovial.

Les échantillons sont broyés dans 40 ml de chloroforme / méthanol (2:1, v/v) avec un broyeur type Polytron équipé d'un barreau Inox (modèle PT OD 10). Le barreau est rincé entre chaque opération par 10 ml de chloroforme / méthanol (2:1, v/v), il est ajouté ensuite au broyat précédent.
Les échantillons sont ensuite mis à -20°C pendant 24 heures pour assurer une bonne extraction du matériel lipidique, les échantillons sont ensuite filtrés sur papier par 10 ml de chloroforme / méthanol (2:1, v/v).

2.Purification de l'extrait lipidique:

Les contaminants hydrosolubles non lipidiques éventuellement entraînés avec le chloroforme / méthanol (2:1, v/v) sont éliminés par 2 lavages successifs:

a. Première purification:

Elle est réalisée par addition d'une solution aqueuse de KCl à 0,25 % (m/v), à raison de 1/4 du volume total de filtrat. Après agitation, deux phases distinctes se forment :

*Une phase inférieure, chloroformique, contenant les lipides

*Une phase supérieure contenant l'eau, le méthanol et les contaminants hydrosolubles.

Cette dernière est éliminée par aspiration à la trompe à vide.

b. Deuxième purification:

Les proportions du Folch (2:1, v/v) sont d'abord restaurées par addition de méthanol absolu (1/3 du volume de Folch initial) à la phase chloroformique restante. Le second lavage est alors effectué avec de l'eau désionisée, dans les mêmes proportions que le premier. La phase supérieure étant éliminée après agitation par aspiration à la trompe à vide.

3. Détermination du poids de lipides totaux:

La phase lipidique lavée est transférée dans des ballons de 250 ml préalablement tarés et les solvants éliminés (évaporation au Rotavapor Buchi à 60°C, sous vide d'eau obtenu par trompe

laminaire). Une deuxième évaporation avec 10 ml d'éthanol absolu permet l'élimination de l'eau résiduelle.
La déshydratation est achevée à température ambiante sous vide plus poussé (produit par une cloche à vide). La quantité totale des lipides purifiés est finalement déterminée par pesée, après équilibrage thermique.

Les lipides sont ensuite suspendus dans un volume déterminé de benzène/méthanol (1 :1 v/v) afin d'assurer leur conservation au congélateur. Ce solvant permet une bonne conservation des lipides pendant de longues périodes. La manipulation est effectuée sous hotte compte tenu de la toxicité propre au Benzène.

4.Dosage du phosphore lipidique total

Cette méthode, mise au point par (Fisk et Subbarow, 1925), a été modifiée par (Brichon G, 1984). Elle comprend deux étapes comme décrit ci-dessous :

a. la libération du phosphore lié aux lipides, par minéralisation acide.
b. le dosage proprement dit du phosphore minéral.

a. Minéralisation :

Le phosphore lipidique est libéré par chauffage en présence de 0,25 ml du mélange suivant :

* Acide sulfurique: 2 vols
* Acide Perchlorique: 1 vol
* Tétroxyde de vanadium (catalyseur): 1g/L de mélange

L'opération est effectuée sous hotte, par chauffage pendant environ 20 secondes sur bec bunsen, jusqu'à apparition de fumées blanches abondantes.

La même procédure est réalisée pour la gamme étalon contenant 0; 1,5 ; 3; 6 et 9 µg de Phosphore (solution standard de phosphate monopotassique à 6µg de P/50µl)

b. Dosage du phosphore:

Il est effectué sur les échantillons minéralisés par ajout de 5 ml dans chaque tube de réactif ANSA. Ce réactif est composé de :

- Mélange ANSA : (0,63 g),
- Heptamolybdate d'ammonium : (0,2 g)
- H_2O : 100 ml.

Le mélange ANSA est obtenu en homogénéisant à l'aide d'un mortier:

- 60 g de métabisulfite de sodium.

- 2 g de sulfite de sodium.
- 1 g d'acide amino naphtol sulfonique.

Sous forme de poudre il se conserve plusieurs semaines au sec et à l'abri de la lumière. Après addition de la solution et agitation au vortex, la réaction colorée se développe après 8 min de chauffage à 100°C au bain marie. L'intensité de la coloration (bleu de molybdène) est mesurée au spectrophotomètre à 830 nm directement sur les échantillons de lipides totaux.

5.Chromatographie sur couche mince en deux dimensions

Les plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) en gel de silice G60 sans indicateur de fluorescence proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

Les différents phospholipides sont séparés par CCM 2D [97]. Pour cela, un aliquote de lipides totaux, correspondant à 15µg de phosphore lipidique est déposé sur une plaque de CCM en gel de silice dans le coin inférieur gauche de la plaque à environ 1,5cm du bord.

Une première migration est faite dans de l'éther diisopropylique jusqu'à fond de plaque afin de séparer les lipides neutres (triglycérides, stérols, esters de stérols,…) des lipides polaires (phospholipides, glycolipides,…).

Puis, la plaque est séchée et une migration est effectuée perpendiculairement au premier solvant dans un autre système de solvant (Tétrahydrofurane/Acétone/Méthanol/H_2O 50 :20 :40 :6 v/v/v/v).

Apres séchage, une troisième migration est réalisée dans du Chloroforme/Acétone/Méthanol/Acide acétique/Eau (50 :20 :10 :15 :5 v : v : v : v : v).
Après cette dernière migration, la plaque est séchée et révélée par pulvérisation de réactif de Dittmer et Lester qui permet de visualiser l'ensemble des phospholipides (Dittmer and Lester, 1964) (figure 96).

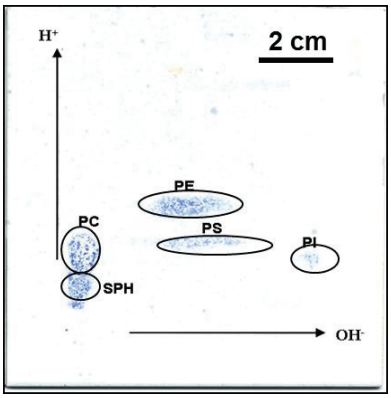


Figure 96. Séparation des classes de PL par CCM 2D

Le gel de silice correspondant pour chaque phospholipide est alors gratté et les étapes précédemment effectuées pour le dosage du phosphore lipidique sont répétées.

a. Minéralisation :

L'opération est effectuée sous hotte, par chauffage pendant environ 20 secondes sur bec bunsen, jusqu'à apparition de fumées blanches abondantes en présence de 0,25 ml du mélange suivant :

* Acide sulfurique: 2 vols
* Acide Perchlorique: 1 vol
* Tétroxyde de vanadium (catalyseur): 1g/L de mélange

b. Dosage du phosphore:

Il est effectué sur les échantillons minéralisés, par ajout de 5 ml dans chaque tube de réactif ANSA. Après addition de la solution et agitation au vortex, la réaction colorée se développe après 8 min de chauffage à 100°C au bain marie. L'intensité de la coloration (bleu de molybdène) est mesurée au spectrophotomètre à 830 nm, après élimination du gel par centrifugation à1500 rpm pendant 15 min.

6. Expression des résultats

Les teneurs en Phosphore lipidique (P.lip) sont données en µg de P.lip pour 100 mg de protéines. Elles serviront pour le calcul des quantités de phospholipides totaux (PL) en utilisant la relation:

PL totaux = Phosphore lipidique total * 25

Les profils de répartition des phospholipides correspondent aux proportions relatives des divers phosphatides d'un échantillon, en pourcentage du phosphore lipidique total déposé. Les valeurs sont obtenues en rapportant les Densités Optiques (DO) individuelles corrigées de chaque phospholipide à la somme des DO totales corrigées. Les DO corrigées (DOc) pour chaque phospholipide sont obtenues selon la formule:

DOc = DO lue – [DO blanc *(surface de la tâche/surface blanc gel)]

Annexe 14. Analyse de l'activité de phosphatase alcaline (PAL)

L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée par spectrophotométrie. Comme substrat de l'enzyme on a utilisé le para-nitrophénol-phosphate (pNPP, 18500 cm-1.M-1).

Pour une quantité de 10 et 100 µL de chaque échantillon ont été ajouté 1 mL de solution de réaction (PNPP 10 mM pH 10.4, 25 mM piperazine et 25 mM glycylglycine).

L'absorbance a été mesurée à 37°C pour une longueur d'onde de 400 nm pendant 1 minute.

Annexe 15. Calcul du nombre des bicouches qui peuvent être formées par les PLs des interfaces du liquide synovial

Etant connu pour les articulations saines [67] :

- la concentration de phospholipides (0.1 – 0.2 mg/ml),
- la surface du cartilage de genou (121 cm^2),
- la section transversale A_0 pour une molécule de DOPC : 70 $Å^2$/ molécule (0.7 nm^2/ molécule),
- le volume de liquide synovial ~2ml et la M_{DOPC} (g/mol) = 786 g/mol et le numéro d'Avogadro $N_A \sim 6.023*10^{23}$ molécules/mol,

On peut faire le calcul pour voir le nombre de bicouches pouvant être formées par les PLs grâce aux étapes suivantes :

a. la quantité des PLs dans le liquide synovial du genou
   m_{DOPC} = conc $_{DOPC}$ (mg/ml) * volume de liquide synovial (ml)
   m_{DOPC} = (0.1 jusqu'à 0.2) mg/ml * 2 ml = (0.2 jusqu'à 0.4) mg DOPC

b. le nombre de molécules de DOPC
   $\nu = m_{DOPC}$ (g) * M_{DOPC} (g/mol)
   ν = (0.2 jusqu'à 0.4)*10^{-3} g/ 786 g/mol = (25 jusqu'à 50)*10^{-8} mol
   $n_{DOPC\ molécules} = \nu * N_A$
   $n_{DOPC\ molécules}$ = (25 jusqu'à 50)*10^{-8} mol * 6.023*10^{23} molécules/mol
   = (151 jusqu'à 302)*10^{15} molécules DOPC

c. la surface occupée par les molécules de DOPC si elles formaient une seule bicouche
   $A_{DOPC\ bicouche} = A_0$ (nm^2/ molécule) * $n_{DOPC\ molécules}$ (molécules) / 2
   $A_{DOPC\ bicouche}$ = 0.7 nm^2/ molécule * (151 jusqu'à 302)*10^{15} molécules / 2
   = (53 jusqu'à 106)* 10^{15} nm^2 = (530 jusqu'à 1060) cm^2 (bicouche unique)

d. le nombre de bicouches qui peuvent être formées sur la surface du cartilage
   $n_{bicouches} = A_{DOPC\ bicouche}$ (cm^2) / $A_{cartilage}$ (cm^2)
   $n_{bicouches}$ = (530 jusqu'à 1060) cm^2 / 121 cm^2 = 4 à 9 bicouches lipidiques

Annexe 16. Visco-supplémentation

Les études des années 50 ont permis de préciser la structure macromoléculaire de l'acide hyaluronique sous forme sodique libre dans le liquide synovial, ses propriétés et ses fonctions rhéologiques dans l'écologie articulaire.

En 1966, les premières injections intra-articulaires d'AH sont faites chez des chevaux de course atteints d'arthropathies post-traumatiques et leur permettent de reprendre un entraînement normal. Rydell en 1972, Peyron et Balasz en 1974, puis Weiss en 1981 injectent une fraction d'un sel sodique d'acide hyaluronique dans des genoux arthrosiques humains avec de bons résultats sur la symptomatologie.

En ophtalmologie, en 1968-70, l'utilisation de l'acide hyaluronique, introduit sous l'endothélium cornéen comme facteur de « visco-supplémentation » en complément de la chirurgie de la cataracte fait ses premiers pas et connaît un succès rapide. Depuis une quinzaine d'années, les essais cliniques visant à apprécier l'efficacité de l'acide hyaluronique dans l'arthrose, principalement au genou, se sont multipliés.

Depuis une quinzaine d'années, les essais cliniques visent à apprécier l'efficacité de l'acide hyaluronique dans l'arthrose, principalement pour les articulations de genou. La visco-supplémentation consiste en l'injection dans une articulation arthrosique d'hyaluronane. Elle est principalement utlisée dans la gonarthrose pour pallier le déficit en acide hyaluronique constaté dans l'arthrose et afin de restaurer les qualités rhéologiques du liquide synovial. L'hyaluronane désigne à la fois à l'acide hyaluronique et ses formes de sels (hyaluronate de sodium).

Malgré une demi-vie articulaire assez courte, sa structure enchevêtrée a un rôle de filtre et de barrière imperméable qui s'oppose aux cellules (macrophages notamment) et aux médiateurs de l'inflammation. In vitro, l'hyaluronane diminue la production d'acide arachidonique et de PGE2 induite par l'interleukine-1 (IL-1). Il diminue également la dégradation de la matrice induite par des fragments de fibronectine et les effets de l'IL-1.

Actuellement en France il y a du Synvisc®, Hylane G-F 20, formé de Hyalanes à haut poids moléculaire (supérieur à 6 millions de Dalton), dérivés de l' hyaluronate de sodium extrait de la crête de coq. On trouve également de l'Ostényl ®, Hyaluronate de sodium à 1% à plus faible en poids moléculaire, obtenu par fermentation bactérienne. L'Arthrum ® et le Supartz ® ont un poids moléculaire plus faible (inférieur à 6 millions de Dalton). Enfin, le Viscornéal®, dérivé de l'utilisation ophtalmologique, est comme le Synvisc® à haut poids moléculaire, mais il le doit à l'acrylique contenu dans sa composition plus qu'à l'acide hyaluronique.

En 1995, environ 2,5% des cas ont eu des effets indésirables, ceux-ci peuvent être classés en trois catégories : les arthrites infectieuses, les arthrites micro cristallines et les arthrites inflammatoires non spécifiques. Les arthrites infectieuses sont causées par une contamination lors de l'injection articulaire et les arthrites micro cristallines, goutte et surtout chondrocalcinose sont déclenchées par l'introduction de l'acide hyaluronique dans l'articulation. Il a également été rapporté des arthrites non infectieuses et non micro

cristallines après injection d'hyaluronane qui sont de survenue précoce, dans les heures suivant l'injection.

L'efficacité des injections intra-articulaires de dérivés de l'acide hyaluronique sur les manifestations douloureuses et le handicap fonctionnel de la gonarthrose ont un taux de réponse important, de 40% à 80 % en 6 mois.

	SYNVISC	**ARTHRUM**	**SUPARTZ**	**OSTENIL**	**HYALGAN**
Molécule Excipients	HylaneGF-20 réticulé NaCl + phosphates	Hyaluronate Na NaCl + borates	Hyaluronate Na NaCl	Hyaluronate Na NaCl + phosphates	Hyaluronate Na NaCl + phosphates
Origine	Crêtes de coq	Biofermentation bactéries	Crêtes de coq	Biofermentation bactéries	Crêtes de coq
Poids moléculaire (Da)	6 000 000	4 000 000	1 200 000	?	700 000
Dosage	16mg/2ml	40mg/2ml	25 mg/2,5ml	20mg / 2 ml	20mg / 2ml
Numéro d'injections	3	3	5	3 à 5	5
Indications	Gonarthrose +/- épanchement (<30ml)	Arthroses	Gonarthrose	Affections dégénératives ou traumatisme articulaire	Gonarthrose + épanchement
Laboratoire	Boehringer	LCA	Smith-Nephew	Chemedica	Fidia

Figure 97. Différents dérivés de l'acide hyaluronique utilisés dans la thérapeutique articulaire

Malgré le remboursement partiel par l'assurance maladie d'un des dérivés d'acide hyaluronique du marché, le coût élevé du traitement reste un obstacle majeur.

Bibliographie

1. Collo MC, Johnson JL, Finch WR, Feliceta JV, Evaluating arthritic complaints. Nurse practitioner, 1991, 16:9-20
2. Dunlop DD, The costs of arthritis, Arthritis Rheum, 2003, 49:101-113
3. Lena P, Arthrose : de nouvelles alternatives à la chirurgie, Le Figaro, 2011
4. Synthèse des travaux de prospective, Santé 2025, 2010, 3:1-21
5. Firestein GS, Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis, Kelley's Textbook of Rheumatology, Saunders Elsevier, 2005, 7:65
6. Trolez Y, Guillemin JC, Synthesis and Characterization of 2,4-Pentadiynenitrile—A Key Compound in Space Science, Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44:7224-26
7. Neu CP, Komvopoulos K, Reddi AH, The interface of functional biotribology and regenerative medicine in synovial joints, Tissue engineering Part B, 2008, 14/3:235-74
8. Trunfio-Sfarghiu AM, Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physicochimique des assemblages moléculaires du fluide synovial, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Thèse 2006
9. Dowson D, Yao JQ, A full solution to the problem of film thickness prediction in natural synovial joints, Mechanical of Coanting, Proceedings of 16th Leeds-Lyon Symposium on Tribology, Lyon, 1989
10. Dowson D, Modes of lubrication in human joints, Proceeding of the Institution of Mechanical Engineers, 1967, 181:91-102
11. Dowson D, Analysis of boosted lubrication in human joints, Journal of Mechanical Science and Technology, 1970, 12:364-69
12. Pascovici MD, Cicone T, Squeeze-film of unconformal, compliant and layered contacts, Tribology Interrnational, 2003, 36:791-99
13. Dowson S, Jin Zm, Micro-elastohydrodynamic lubrication of synovial joints, Eng Med, 1986, 15/2:63-65
14. Medley JB, Dowson D, Wright V, Transient elastohydrodynamic lubrication model for the human ankle joint, Eng Med, 1984, 13/3:137-51
15. Ateshian GA, Soltz MA, Interstitial Fluid Pressurization During Confined Compression Cyclical Loading of articular cartilage, Biomedical Engineering, 2000, 28:150-9
16. Walker PS, A comparison of normal and artificial human joints, Orthopedica Belgica Supplementum, 1973, 39:43-54
17. Crocket R, Boundary lubrication in natural articular joints, Tribology Letters, 2009, 35:77-84
18. Jin ZM, Medley JB, Dowson D, Fluid film lubrication in artificial hip joints, Tribology Series, 2003, 41:249
19. Schmid T, Gastelim NS, Boundary lubrication of articular cartilage – Role of synovial fluid constituents, Arthritis and Rheumatism, 2007, 56/3:882-91
20. Bricoe WH, Titmuss S, Tiberg F, Thomas RH, Klein J, Boundary lubrication under water, Nature, 2006, 444:191-4

21. Forester H, Fisher J, The influence of loading time and lubricant on the friction of articular cartilage, Proceeding of the Institution of Mechanical Engineers, 1996, 201:109-19
22. Hills BA, Oligolamellar lubrication of joints by surface active phospholipids, The Journal of Rheumatology, 1989, 16:82-91
23. Unsworth A, Dowson D, Wright V, Friction Behaviour of human synovial joints – Part I: Natural Joints, Transactions of the ASME, 1975, 97:369-76
24. Oates KMN, Krause EW, Jones RJ, Colby RH. Rheopexy of synovial fluid and protein aggregation. Journal of the royal society interface, 2006; 3/6:167-74
25. Mavraki A, Cann PM, Mischler S, Friction and lubricant film thickness measurements on simulated synovial fluid, Proceedings of The Institution of Mechanical Engineers Part J-journal of Engineering Tribology, 2009, 223:606-7
26. Swann DA, Sotman S, Dixon M, Brooks C, The isolation and partial characterization of the major glycoprotein (LGP-I) from the articular lubricating fraction from bovine synovial fluid, Biochemical Journal 1977,161:473–85
27. Jay GD, Harris DA, Cha CJ, Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3) Gal-Gal NAcoligosaccharides, Glycoconjugate Journal, 2001, 18: 807–15
28. Swann DA, Sotman S, Dixon M, Brooks C, The isolation and partial characterization of the major glycoprotein (LGP-I) from the articular lubricating fraction from bovine synovial fluid, Biochemical Journal, 1977, 161:473–85
29. Jay GD, Harris DA, Cha CJ. Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3) Gal-Gal NAcoligosaccharides, Glycoconjugate Journal, 2001, 18:807–15
30. Watanabe M, Leng C, Toriumi H, Hamada Y, Akamatsu N, Ohno S, Ultrastructural study of upper surface layer in rat articular cartilage by “in vivo cryotechnique” combined with various treatments, Medical Electron Microscopy, 2000, 33:16-24
31. Dowson D, Priest M, Tribology at interfaces (Nano-, Bio-, Boundary/Mixed Lubrication), Tribology International, 2007, 40:1411-732
32. Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D, Mori G, Hyaluronan – Phospholipid Interactions, Journal of Structural Biology, 1997, 120:1-10
33. Crescenzi V, Taglienti A, Pasquali-Ronchetti I, Supramolecular structures in aqueous hyaluronic acid and phospholipid vesicles mixtures: an electron microscopy and rheometric study, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004, 245:133-35
34. Oates KMN, Krause EW, Jones RJ, Colby RH, Rheopexy of synovial fluid and protein aggregation, Journal of the royal society interface, 2006, 3/6:167-74
35. Hills BA, Surface active phospholipids: a Pandora’s box of clinical applications, part II, Barrie rand lubricating properties, Internal Medicine Journal, 2002, 32:242-51
36. Unsworth A, Tribology of human and artificial joints, Journal of Engineering in Medicine, 1991, 205:163-72
37. Lequesne M, Menkès CJ, Atlas de l'arthrose, Levallois-Perrey: Negma Laboratoires édition, 1995, 143
38. Aigner T, Stöve J, Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55/12:1569-93

39. Harris JR, Electron microcopy of cholesterol, Micron and Microscopica Acta, 1988, 19:19-32
40. Eyre DR, Collagens and cartilage matrix homeostasis, Clinical Orthopaedics and Related Research, 2004, 427:118-22
41. Charni-Ben Tabassi N, Garnero P, Monitoring cartilage turnover. Current rheumatology reports, 2007, 9/1:16-24
42. Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD, Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases, Arthritis & Rheumatism, 2000, 43/5:953-68
43. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB, Structure and function of aggrecan, Cell Research, 2002, 12/1:19-32
44. Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K, Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: Molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies, Current Medicinal Chemistry, 2003, 10/20:2123-45
45. Prehm P, Hyaluronan in rheumatoid arthritis: a review, International Congress Series, 2000, 1196:129- 35
46. Duclos ME, Etude du modèle d'arthrose par rupture du ligament croisé chez le lapin: suivi biologique et évaluation histologique, Université Claude Bernard Lyon 1, thèse 2010
47. Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD, Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases, Arthritis & Rheumatism, 2000, 43/5:953-68
48. Ea H-K, Bazille C, Lioté F, Histologie et physiologie de la membrane synoviale EMC, Appareil locomoteur, Elsevier Masson SAS, Paris, 2008
49. Oliviero F, Lo Nigro A, Bernardi D, Giunco S, Baldo G, Scanu A, Sfriso P, Ramonda R, Plebani M, Punzi L, A comparative study of serum and synovial fluid lipoprotein levels in patients with various arthritides, , Clinica Chimica Acta, 2012, 413/1-2:303-7
50. Lehninger AL, Principes de biochimie, Flammarion Médecine-Science, 1994, 2
51. Hills BA, Boundary lubrication in vivo, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H, 2000, 214/1:83-94
52. Fram H, Rheological properties of synovial fluids , Biorheologie, 2007, 44:59
53. Nakashima K, Sawae Y, Murakami T, Study on wear reduction mechanisms of artificial cartilage by synergistic protein boundary film formation, JSME International Journal, Series C, 2008, 18/4:555-61
54. Schvartz I, Seger D, Shaltiel S, Molecules in focus : Vitronectin, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999, 31:539-44
55. Tolosano E, Altrusda F, Hemopexin: Structure, Function and Regulation, DNA and cell biology, 2002, 21/4:297-306
56. Mirea DA, Trunfio-Sfarghiu AM, Matei CI, Munteanu B, Piednoir A, Rieu JP, Blanchin MG, Berthier Y, Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of synovial fluid, Tribology International, 2013, 59:302-11
57. Rhee DK, Marcelino J, Al-Mayouf S, Seborah K, Consequences of Disease-causing Mutations on Lubricin Protein Synthesis, Secretion and Post-translational Processing, The Journal of biological chemistry, 2005, 280/35:31325–332

58. A. Constantin, A. Cantagrel, Membrane synoviale : des conditions physiologiques à l'inflammation de la polyarthrite rhumatoïde. Implications thérapeutiques, Service de Rhumatologie, CHU de Rangueil, Toulouse
59. Viscosupplémentation, D'où vient l'acide hyaluronique ? Quels sont ses parents et ses cousins ? , Acide Hyaluronique et Arthrose, 2012
60. Prigent F, Viscosupplementation du genou, www.rivieramedicalcenter.com
61. Dujin A, Lehuédé F, Mathé T, Siounandan N, Etude de l'impact du vieillissement de la population sur l'offre et la demande de bien et de services de consommation, Etude réalisée pour le Ministère de l'Economie de l'Industrie et des Services, 2010, 1-90
62. Cours de l'appareil locomoteur, Liquide synovial normal et pathologique, www.medix.fr
63. Schechter E, Biochimie et biophysique des membranes, Masson, 1993, 2
64. Lefur A, Jean-Pierre A, Les lipides polaires: actifs et vecteurs cosmétiques, Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 2004, 11/6:436-9
65. Thonar EJM, Lenz ME, Masuda K, Manicourt DH, Body fluid markers of cartilage metabolism, Dynamics of bone and cartilage metablism, Academic Press, San Diego, 1999 :453-64
66. Vance JE, Steenbergen R., Metabolism and functions of phosphatidylserine, Progress in Lipid Research, 2005, 44/4:207-34
67. Corneci MC, Fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques : rôle des interfaces phospholipiques, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, thèse 2012
68. Hicks AM, DeLong CJ, Thomas MJ, Samuel M, Cui Z., Unique molecular signatures of glycerophospholipid species in different rat tissues analyzed by tandem mass spectrometry, Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1761/9:1022-9
69. Geng YJ, Philli JE, Mason RP, Casscells SW, Cholesterol crystallization and macrophage apoptosis: implication for athrosclerotic plaque instability and rupture, Biochemical Pharmacology, 2001, 66:1485-92
70. Postle AD, Phospholipids lipidomics in health and disease, European Journal of Lipid Science and Technology, 2009, 111:2-13
71. Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Häntzschel H, Arnold K, The phosphatidylcholine/ lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by 31P NMR and MALDI-TOF MS, Clinical Biochemistry, 2005, 38/10:925-33
72. Schiller J, Zschörnig O, Petković M, Müller M, Arnhold J, Arnold K, Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and (31)P-NMR., Journal of Lipid Research, 2001, 42/9:1501-8
73. Prete PE, Gurakar-Osborne A, The contribution of synovial fluid lipoproteins to the chronic synovitis of rheumatoid arthritis, Prostaglandins., 1997, 54/4:689-98
74. Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW, The Role of Arachidonic Acid Oxygenation Products in Pain and Inflammation, Annual Review of Immunology, 1984, 2: 335-57

75. Folch J, Lees M, Sloane Stanley H, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, The Journal of Biological Chemistry, 1957, 226:497-509
76. Matsen FA, Joints, UW Orthopaedics and sports medicine, 2011
77. Bali R, Sgukla AK, Rheological effects of synovial fluid on nutritional transport, Tribology Letters, 2000, 9/3-4:233
78. Bostan L, Trunfio-Sfarghiu AM, Verestiuc L, Popa MI, Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate)hydrogels as articular cartilage substitutes, Tribology International, 2012, 46/1:215-24
79. Covert RJ, Ott RD, Ku DN, Friction characteristics of a potential articular cartilage biomaterial, Wear, 2003, 255:1064-8
80. Freeman ME, Furey MJ, Love BJ, Friction, wear, and lubrication of hydrogels as synthetic articular cartilage, Wear, 2000, 241:129-35
81. Brandt KD, Dieppe P, Radin E, Etiopathogenesis of osteoarthritis, Medical Clinics of North America, 2009, 93/1:1-24
82. Goldring SR, Role of bone in osteoarthritis pathogenesis, Medical Clinics of North America, 2009, 93/1:25-35
83. Radin EL, Burr DB, Caterson B, Fyhrie D, Brown TD, Boyd RD, Mechanical determinants of osteoarthrosis, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1991, 21/3:12-21
84. Pascual E, Battle-Gualda E, Martinez A, Rosas J, Vela P., Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout, Annals of Internal Medicine, 1999, 131:756–9
85. Pritzker KP, Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. Annals of the Rheumatic Diseases, 1994, 53/6:406-20
86. Ameye LG, Young MF, Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the "Holy Grail". Current Opinion in Rheumatology, 2006, 18/5:537-47
87. Jouzeau JY, Gillet P, Netter P, Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs, Joint Bone Spine, 2000, 67/6:565-69
88. Bendele AM, Animal models of osteoarthritis. Journal of Musculoskelet and Neuronal Interact, 2001, 1/4:363-76
89. Bougault C, Identification de nouveaux acteurs et cibles moléculaires dans la mécanotransduction des chondrocytes, Universite Claude Bernard Lyon 1, thèse 2006
90. Bogner A., Thollet G, Basset D, Wet STEM: A new development in environmental SEM for imaging nano-objects included in a liquid phase, Ultramicroscopy, 2005, 104:290-301
91. Bogner A, Jouneau PH, Thollet G, A history of scanning electron microscopy developments: Towards ‘wet-STEM’ imaging, Micron, 2006, 38:390-402
92. Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD, Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. Arthritis & Rheumatism, 2000, 43/5:953-68
93. Fernandez J, Les chondroprotecteurs dans le traitement de l’arthrose chez le chien. Etude bibliographique, Université Paul-Sabatier de Toulouse, Thèse 2008

94. Haubeck HD, Kock R, Fischer DC, Van de Leur E, Hoffmeister K, Greiling H, Transforming growth factor beta 1, a major stimulator of hyaluronan synthesis in human synovial lining cells, Arthritis & Rheumatism, 1995, 38/5:669-77
95. Momberger TS, Levick JR, Mason RM, Hyaluronan secretion by synoviocytes is mechanosensitive, Matrix Biology, 2005, 24/8:510-9
96. Conrad BP, The effects of glucosamine and chondroitine on the viscosity of synovial fluid in patients with osteoarthritis, University of Florida, thesis 2001
97. Bodennec J, Koul O, Aguado I, Zwingelstein G, Portoukalian J, A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges, Journal of Lipid Research, 2000, 41:1524-31
98. Dumbleton, JH, Tribology of natural and artificial joints, Tribology Series, 1981, 3
99. Cummings NA, Nordby GL, Measurement of Synovial Fluid Ph in Normal and Arthritic Knees, Arthritis & Rheumatism, 1966, 9/1:47
100. Kitano T, Ohashi H, Kadoya Y, Kobayashi A, Yutani Y, Yamano Y, Measurements of Zeta Potentials of Particulate Biomaterials in Protein-Rich Hyaluronan Solution with Changes in pH and Protein Constituents, Journal of Biomedical Materials Research, 1998, 42/3:453
101. Mazzocco D, Variation in Joint Fluid Composition and Its Effect on the Tribology of Replacement Joint articulation, Massachusetts Institute of Technology, thesis 2003
102. Bertrand D, Dufour E, La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, 2006, 2
103. Eysel HH, Jackson M,. Mantsch HH, Methode for diagnosing arthritic disorders by infrared spectroscopy, United States Patent, 1994
104. Anadere I, Chmiel H, Laschner W, Viscoelasticity of "normal" and pathological synovial fluid, Biorheology, 1979, 16:179-84
105. Rabinowitz JL, Gregg JR, Nixon JE, Schumacher HR, Lipid composition of tissues of human knee joints. I. Observations in normal joints (articular cartilage, meniscus, ligaments, synovial fluid, synovium, intra-articular fat pad and bone marrow), Clinical Orthopaedics and Related Research, 1979, 143:260-5
106. Balazs EA, Watson S, Duff IF, Roseman S, Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. Arthritis & Rheumatism, 1967, 10/4:357-76
107. Decker B, McGuckin W, McKenzie B, Charles H, Slocumb C, Concentration of Hyaluronic Acid in Synovial Fluid, Clinical Chemistry, 1959, 5/5:465-46
108. Ropes MW, Rossmcisi EC, Bauer W, The origin and nature of synovial human fluid, Journal of Clinical Investigation, 1940, 19:759-99
109. McCarty DJ, Synovial fluid In Arthritis and Allied Conditions: A textbook of Rheumatology, Williams & Williams: Baltimore, 1997, 13/1: 81-102
110. Roba M, Naka M, Gautier E, Spencer ND, Crockett R, The adsorption and lubrication behavior of synovial fluid proteins and glycoproteins on the bearing-surface materials of hip replacements, Biomaterials, 2009, 30/11:2072-8
111. Mavraki A, Cann PM, Friction and lubricant film thickness measurements on simulated synovial fluids, Proceeding of the institution of mechanical engineers, Journal of Engineering Tribology, 2009, 223:325-35

112. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah1 RL, A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints, European Cells and Materials, 2007, 13:26-39
113. Kitano T, Ateshian GA, Mow VC, Constituents and pH changes in protein rich hyaluronat solution affect the biotribological properties of articular joints, Journal of Biomechanics, 2001, 34:1031-37
114. Walker PS, A comparison of normal and artificial human joints, Acta Orthopedica Belgica Supplementum, 1973, 39:43-54
115. Fram H, Coll, Rheological properties of synovial fluids , Biorrheologie, 2007, 44:59
116. Bole GG, Peltier, Dorothy F, Synovial fluid lipids in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis, Arthritis & Rheumatism, 1962 5/6:589-601
117. Oliviero F, Lo Nigro A, Bernardi D, Giunco S, Baldo G, Scanu A, Sfriso P, Ramonda R, Plebani M, Punzi L, A comparative study of serum and synovial fluid lipoprotein levels in patients with various arthritis, Clinica Chimica Acta, 2012, 413/1-2:303-7
118. Mazzucco D, Scott R, Spector M, Composition of Joint Fluid in Patients Undergoing Total Knee Replacement and Revision Arthroplasty: Correlation with Flow Properties, Biomaterials, 2004 25/18:4433
119. Prete PE, Gurakar-Osborne A, The Contribution of Synovial Fluid Lipoproteins to the Chronic Synovitis of Rheumatoid Arthritis, Prostaglandins, 1997, 54/4:689-98
120. Pascual E, Battle-Gualda E, Martinez A, Rosas J, Vela P, Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout, Annals of Internal Medicine, 1999, 131:756–9
121. Hasselbacher P, Variations in synovial fluid analysis by hospice laboratories, Arthritis & Rheumatism, 1987, 30:637–42
122. Schumacher Jr. HR, Sieck MS, Rothfuss S, Clayburne GM, Baumgarten DF, Mochan BS, Reproductibility of synovial fluid analysis. A study among four laboratoires, Arthritis & Rheumatism, 1986, 29:770–4
123. Bardin T, Bucki B, Lausaman J, Ortiz-Bravo E, Ryckewaert A, Dryll A, Coloration par le rouge alizarine des liquides articulaires, Revue du Rhumatisme et Des Maladies Ostéo-Articulaires, 1987, 54: 149–54
124. Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR, Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid, Arthritis & Rheumatism, 1983, 26:508–12
125. Gerster JC, Gautier A, Droz-Georget Y, Flach F, Ardizzoni F, Gross D, Place de l'apatite dans les maladies rhumatismales. Étude de 25 cas par microanalyse à rayons X en microscopie électronique à balayage, Schweiz Med Wochenschr, 1986, 116:390–5
126. Honig S, Gorevic P, Hoffstein S, Weissman G, Crystal deposition disease: diagnostic by electron microscopy. American Journal of Medicine, 1977, 63:161–4
127. Rousser S, Simon G, Krytchevsky G, Species variations in phospholipid class distribution of organs: I. Kidney, liver and spleen, Lipids, 1969, 4/6:599-606
128. Fuchs B, Bondzio A, Wagner U, Schiller J, Phospholipid compositions of sera and synovial fluids from dog, human and horse: a comparison by 31P-NMR and MALDI-TOF MS, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2009, 93/4:410-22

129. Crescenzia V, Taglienti A, Pasquali-Ronchetti I, Supramolecular structures prevailing in aqueous hyaluronic acid and phospholipid vesicles mixtures: an electron microscopy and rheometric study, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004, 245:133–5
130. Leckband D, Israelachvili J, Intermolecular forces in biology, Cambridge University, Quarterly Reviews of Biophysics, 2001, 34/2:105–267
131. Israelachvili J, Intermolecular and surface forces, New York: Academic Press, 1992, 456
132. Sarma AV, Phospholipids composition of articular cartilage boundary lubricant, Journal of orthopaedic research, 2001, 19:671-76
133. Trunfio-Sfarghiu AM, Berthier Y, Meurisse MH, Rieu JP, Multiscale analysis of the tribological role of the molecular assemblies of synovial fluid. Case of a healthy joint and implants, Tribology International, 2007, 40:1500-15
134. Derrick MR, Doehne EF, Parker AE, Stulik DC, Some new analytical techniques for use in conservation, Journal of the American Institute for Conservation, 1994, 33:171-184
135. Maraloiu VA, Hamoudeh M, Fessi H, Blanchin MG, Study of magnetic nanovectors by Wet-STEM, a new ESEM mode in transmission, Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 352/2:386-92
136. Williams DB, Barry Carter C, Transmission Electron Microscopy: a textbook for materials science, Springer Verlag, Berlin, 2009, 2
137. Ayache J, Sample preparation guide for Transmission Electron Microscopy, Publications MRCT, 2007, 2
138. Bertrand D, Dufour E, La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, Lavoisier, 2006, 2
139. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248–54
140. Raviv U, Klein J, Fluidity of bound hydratation layers, Science, 2002, 297:1540-43
141. Raviv U, Giasson S, Kampf N, Gohy J.F, Jerome R, Klein J, Lubrication by charged polymers, Nature, 2003, 425:163-5
142. Zappone B, Ruths M, Greene GW, Jay GD, Israelachvili J, Adsorbtion, lubrication and wear of lubricin on model surfaces: polymer brush-like behavior of a glycoprotein, Biophysical Journal, 2007, 92:1693-708
143. Greghorn JP, Jones ARC, Flanney CR, Bonassar LJ, Boundary mode friction properties of engineered cartilaginous tissues, European Cells and Materials, 2007, 14:20-9
144. Murakami T, Adaptative multimode lubrication in natural synovial joints and artificial joints, Proceeding of the Institution of Mechanical Engineers, 1998a, 212:23-35
145. Forster H, Fisher J, The influence of continuous sliding and subsequent surface wear on the friction of articular cartilage, Proceedings of the Institution if mechanical engineers, 1999, 213:329-45

146. Richter RP, Brisson AR, Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry, Biophysical Journal, 2005, 88/5:3422–33
147. Schönherr H, Johnson JM, Vesicle Adsorption and Lipid Bilayer Formation on Glass Studied by Atomic Force Microscopy, Langmuir, 2004, 20/26:11600-6
148. Bas S, Contribution de l'analyse du liquide synovial au diagnostic des affections articulaires, Service de Rhumatologie, Département de Médecine Interne, Hôpital Universitaire de Genève
149. Cooke AF, Dowson D, Wright V, The pressure – viscosity characteristics of synovial fluid, Biorheology, 1978, 15 :129–35
150. Mori S, Naito M, Moriyama S, Highly viscous sodium hyaluronate and joint lubrication, International Orthopaedics, 2002, 26:116–21
151. Bayada G, Chambat M, The transition between the Stokes equations and the Reynolds equation: a mathematical proof, Applied Mathematics & Optimization, 1986, 14/1:73–93
152. Balcerzak M, The role of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process, Acte biochimica polonica, 2003, 50/4:1019-38
153. Wang F, Influence of metal ions on phosphatidylcholine–bovine serum albumin model membrane, an FTIR study, Journal of Molecular Structure 2006, 794: 1–11
154. Sub-micron Aggregate Characterization: lgG and lgM, www.nanoimagingservices.com
155. Laurel N, Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy, Journal of Structural Biology, 2003, 143:242–57
156. Swann DA, Slayter HS, Silver FH, The Molecular Structure of Lubricating Glycoprotein-I, the Boundary Lubricant for Articular Cartilage, The Journal of Biological Chemistry, 1981, 256/11:5921-25
157. Pruzanski W, Vadas P, Stefanski E, Urowitz MB, Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme, Journal of Rheumatology, 1985, 12:211-16
158. Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A, Lipid metabolim and ostheoarthritis: lessons from atherosclerosis, Progress in lipid research, 2011, 50:133-40
159. Munteanu B, Trunfio-Sfarghiu AM, Matei CI, Hong SS, Boulanger P, Miossec P, Blanchin MG, Rieu JP, Berthier Y, Nano-mechanical and tribological analysis of healthy and pathological synovial fluids reconstituted from synoviocyte cultures, International Conference on BioTribology, Imperial College London, 18-21 September 2011
160. Dragos M, Nanophysical analysis to study evolution of vascular and articular inflammatory pathologies, Universite Claude Bernard Lyon 1, thèse 2011