



HAL
open science

**Réponses biologiques aux sollicitations tribologiques.
Rôle de médiateur des structures phospholipidiques.
Application au diagnostic et à la thérapeutique des
pathologies articulaires.**

Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu

► **To cite this version:**

Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu. Réponses biologiques aux sollicitations tribologiques. Rôle de médiateur des structures phospholipidiques. Application au diagnostic et à la thérapeutique des pathologies articulaires.. Biomécanique [physics.med-ph]. INSA Lyon, 2019. tel-03083929

HAL Id: tel-03083929

<https://hal.science/tel-03083929>

Submitted on 19 Dec 2020

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

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

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

présentée devant

l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon
et l'Université Claude Bernard LYON I

Réponses biologiques aux sollicitations tribologiques

Rôle de médiateur des structures phospholipidiques

Application au diagnostic et à la thérapeutique
des pathologies articulaires

SPECIALITE : biomécanique

par

Trunfio-Sfarghiu, Ana-Maria

Soutenue le 25 janvier 2019
devant la Commission d'examen

Berthier Yves	Directeur de Recherche CNRS
Dubief Yves	Professor University of Vermont USA
Mallein Gerin Frédéric	Directeur de Recherche CNRS
Lagarde Michel	Professeur INSA Lyon
Mischler Stefano	Professor EPFL Suisse
Rieu Jean-Paul	Professeur UCBL
Tinland Bernard	Directeur de Recherche CNRS
Verdier Claude	Directeur de Recherche CNRS
Viguié Eric	Professeur UCBL
Invités	
Bernard Normand	Professeur INSA Lyon
Salah Kardi	Directeur de Recherche IFSTTAR
Michel Hassler	Senior Director, société Wright
Michel Vincent	Président de la société MINAPATH

PREAMBULE

Pour éviter les fréquentes interrogations sur la différence entre un HDR et une thèse de doctorat je rappelle la définition de l'HDR (Habilitation à diriger des recherches) selon la loi du 26 janvier 1984 sur l'enseignement supérieur et réglementée par l'arrêté du 23 novembre 1988 :

« L'habilitation à diriger des recherches sanctionne la reconnaissance du haut niveau scientifique du candidat, du caractère original de sa démarche dans un domaine de la science, de son aptitude à maîtriser une stratégie de recherche dans un domaine scientifique ou technologique suffisamment large et de sa capacité à encadrer de jeunes chercheurs. » (<https://www.ehess.fr/fr/habilitation-diriger-recherches>). Cela explique pourquoi ce manuscrit commence par une partie plus *Curriculum Vitae*.

Pour moi, ce mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches marque un bilan, scientifique mais aussi humain, des activités de recherche que j'ai eu la chance de mener depuis ma nomination au CNRS sur un poste chargé de recherche en biomécanique, en 2009 au sein de l'unité mixte CNRS INSA Lyon UMR 5259 – Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures.

1. Résumé des travaux

L'objectif de mes recherches est de comprendre la réponse des contacts vivants aux sollicitations mécaniques afin d'utiliser cette réponse comme marqueur pour le diagnostic et la thérapeutique précoce des pathologies (comme par exemple l'arthrose). Pour cela je me base sur le développement de moyens expérimentaux permettant d'une part la reconstitution *ex-vivo* et *in-vitro* des contacts vivants et d'autre part le suivi in situ des champs de déformées et de vitesses par microscopie confocale à fluorescence. Ainsi, soutenue par plusieurs financements et par de multiples collaborations, à la fois nationales et internationales, académiques et industrielles (liste des projets encadrés dans le paragraphe qui suit), j'ai pu mettre au point : (1) un bioréacteur sous sollicitations tribologiques que j'utilise actuellement pour des études visant d'une part la régénération du cartilage articulaire et d'autre part l'identification des marqueurs rhéologiques précoces dans différentes pathologies, (2) un bio-tribomètre permettant le suivi de films lubrifiants sains, dégénératifs ou inflammatoires afin d'identifier des structures moléculaires clés dans l'optimisation des implants articulaires et des substituts du liquide synovial. En collaboration avec la société Minapath et l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides, je « milite » pour la prise en compte du rôle de la nutrition et de la pollution dans la prévention et la thérapeutique des pathologies.

2. Liste de thèses soutenues et encadrements postdoctorants

- 2011** Bostan Luciana_« Matériaux polymériques avec hydrophilie contrôlée. Applications en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire », pp. 235, 2011-ISAL-0017, INSA Lyon et Université Technique « Gh Asachi » Iasi, Roumanie, (co-encadrement 25% avec M. Y. Berthier 25%, Popa I.M 25%, Verestiuc L. 25%),
<http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/74/34/64/PDF/these.pdf>
- 2011** Mirea Dragos_« Nanophysical Analysis to study evolution of vascular and articular inflammatory pathologies », pp 113, 352-2011, Université Claude Bernard Lyon et

- Université Technique « Gh Asachi » Iasi, Roumanie, (co-encadrement 25% avec Blanchin M.-G 25%, Saban R, 25%, Ciuca S 25%)
<http://fr.slideshare.net/DragosMirea/nanophysical-analysis-to-study-evolution-of#btnNext>
- 2012** Corneci Magdalena « Fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques : Rôle des interfaces phospholipidiques », pp 265, 2012-ISAL-0083, INSA Lyon, (co-encadrement 33% avec Berthier Y, 33% Rieu J-P)
hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/76/67/79/.../these_M_Corneci_2012.pdf
- 2012** Matei Ionut « Recherche des assemblages moléculaires actifs en biolubrification en vue du diagnostic et de la thérapeutique précoce de pathologies articulaires », pp 183, 332-2012, UCB Lyon1, (codirection de thèse avec Blanchin M.-G)
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00932693/>
- 2013** Wang Na « Greffage de polymères biomimétiques sur implants articulaires en polyéthylène: contrôle du comportement tribologique », pp 206, 59-2013, UCB Lyon1, (codirection de thèse avec Rieu J-P)
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00966017>
- 2015** Thèse ministère – école doctorale MEGA Lyon (codirection de thèse avec Y. Berthier) Bogdan MUNTEANU « Sécurité tribologique et toxicité des particules d'usure aéroportées : conception de particules tribo-bio-compatibles » – 27/04/2015
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01278518/document>
- 2016** Thèse ministère – école doctorale Matériaux Lyon (co-encadrement 20% avec J-P. Rieu) Florence BLANCHON : Florence BLANCHON « Membranes lipidiques supportées sur surfaces rugueuses : structure, dynamique et perspectives tribologiques »
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01466742>
- 2018** Thèse tunisienne – école doctorale de biologie Bizerte Tunisie (co-encadrement 20% avec Thierry Granjon ICBMS Lyon 40% et Ahmed Ladousi Faculté de Science de Bizerte Tunisie 40%). Jihen ZOUAOUI « Caractérisation biomécanique et biophysique à différentes échelles des cellules du cancer de la prostate : Marqueurs biologiques pertinents pour évaluer le potentiel métastatique cellulaire.
- 2011** PostDoctorat européenne „Cristofor I. Simionescu – Biomaterials” (POSDRU/89/1.5/S/55216), - Dana SUFLET : Développement des nouveaux substituts de fluide synovial par auto assemblage des polyélectrolytes (encadrement 3 mois)
- 2012** PostDoctorat BQR INSA Lyon – Kerstin FALK 12mois (co-encadrement 20% avec Mme. C. Loison 60% et M. N. Fillot 20%): Modélisation par dynamique moléculaire du comportement tribologique des bicouches lipidiques
- 2015** PostDoctorat Bogdan Munteanu (24 mois) (co-encadrement 60% avec Michel Bouquey 20% et Yves Berthier 20%) – analyses bio-tribologiques des matériaux d'implant

3. Thèses prévues pour soutenance en 2019

- 2019** Thèse CIFRE – école doctorale MEGA Lyon (codirection 33% avec M. Y. Berthier 33% et M. M. Hassler de TORNIER 33%) : Ghassen OUEZAFI « Optimisation des surfaces frottantes des implants d'épaule en polycarbonate » – retardée de 2 ans à cause de l'embauche de l'étudiant en industrie (soutenance prévu janvier 2019)
- 2019** Thèse ministère – école doctorale MEGA Lyon (codirection 50% avec M. Y. Berthier 50%) Mirela SAVA « Comportement tribologique de l'UHMWPE dans les implants de genou : de l'expertise des explants aux études in vitro » – retardé avec 1 an à cause du congé maternité de la doctorante (soutenance prévu février 2019)
- 2019** Thèse co-tutelle INSAT Tunisie - école doctorale MEGA Lyon (codirection 50% avec M. S. HAMZA 50%) : Marwa BEN BRAHAM « Comportement à la fatigue et à l'usure des biocéramiques utilisées pour la conception des prothèses ostéo-articulaires » (soutenance prévue juin 2019)

4. Thèses en cours

- 2016-...** Thèse CIFRE – TORNIER (codirection 33% avec M. Y. Berthier 33% et M. M. Hassler de TORNIER 33%) : Amira HANNOUN « Contrôle tribologique de la synthèse du cartilage en contact avec des surfaces d’implant en PyC »
- 2017-...** Thèse en co-tutelle avec Université de Bizerte Tunisie - école doctorale MEGA Lyon (codirection 50% avec M. A. Landalousi 50%) : Nesrine Daaragi-Raies « Bio-lubrification par vésicules lipidiques biomimétiques: Application dans la détection et thérapeutique précoce des pathologies articulaires »
- 2018-...** Thèse CIFRE - MINAPATH (codirection 50% avec M. M. Vincent 50%) Valentin MASSARDIER « Nouveau protocole d’expertise bio-tribo-minéralogique de particules d’usure d’implants articulaires. Application : diagnostic médical et optimisation des implants »

5. Liste des projets encadrés et co-encadrés

- (1) Responsable du projet collaboratif de recherche entre l’industriel TORNIER / CORIN et le LaMCoS : « Rôle de l’usinage de surface et des différents nuances de UHMWPE dans l’usure in vivo et in vitro des prothèses de hanche double mobilité » (2015-2017)
- (2) Responsable du projet collaboratif de recherche entre l’industriel TORNIER / WRIGHT et LaMCoS : Comportement tribologique du contact PyC/Os et PyC/cartilage dans les protheses d’interposition (2013-2019)
- (1) Responsable du projet collaboratif de recherche entre l’industriel MINAPATH et LaMCoS : développement d’un système de collecte de particule pour analyser l’effet toxique des particules d’air ambiant (2018)
- (2) Responsable du projet FRI Région Rhône-Alpes 2018-2021 « Nouveau protocole d’expertise bio-tribo-minéralogique de particules d’usure d’implants articulaires. Application : diagnostic médical et optimisation des implants” (en partenariat avec l’industriel MINAPATH)
- (3) Responsable du projet CARNOT i@1 « AcTion des assemblages lipidiques actifs sur les mécanismes biotRibolOgiques: oPtimisation d'une nouvelle génération d'Implants Smart du MENisque », collaborations CARNOT MICA (responsable Michel Bouquey) et CARNOT LISA (responsable Michel Guichardant) (2016-2018)
- (4) Responsable du projet BQI INSAVALOR « Sécurité routière et particules bio-tribo-compatibilité », (collaboration avec IMBL et MINAPATH)
- (5) Responsable du projet Brancusi (Campus France - Roumanie) : Auto-assemblage des phospholipides en présence de microgels ioniques et des polyélectrolytes modifiés hydrophobes pour obtenir des lubrifiants biomimétiques (2017-2019) (collaboration avec ICMPP Iasi Roumanie)
- (6) Responsable du projet DebrisSim – Labex MANUTECH SISE : Fabrication et analyse de débris d’usure, applications prothèses totales de hanche. (2017-2018) (collaboration avec SAIBIOSE)
- (7) Responsable du projet CIBLE Rhône-Alpes : Nouvelle méthodologie d’analyse nano-bio-tribologique en vue du diagnostic et du traitement des pathologies articulaires inflammatoires chroniques (TriboPath), collaboration avec ILM, LBTI - Immunologie et Biothérapie et le Laboratoire de Retrovirus et Pathologie Comparée du Lyon

- (8) Responsable du projet BQR INSA Lyon : « Analyse nano-bio-tribologique des contacts frottants biologiques en vue d'optimiser les surfaces frottantes des implants », collaboration LaMCoS, IMP, IMBL - INSA Lyon,
- (9) Responsable de la partie conception bio-tribo-reacteur du projet CNRS « DEFI Mécanobiologie – Mecanobio » « Le cartilage articulaire fait bonne impression » (BIOCART 3D), responsable du projet complet Mr. Frédéric Mallein-Gerin (2016-2017)
- (10) Responsable de la partie expérimentale du projet BQR INSA Lyon : « Modélisation numérique de la lubrification par des vésicules lipidiques déformables : application à la conception de lubrifiants biomimétiques », (2016-2018), responsable du projet Guilhem MOLLON
- (11) Responsable de la partie conception bio-tribometre dans le projet ANR Bio-Lub (2012-2016), responsable du projet Jean-Paul RIEU ILM
- (12) Responsable de la partie tribologie dans le projet BQR INSA Lyon : «Elaboration d'un bio-tribocorrosimètre compact et adaptable : application à l'étude d'implants articulaires», (2017-2019), responsable du projet Christelle Der Loughian MATEIS
- (13) Responsable de la partie interactions particules/surfactant pulmonaire du projet PEPS Interdisciplinaire « Aérosol Organiques Secondaires issus du TRansport à Lyon », responsable du projet Sonia Gill

6. Distinctions scientifiques

- (1) Prix du meilleur poster à la conférence JIFT 2015 : « Analyse des conditions tribologiques favorisant la régénération d'une surface articulaire cartilagineuse in vivo dans un contact Pyrocarbone/os » Ghassene Ouenzerfi, M. Hassler, A. Nallet, P.Y. Berthier, A.-M. Trunfio-Sfarghiu
- (2) Prix du meilleur poster à la conference 2nd African Conference in Tribology (ACT 2017) Marrakesh, Morocco, from April 16th to April 19th, 2017: Multi-scale mechanical characterization of prostate cancer. J.Zouaoui, A.M. Trunfio-Sfarghiu, A. Piednoir , O. Maniti, L. Brizuela , A. Girard-Egrot , A. Landoulsi and T. Granjon
- (3) Prix du meilleur poster à la conference 4th International Conference on BioTribology, Canada 2018: Towards Understanding The Tribological Behavior Of UHMWPE In Knee Implants: In Vitro Study Using More Realistic Lubricant, M.-M. Sava, B. Munteanu, D. Leveque, Y. Berthier, A.-M. Trunfio-Sfarghiu
- (4) Prix du meilleur résumé à la conference 4th International Conference on BioTribology, Canada 2018: “Biomimetic phospholipid vesicles lubricants: Synthesis and multiphysics characterizations. Application in The Joint Diseases” Darragi N., Massardier V., Zouari A., Maniti O., Piednoir A., Girard-Egrot A., Guichardant M., Landoulsi A., Tinland B, Trunfio-Sfarghiu A.M
- (5) Prix de la meilleure thèse de la commission Matériaux pour la Santé 2018 Mirela SAVA « Comportement tribologique de l'UHMWPE dans les implants de genou : de l'expertise des explants aux études in vitro »
- (6) Prix de la meilleure présentation orale au 17th International Conference on Organized Molecular Films, New-York 2018 Julien Bompard, L. Brizuela, S. Mebarek, A-M Sfarghiu, T. Granjon, A. Girard-Egrot, O. Maniti "Alternative targeting using fine-tuned membrane physicochemical properties to improve drug delivery”

7. Participations à l'enseignement / an

- (1) cours Bio ingénierie – 5eme année GMD INSA Lyon (6h). « Couplages physique/chimie/mécanique/biologie dans le fonctionnement des contacts vivants »
- (2) cours Tribologie pour les ingénieurs – 5eme année GMD INSA Lyon (2h) « Nano-tribologie »
- (3) 2h + 16 TP + 3 TD cours UE 'Bases Expérimentales et de Modélisation', Master Mécanique/Biomécanique MEGA UCBL
- (4) J'encadre chaque année 2 projets de fin d'études (stages ERASMUS et/ou PFE) et 2 stages de master M2 Biomécanique.

8. Publications - Revues internationales à comité de lecture

- 2018** Hannoun A., Ouenzerfi G, Brizuela L, Mebarek L, Bougault B, Hassler M, Berthier Y, Trunfio-Sfarghiu A-M, Pyrocarbon versus cobalt-chromium in the context of spherical interposition implants: In vitro study on cultured chondrocytes, accepted for publication in *Cells & Materials*, 14 novembre 2018
- 2018** Irina Popescu, Dana Mihaela Suflet, Irina Mihaela Pelin, Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu Crosslinked maleic anhydride copolymers microspheres for dye adsorption, accepted for publication in *REVUE ROUMAINE DE CHIMIE*, septembre 2018
- 2018** Veselack, T, Aldebert, G., Trunfio-Sfarghiu, A.-M., Schmid, T.M., Laurent, M.P., Wimmer, M.A. Phospholipid vesicles in media for tribological studies against live cartilage Lubricants Volume 6, Issue 1, 11 February 2018, Article number 19
- 2018** Sava MM , Munteanu B, Renault E , Berthier Y , Trunfio-Sfarghiu AM , "Tribological analysis of retrieved UHMWPE tibial implants in unicompartmental knee replacement", *Biotribology* 13, pp. 1-15
- 2017** Jihen Zouaoui; Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu, Leyre Brizuela, Agnès Piednoir, PhD; Ofelia Maniti, Bogdan Munteanu, Saida Mebarek, Agnès Girard-Egrot, Ahmed Landoulsi, Thierry Granjon, Multi-scale mechanical characterization of prostate cancer cell lines: Relevant biological markers to evaluate the cell metastatic potential, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.09.003>, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*
- 2016** M. Popa, Francesca Peditto, L. Guy, Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu, Yves Berthier, Sylvie Descartes, A tribological approach to understand the behavior of oral-care silica during tooth brushing, *Biotribology*, Elsevier, 2016, 6, pp.1-11.
- 2016** G Ouenzerfi, A Hannoun, M Hassler, L Brizuela, S Youjil, C Bougault and A-M Trunfio-Sfarghiu, Characterization of cell cultures in contact with different orthopedic implants biomaterials, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 147 (2016) 012015 doi:10.1088/1757-899X/147/1/012015
- 2016** I Essefi, H Hakkouna, G Ouenzerfi, G Mollon, S. Hamza, E Renault, Y Berthier and A-M Trunfio-Sfarghiu, Tribological characterisation of UHMWPE used in dual mobility total hip prosthesis, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 147 (2016) 012014 doi:10.1088/1757-899X/147/1/012014
- 2015** Irina M. Pelin, Tinca Buruiana, Violeta Melinte, Sylvie Descartes, Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu, Pierre Farge, *A novel light-cured dental material based on maleic copolymer functionalized with urethane derivative for dental applications*, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64: 551–562, DOI: 10.1080/00914037.2014.996704
- 2014** Munteanu B., Harb F., Rieu J.-P., Berthier Y., Tinland B. and Trunfio-Sfarghiu A.-M., *Charged particles interacting with a mixed supported lipid bilayer as a biomimetic pulmonary surfactant*, *Eur. Phys. J. E* (2014) 37: 72, DOI 10.1140/epje/i2014-14072-7
- 2014** Matei CI, Boulocher C, Boulé C, Schramme M, Viguier E, Roger T, Berthier Y, Trunfio-Sfarghiu AM, Blanchin MG. *Ultrastructural Analysis of Healthy Synovial*

- Fluids in Three Mammalian Species*. Microsc Microanal 2014; 18:1-9, DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S1431927614000415>
- 2014** Falk K., Fillot N., Sfarghiu A.-M., Berthier Y., Loison C., *Interleaflet sliding in lipidic bilayers under shear flow: comparison of the gel and fluid phases using reversed non-equilibrium molecular dynamics simulations*, Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, Feb 7;16(5):2154-66. DOI: 10.1039/C3CP53238K
- 2013** Munteanu B., Berthier Y., Rieu J.-P. and Trunfio-Sfarghiu A.-M., *Effect of ions on the interactions of glass nanoparticles with monolayer lung surfactant. Applications for the study of inhaled airborne wear particles*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Volume 16, Supplement 1, 2013, pag 264-265, DOI:10.1080/10255842.2013.815877,
- 2013** Sava M.-M., Boulocher C., Matei C.I., Munteanu B., Schramme M., Viguier E., Roger T., Berthier Y., Blanchin M.-G., Trunfio-Sfarghiu A.-M., *Structural and tribological study of healthy and biomimetic synovial fluid*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Volume 16, Supplement 1, pag 216-218, DOI:10.1080/10255842.2013.815866
- 2013** Cueru L., Bougault C., Aszodi A., Berthier Y., F.Mallein-Gerin, Trunfio-Sfarghiu A.-M., *Mechanical and physicochemical responses for hyaline cartilage. Role of protein $\beta 1$ integrin in mechanotransduction*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Volume 16, Supplement 1, pag 330-331, DOI:10.1080/10255842.2013.815947
- 2013** Pelin IM, Trunfio-Sfarghiu AM, Farge P, Piednoir A, Pirat C, Ramos SMM, *Multiscale characterization of partially demineralized superficial and deep dentin surfaces*, Eur J Oral Sci 2013; Aug;121(4):341-8. doi: 10.1111/eos.12058
- 2013** Bougault C., Cueru L., Bariller J., Malbouyres M., Paumier A, Aszodia A, Berthier Y, Mallein-Gerin F., Trunfio-Sfarghiu A.-M., *Alteration of cartilage mechanical properties in absence of $\beta 1$ integrins revealed by rheometry and FRAP analyses*, Journal of Biomechanics, Journal of Biomechanics 46 (10) 1633–40, doi: 10.1016/j.jbiomech.2013.04.013
- 2013** Wang N., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Portinha D., Descartes S., Fleury E., Berthier Y., Rieu J-P., *Nanomechanical and tribological characterization of the MPC phospholipid polymer photografted onto rough polyethylene implants*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 108, 1 August 2013, Pages 285–294, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.011
- 2013** Mirea D., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Matei C.I., Munteanu B., Piednoir A., Rieu J-P, Blanchin M-G, Berthier Y., *Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of synovial fluid*, Tribology International, Volume 59, March 2013, Pages 302–311, doi: 10.1016/j.triboint.2012.06.015
- 2012** Bostan L., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Verestiuc L., Popa M.I., Munteanu F., J.-P.Rieu, Berthier Y., *Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels as articular cartilage substitutes*, Tribology International, Volume 46, Issue 1, Pages 215-224, doi: 10.1016/j.triboint.2011.06.035
- 2012** Crisan N., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Gordin D, Stoica G, Berthier Y, Gheorghiu H, *HEMA – Tested in Biological Environment for Wear Resistance*, Mater. Plast. vol. 49 iss. 1, p 73-76, Journal ISSN: 0025-5289
- 2012** Pelin I., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Farge P., Piednoir A., Pirat C., Ramos S. *Mechanical and physicochemical properties of the deep dentin*, in Bulletin of the Polytechnic Institut of Iasi, vol. LVIII (LXII), nr. 2, pag 37-44, ISSN 1011–2855
- 2012** Munteanu B., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Matei C.I., Blanchin M-G, Miossec P., Boulanger P., S-S Hong, Rieu J-P., Y. Bertier, *Correlation between nanomechanical and tribological properties of healthy and pathological synovial fluids reconstituted from synoviocyte cultures*, in Bulletin of the Polytechnic Institut of Iasi, vol. LVIII (LXII), nr. 2, pag. 11-18, ISSN 1011–2855

- 2012** N. Crisan, A-M Trunfio – Sfarghiu, D Gordin, G Stoica , Y Berthier , H Gheorghiu, Experimental determinations of the titane alloy, Ti12Mo, behaviour, with biomedical application, U.P.B. Sci. Bull., Series D, Vol. 74, Iss. 2, ISSN 1454-2358
- 2011** Mirea D.A., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Piednoir A., Rieu J.-P., Blanchin M.-G. and Berthier Y. *AFM study of the interaction between synovial liquid's molecular components in boundary lubrication*, Journal of the Balkan Tribological Association, Volume 17, Issue 4, Pages 641-650, Journal ISSN 1310-4772
- 2011** Corneci M.C., Dekkiche F., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Meurisse M.-H., B., Berthier Y. and Rieu J.-P., *Tribological properties of fluid phase phospholipid bilayers*, Tribology International, Volume 44, Issue 12, Pages 1959-1968, doi : 10.1016/j.triboint.2011.08.015
- 2011** L.Cueru, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Bala, B. Depalle, A. Descamps, Y. Berthier, H. Follet *Correlation between Microstructure and Nanomechanical Properties of Cortical Bone*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Volume 14, Supplement 1, August 2011, pages 223-225, DOI: 10.1080/10255842.2011.595199
- 2011** Bostan L., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Vereștiuc L., Popa M.I., Berthier Y., Tribological behaviour of hydrogels based on p(HEMA), Buletinul Institutului Politehnic din Iași, Tomul, LVII (LXI), Fasc. 1, 2011, p.1-9.
- 2010** Bostan L., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Vereștiuc L., Popa M.I., Munteanu F., Berthier Y., *Macro and nano-tribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Vol.13, No.S1, p. 33-35, DOI: 10.1080/10255842.2010.491945
- 2010** Dekkiche F., Corneci M.C., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Munteanu B., Berthier Y., Kaabarb W. and Rieu J.-P., *Stability and tribological performances of fluid phospholipid bilayers: effect of buffer and ions*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 80, Issue 2, Pages 232-239, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.06.012. Epub 2010 Jun 25.
- 2010** Margaron Y, Bostan L, Exposito JY, Malbouyres M, Trunfio-Sfarghiu A.-M., Berthier Y and Lethia C, *Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis*, Biophysical Chemistry 147, 1-2 (2010) p.87-91, doi: 10.1016/j.bpc.2009.12.011
- 2010** Corneci M.C., A.-M. Trunfio-Sfarghiu, F. Dekkiche, Y. Bertier, M.-H.Meurisse, J.-P. Rieu, Influence of Lubricant Physicochemical Properties on the Tribological Operation of Fluid Phase Phospholipid Biomimetic Surfaces, Acta Tribologica, vol. 18, (2010), 58-84, p-ISSN 1220-8434, e-ISSN 2069-4601
- 2010** A.-M. Trunfio-Sfarghiu, Corneci M.C., Y. Bertier, M.-H.Meurisse, J.-P. Rieu, Mechanical and Physicochemical analysis of the tribological operation of joint replacement, Acta Tribologica, vol. 18, (2010), p-ISSN 1220-8434, e-ISSN 2069-4601
- 2009** LeRoy S., Steinberger A., Cottin-Bizonne C., Trunfio-Sfarghiu A.M., Charlaix E. "Nano-rheology of supported phospholipid bilayers", Soft Matter, 2009, 5, 4997–5002
- 2008** Trunfio Sfarghiu AM, Rieu JP, Berthier Y, Meurisse MH, "Role of nano-mechanical properties in the tribological performances of phospholipid biomimetic surfaces", Langmuir, Nr. 24, pag. 8765-8771
- 2008** A.M. Trunfio, Y. Berthier, M.H. Meurisse, J.P. Rieu, Analysis of the Tribological Role of LipidMultilayers in Biological Lubrification, Acta Tribologica, Volume 16, p. 41 - 50,
- 2007** Trunfio Sfarghiu AM, Berthier Y, Meurisse MH, Rieu JP, "Multiscale analysis of the tribological role of the molecular assembly of synovial fluid. Case of a healthy joint and implants", Tribology International, vol. 40, nr. 10-12, pag. 1500-1515.
- 2007** A. M. Trunfio; Y. Berthier; M. H. Meurisse; J. P. Rieu, "Analysis of the tribological role of molecular assemblies of synovial fluid in the operation of healthy joints and articular joint prostheses", Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, 1476-8259, Volume 10, Issue 1, Supplement 1, Pages 173 – 174
- 2004** Follet H., Gotteland M., Bardonnnet R., Sfarghiu A.M., Peyrot J., Rumelhart C: "Compressive strength of human openwedges: a selection method". The European Physical Journal-Applied Physics Nr. 25, pag. 141-148.

- 2004** Sfarghiu AM, Berthier Y, Meurisse MH: «An experimental model for analyzing the biotribological function of healthy articular joints.», Acta Tribologica, Vol.12. pag. 51,
- 2003** Sfarghiu A.M., Serban M.C., Follet H., Bardonnat R., “Artificial Neural Networks - an Alternative Method in the Selection of Human Origin Meant for the Varum Correcting Tibial Osteotomy”, Fuzzy Systems and Artificial Intelligence Journal, Vol. 9, Nrs. 1-3, pag. 5-13.

Résumé

L'arthrose (usure des cartilages articulaires) pose un problème de santé majeur car elle est asymptomatique jusqu'à un stade avancé où alors aucun traitement n'est vraiment efficace, seule reste la pose d'un implant (arthroplastie). Implant, dont la durée de vie *in vivo* s'avère encore très décevante par rapport à celle extrapolée à partir de simulations *ex vivo* et cela malgré les efforts internationaux d'optimisation des matériaux. Les discordances entre les durées de vie *in vivo* et *ex vivo* sont principalement imputées aux conditions d'essais *ex vivo* insuffisamment réalistes vis-à-vis des particularités mécaniques et physico-chimiques des lubrifiants biologiques. Ces lubrifiants biologiques sont des milieux moléculaires complexes qui sous contraintes tribologiques créent des couches moléculaires sur les surfaces frottantes des implants articulaires, modifiant ainsi leur comportement en frottement et en usure. Dans ce contexte, nos premiers travaux, ont montré que les structures moléculaires à base de phospholipides sont essentielles dans l'obtention d'un faible coefficient de frottement et une faible usure d'une articulation saine. Par conséquent, notre premier objectif est d'identifier les structures phospholipidiques ayant un rôle clé dans l'évolution de l'arthrose afin de les utiliser comme marqueurs précoces dans le diagnostic. Ceci permettra ensuite, deuxième objectif, de maîtriser les interactions mécaniques et physicochimiques de ces assemblages moléculaires avec les surfaces des implants articulaires et les tissus adjacents (os / cartilage) ; afin d'estimer de manière réaliste la durée de vie des implants et de concevoir des solutions thérapeutiques moins handicapantes qu'une arthroplastie totale.

Pour se faire, il a fallu développer des moyens expérimentaux permettant d'une part la reconstitution *ex vivo* du contact articulaire (triplet tribologique) et d'autre part le suivi *in situ* des champs de déformées et de vitesses des structures phospholipidiques par microscopie confocale à fluorescence. Ainsi deux dispositifs expérimentaux ont été conçus fabriqués et validés :

- 1) un bioréacteur permettant le suivi de la transmission des contraintes tribologiques au niveau cellulaire,
- 2) un bio-tribomètre permettant le suivi de films lubrifiants à l'échelle nanométrique.

Ces développements nous ont permis de mettre en évidence le mécanisme de lubrification sain des articulations synoviales qui repose sur la structuration multi-échelle du liquide synovial : réseaux et vésicules lipidiques remplis de gel glycoprotéique (acide hyaluronique et albumine) et séparées par des multicouches lipidiques. Le faible coefficient de frottement est obtenu par la localisation du glissement dans les couches aqueuses (quelques nanomètres d'épaisseur) piégées entre les couches lipidiques, tandis que la faible usure est assurée par une bonne transmission du chargement normal grâce à l'élasticité des vésicules et à leur répartition spatiale dans les creux des rugosités du cartilage. Ce mécanisme de lubrification sain a été validé pour la première fois sur des prélèvements animaux (rats, chiens, chevaux) et sur des modèles humains (liquide synovial reproduit en cultures cellulaires) (thèse Constantin Ionut MATEI et thèse Dragos MIREA). On a pu reproduire ce mécanisme de lubrification avec certaines surfaces d'implant en polyéthylène par greffage de polymères à base de têtes lipidiques (thèse Na WANG) ; cela permettra de choisir le greffage qui augmentera la durée de vie des implants. D'autre part, l'étude des pathologies articulaires nous a permis de détecter des anomalies de fonctionnement du mécanisme de lubrification sain qui aboutissent à la destruction des structures lipidiques et à la perte des propriétés

lubrifiantes du liquide synovial. Par exemple, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois que :

- 1) la rhéologie intrinsèque des bicouches phospholipidiques est modifiée par des variations des paramètres biochimiques et physicochimiques entraînant une augmentation du coefficient de frottement et l'usure des interfaces lipidiques cartilage/liquide synovial (thèse Magdalena CORNECI),
- 2) la synthèse des vésicules lipidiques ainsi que leurs propriétés nano-mécaniques et lubrifiantes sont modifiées dans les pathologies (thèse Nesrine RAIES-DARRAGI, Samira FILALI)

On a aussi pu montrer, pour la première fois, le rôle des couches lipidiques adsorbées sur les surfaces d'implants en pyrocarbone lors de la synthèse d'un tissu néo-cartilagineux. Ce tissu a été synthétisé *in vivo* par remodelage de l'os frottant contre les implants en pyrocarbone (thèse Ghassen OUENZERFI). Le contrôle de cette synthèse pourra être utilisé afin d'obtenir du cartilage articulaire *in vitro* et réparer l'usure du cartilage *in vivo* (thèse Amira HANNOUN) ; ce qui passe par le contrôle de la transmission des contraintes tribologiques aux cellules via les structures phospholipidiques.

D'autre part, en utilisant des lubrifiants biomimétiques à base de structures lipidiques, nous avons pu reproduire *ex vivo* sur simulateurs de marche les mécanismes d'usure *in vivo* des implants articulaires de genou et hanche (thèse Mirela SAVA et Marwa BEN BRAHAM).

En conclusion, ces travaux ont eu pour but d'identifier (diagnostic) et contrôler (thérapeutique) les réponses biologiques aux sollicitations tribologiques, via les transformations bio-tribologiques des structures lipidiques. Dans ce contexte, nous envisagerons d'identifier et contrôler les réponses tribologiques à travers des sollicitations biologiques induites par le système nerveux : la tribologie au service de l'autoréparation

SOMMAIRE

	Pag.
INTRODUCTION	15
Contexte / Objectifs / Plan	
CHAPITRE A :	
Positionnement et stratégie scientifique	21
A.1. Contexte	21
A.2. Développement des moyens expérimentaux	23
A.2.1. Bio-tribometre	25
A.2.2. Bio-tribo-reacteur	29
A.2.3. Simulator du genou	35
A2.2. Développement d'une méthodologie permettant les couplages mécanique, physicochimie, biochimie, biologie	36
CHAPITRE B :	
Complexes de surface du cartilage articulaire – caractérisation et rôle dans la biolubrification	39
B.1. Etude de l'interaction entre les multicouches lipidiques et différentes protéines du liquide synovial	40
B.2. Etude du rôle des paramètres physicochimiques des couches aqueuses dans le fonctionnement tribologique des multicouches lipidiques	43
B.3. Etude des propriétés biolubrifiantes des multicouches lipidiques dans les pathologies	45
B.4. Développement des molécules a but thérapeutique pour améliorer les propriétés lubrifiantes des multicouches lipidiques	51
B5. Etude des propriétés lubrifiantes des multicouche lipidique en présence des surfaces rugueuses	52
B.6. Optimisation des surfaces d'implant en UHMWPE afin de favoriser la bio-lubrification par des couches phospholipidiques	53
CHAPITRE C.	
Vésicules lipidiques dans le volume du lubrifiant articulaire – caractérisation et rôle dans la bio lubrification	59
C.1. Caractériser les vésicules présentes dans différents liquides synoviaux sains (animaux) et pathologiques humains	59
C.2. Reproduction des vésicules synoviales ex vivo afin de trouver les paramètres clés pour comprendre leur comportement mécanique	63

C.3. Etude de vésicules lipidiques synthétisées dans des cultures cellulaires des synoviocytes humaines. Application dans le diagnostic et la thérapeutique précoce	69
C.4. Evaluer les conséquences sur l'usure des implants en utilisant des lubrifiants biomimétiques a base des vésicules lipidiques	73
C.5. Evaluer les conséquences sur le frottement et l'usure du cartilage en utilisant des lubrifiants biomimétiques a base des vésicules lipidiques	78
CHAPITRE D.	81
Cartilage : l'équilibre biologique garanti les performances tribologiques	
D.1. Réponses mécaniques aux contraintes biologiques	83
D.2. Réponses biologiques aux contraintes mécaniques	87
D.3. Développement des matériaux d'implant capable d'activer la mécanotransduction des chondrocytes in vivo et favoriser l'autoréparation du cartilage	92
CHAPITRE E.	95
Remodelage osseux : genèse et autoréparation du cartilage articulaire par transformations tribologiques surfaciques de l'os	
E.1. Cicatrisation de l'os longue	96
E.2. Création d'une néo-articulation par activation du remodelage osseux dans les prothèses d'interposition	98
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	111
BIBLIOGRAPHIE	117

INTRODUCTION

Contexte

Une articulation synoviale saine est un contact lubrifié particulièrement performant car elle est capable de réaliser des multiples mouvements avec des grandes précisions et des durées de vie importantes (plus de 80 ans). Elle est composée de deux pièces osseuses en regard, recouvertes d'un cartilage articulaire, enchâssées dans un sac ou capsule articulaire fibreuse dont la face interne, intra articulaire, est tapissée par la membrane synoviale (articulations synoviales). Cette membrane sécrète le liquide synovial qui vient baigner la cavité articulaire, et assurer la nutrition du cartilage. A l'extérieur de la capsule, des ligaments assurent le maintien passif et la coaptation de l'articulation. Ils sont eux-mêmes recouverts par les muscles dont les tendons se terminent à proximité de l'articulation et qui assurent le maintien actif de l'articulation, sa protection, sa mobilité et sa stabilité.

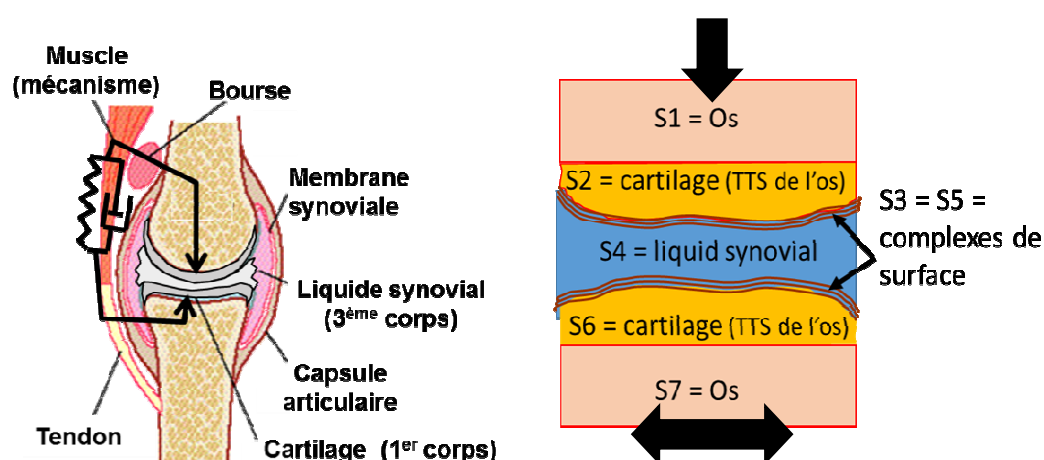


Figure 1. A) Schéma d'une articulation synoviale mettant en évidence le triplet tribologique indispensable pour assurer une bonne fonction, B) schéma des sites biologiques importante pour assurer un bonne fonctionnalité de l'articulation (favoriser la transmission de la charge normale, faciliter l'accommodation des vitesses)

Les deux fonctions importantes d'une articulation synoviales sont:

- 1) d'assurer le maintien de la posture : favoriser la transmission de la charge normale – l'articulation travail en compression
- 2) de permettre le mouvement : faciliter l'accommodation des vitesses - l'articulation travaille alors en glissement.

Plusieurs études visent à comprendre et reproduire les performances du contact articulaire sain sur des systèmes biomimétiques. La difficulté de ces reproductions vient du fait que l'articulation synoviale est un système vivant dont les performances résultent d'une optimisation articulaire continue qui commence dès la période embryonnaire et dure tout au long de la vie.

Plus spécifiquement et de manière générale, les organismes vivants (assemblage d'organes, eux-mêmes composés de tissus, eux-mêmes composées de cellules et d'une matrice extracellulaire) sont soumis à des sollicitations tribologiques (normales et tangentielles, mécaniques et physicochimiques) qui influencent leur évolution biologique. Ainsi, afin d'obtenir une bonne homéostasie de l'organisme (fonctionnement sain), un processus d'équilibre des contraintes biologiques, physicochimiques et mécaniques s'initialise dès la période embryonnaire.

L'équilibre des contraintes biologiques s'effectue à l'échelle de la cellule qui utilise son génome, d'une part, pour se multiplier et, d'autre part, pour synthétiser des composants biologiques (protéines, glucides et lipides) qui génèrent sa matrice extracellulaire ; phénomènes biologiques à la base de la fabrication tissulaire. Un déséquilibre à ce niveau peut entraîner d'une part une division anormale des cellules avec la naissance d'un tissu tumoral ou un défaut de la synthèse de la matrice extracellulaire entraînant une rigidification anormale du tissu (fibrose ou même une ossification entraînant un vieillissement prématuré du tissu).

L'équilibre des contraintes physicochimiques s'effectue à l'échelle du tissu qui achève ainsi sa fabrication par la création de liaisons physico-chimiques entre d'une part les cellules et le composant biologique formant la matrice extracellulaire et d'autre part les cellules entre elles. Un déséquilibre à ce niveau peut, par exemple, se concrétiser par :

- 1) une augmentation de la concentration en sel qui peut générer une augmentation de la pression osmotique interne du tissu entraînant une hypertension sanguine et/ou une activité plus importante des muscles afin de compenser mécaniquement cette pression
- 2) une augmentation de la concentration en radicaux libres et/ou en espèces oxydatives (ROS) (synthétisé de manière endogène par un couplage avec un déséquilibre biologique et/ou apportées par des particules exogènes des différents polluants) qui peut activer le système immunitaire induisant des réactions inflammatoires et/ou allergiques

L'équilibre des contraintes mécanique (forces, moments) s'effectue à l'échelle de l'organe qui adapte alors sa géométrie afin de garantir une bonne fonctionnalité de l'ensemble. Par exemple, dans le cas des articulations la bonne fonctionnalité signifie de transmettre le chargement normal (jusqu'à 6 fois le poids du corps dans le cadre de la marche normal) tout en assurant une bonne cinématique avec des mouvements amples et très précises. Un déséquilibre à ce niveau peut par exemple se concrétiser par des contraintes mécaniques:

- 3) trop faibles qui produisent la déminéralisation de l'os (ostéoporose des astronautes ou arthrose des sédentaires) ce qui se traduit par des risques plus importants pour les fractures
- 4) trop fortes qui génèrent une croissance anormale du tissu osseux (ostéophytes, ...) ce qui se traduit par une modification de la géométrie de l'organe (articulation « tordues »). Dans certains cas ce changement de la géométrie de l'organe n'est pas suffisant pour équilibrer la contrainte mécanique excessive et alors c'est le système neuro-moteur qui intervient pour aider à compenser ce déséquilibre local en le déportant dans un déséquilibre global (perturbation de la marche ou des autres mouvements)

Ainsi si on définit la mécanotransduction comme la réponse biologique à une action mécanique on peut observer à différentes échelles les conséquences de la mécanotransduction qui elle-même reste au niveau cellulaire (en équilibre biologique): (1) conséquences tissulaires (assemblages de plusieurs cellules avec ou sans matrice extracellulaire – en équilibre physicochimique), (2) conséquences sur l'organe (assemblages de plusieurs tissus ayant la même fonctionnalité – en équilibre mécanique), (3) conséquences sur l'organisme (assemblages des plusieurs organes soumis au contrôle du système nerveux - en équilibre physiologique)

Objectifs

Par conséquent, ce travail vise à comprendre comment s'effectuent et interagissent les équilibres mécaniques, physico-chimiques et biologiques dans le cas d'une articulation synoviale saine afin de trouver ensuite des marqueurs qui peuvent mettre en évidence des déséquilibres mécaniques, physico-chimiques et biologiques déclencheurs de pathologies et trouver des solutions pour rééquilibrer le système.

Pour se faire, on se base sur une méthode classique en tribologie qui dans un premier temps vise à identifier les sites d'accommodations des vitesses et dans un deuxième temps vise à analyser les mécanismes de transmission des contraintes dans les sites identifiées auparavant afin de construire le circuit tribologique qui garantit l'homéostasie de l'ensemble de l'articulation.

Ainsi nous définissons 4 sites biologiques (figure 1b) que nous trouvons les plus importantes pour garantir une bonne homéostasie articulaire :

- **S1 = S7 : l'os** – contribue à la bonne **transmission de la charge normale** (environ 6 fois le poids de l'organisme au cours de la marche normale). **Grâce au remodelage osseux** l'os contribue aussi à transformer une grande partie de la contrainte normale en contrainte tangentielle,
- **S2 = S6 : le cartilage articulaire** - contribue à **amortir les chocs et à protéger les extrémités osseuses**, son rôle est équivalent à celui d'un pneumatique automobile.
- **S3 = S5** : les complexes de surface couvrent la surface frottante du cartilage articulaire - contribue à accommoder les vitesses en assurant un **minimum de frottement**
- **S4** : le volume du lubrifiant (liquide synovial) - contribue à assurer un **maximum de portance hydrodynamique**

Tous ces sites articulaires nécessitent une forte interaction entre la transmission des contraintes mécaniques et la réponse biologique afin de garantir les équilibres mécanique/physicochimique/biologique de l'articulation saine. Ces équilibres réalisent une boucle fermée qui s'auto-entretient dans un fonctionnement sain mais qui une fois déséquilibrés peuvent entraîner beaucoup de conséquences qui peuvent cacher la vraie cause des pathologies.

Ainsi, les pathologies ostéoarticulaires représentent environ 10% de l'ensemble des pathologies identifiées en France chaque année, et cela est en net augmentation dû notamment à l'allongement de la durée de vie et à des exigences de qualité qui l'accompagnent. De plus, 80% des personnes âgées de plus de 65 ans se plaignent de problèmes articulaires tandis que seulement 60% sont diagnostiquées avec une pathologie. Cela est dû à une impossibilité de diagnostiquer précocement ces pathologies qui restent le plus souvent de cause inconnue.

Par conséquent, l'objectif de ce travail consiste à **identifier les interactions entre les changements dans l'environnement tribologique (contraintes mécaniques et physicochimiques) d'une articulation synoviale et la réponse biologique cellulaire (synthèse cellulaire)**. Cela permettra ensuite de cibler les sites biologiques de l'articulation sensibles aux contraintes tribologiques et ensuite les utiliser ou :

- 1) pour mesurer leurs changements des propriétés mécaniques dans le but de développer un diagnostic précoce
- 2) pour stimuler mécaniquement les cellules dans le but de développer des thérapeutiques précoces

Plan

Pour ce faire, ce manuscrit est structuré en 5 chapitres. Un premier chapitre (A) qui montre la stratégie scientifique et le développement des différents moyens expérimentaux. Nous insisterons sur le développement des méthodes pour réaliser des expertises *ex vivo* et/ou *in vitro* regroupant l'ensemble des paramètres mécaniques, physicochimiques et biologiques nécessaires à une bonne compréhension des enchaînements cause / conséquences responsables d'une pathologie. Ensuite les chapitres B, C, D, E sont axés chacun sur un site biologique sensibles aux contraintes tribologiques (S1-S4 décrits auparavant).

Plus précisément, afin de garantir toujours une bonne fonctionnalité de l'articulation synoviale (l'équilibre mécanique) l'organisme à besoin de contrôler la transmission des contraintes mécaniques dans les sites mentionnées auparavant. Afin d'assurer cela des mécanismes tribologiques sont activées par des équilibres physico-chimiques et contrôlées par des équilibres biologiques spécifiques pour chaque site. Ainsi :

- 1) Site **S1** – un faible coefficient de frottement est assuré par les complexes de surface de type multicouches lipidiques. C'est pourquoi, le **chapitre B** de ce manuscrit s'intéresse comment le mécanisme d'accommodation des vitesses dans les multicouches phospholipidiques varie du sain au pathologique. On montre notamment comment la fluidité membranaire pourra être un marqueur précoce des pathologies (*ANR BioLub 2012-2016 collaboration ILM, thèse Magdalena Corneci 2012, Dragos Mirea 2011, Florence Blanchon 2016*) et comment on pourra influencer cette fluidité membranaire par l'exposition a différents polluants (*projet Région Bio-tribo-minéralogie 2018-2021, thèse Bogdan Munteanu 2015, Valentin Massardier 2018-...*) ou par l'injection des molécules polysaccharidiques dans le but thérapeutique (*projet Brancusi Campus France 2016-2018 - collaboration ICMPP Iasi Roumanie*)
- 2) Site **S2** – une grande portance hydrodynamique du liquide synovial est assuré par les propriétés élastiques et adhésives des vésicules lipidiques. Le contrôle des propriétés de ces vésicules se fait par l'équilibre biologique au niveau des synoviocytes, les cellules bordant la capsule synoviale qui synthétisent ces vésicules. C'est pourquoi le **chapitre C** de ce manuscrit s'intéresse à **identifier les mécanismes d'accommodation des vitesses dans les vésicules lipidiques** dans le cas sain et pathologique afin de développer des substituts du liquide synovial dans un but thérapeutique (*projet Campus France avec l'Université de Bizerte Tunisie 2016-2018, thèse de Nersine Raies 2017 - ...*) ou dans le but d'optimiser les implants articulaires (*projet Macodev 2019-2012, BQR INSA Lyon 2010-2012 et 2015-2017, projets TORNIER 2015-2017, thèse Na Wang 2013, Mirela Sava 2018*)
- 3) Site **S3** – un important amortissement est assuré par la rétention de 80% vol. d'eau dans la structure du cartilage articulaire (équilibre physico-chimique). Cela est possible grâce à un contrôle biologique (équilibre biologique) à travers la synthèse des aggrecanes (molécules qui retient l'eau) par les chondrocytes (cellules du cartilage). La synthèse des aggrecane et soumise a un équilibre des contraintes mécaniques au niveau du chondrocytes car cette cellule est capable de synthétiser l'aggrecane seulement si elle reçoit une contraintes mécanique isotrope sur sa surface (équilibre mécanique). Ainsi le **chapitre D** de ce manuscrit décrit **comment on peut moduler la transmission des contraintes mécaniques**

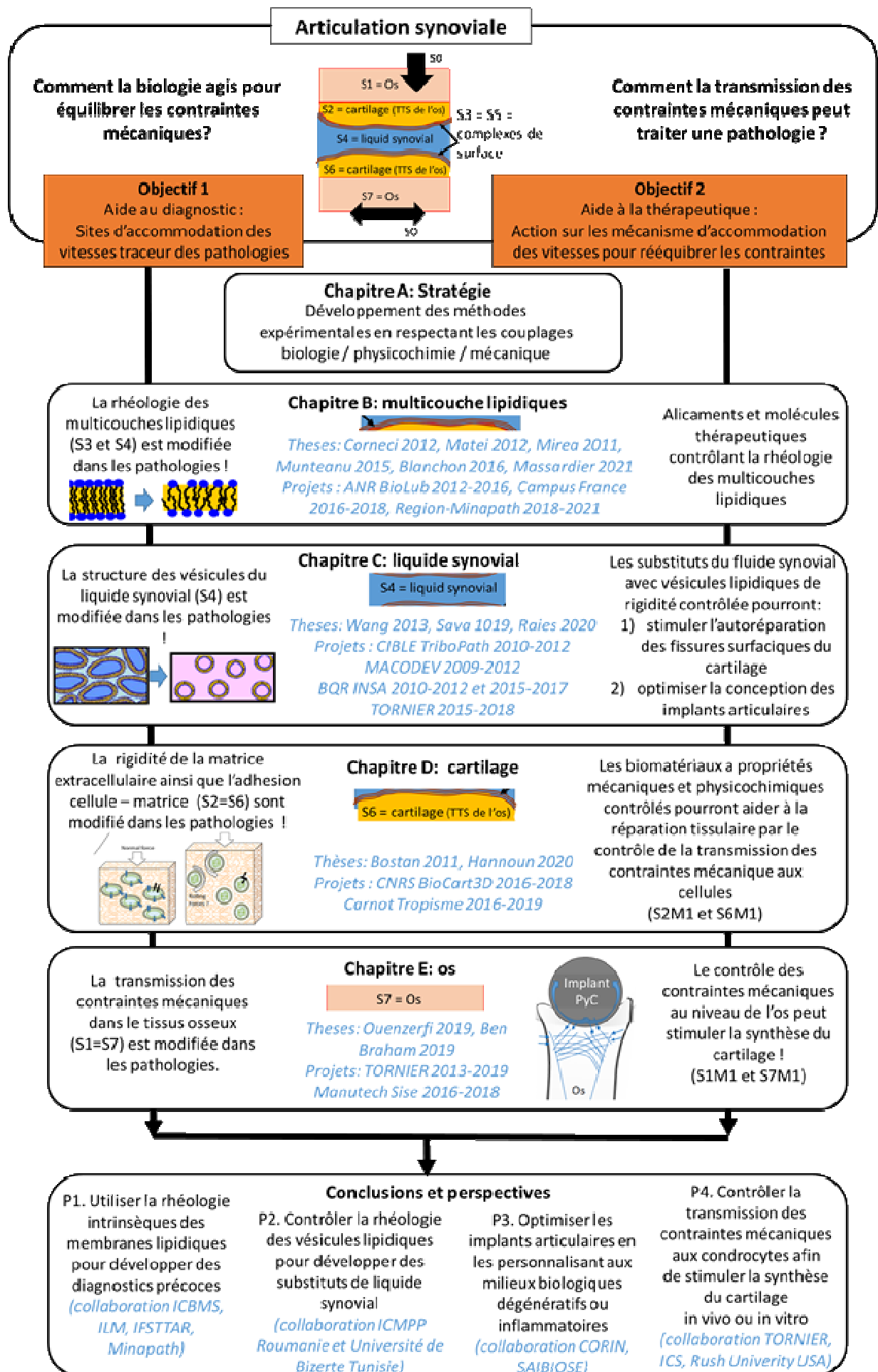
aux chondrocytes afin de synthétiser du cartilage *in vitro* (projet CNRS BioCart3D 2016-2018, collaboration LBTI Lyon et TORNIER, thèse Amira Hannoun 2016 - ...).

- 4) Site **S4** – une faible usure est assurée par un contrôle du remodelage osseux (équilibre biologique). Ainsi le **chapitre E** de ce manuscrit décrit **comment on peut rendre l'usure « pas visible » à travers le remodelage osseux**. On montre notamment comment on peut moduler la transmission des contraintes mécaniques dans le tissu osseux à travers les biomatériaux des implants afin d'obtenir un néo-cartilage *in vivo* (projets TORNIER 2013-2019, thèses Ghassen Ounzerfi 2013-2019, Amira Hannoun 2016 - ...).

Le manuscrit se termine par la présentation de seulement une partie des conclusions et perspectives de ce travail qui ouvre la voie à l'identification (diagnostic) et aux contrôles (thérapeutique) des réponses biologiques aux sollicitations tribologiques à travers les structures de type multicouches lipidiques. Ainsi 4 perspectives seront détaillées :

- 1) Utiliser la rhéologie lipidique pour développer des diagnostics précoces ou des particules d'usure bio-tribo-compatibles (*collaboration ICBMS, IFSTTAR, Minapath*)
- 2) Contrôler la rhéologie des vésicules lipidiques pour développer des substituts de liquide synovial (*collaboration ICMPP Roumanie et Université de Bizerte Tunisie*)
- 3) Optimiser les implants articulaires en les personnalisant au milieu biologiques dégénératifs ou inflammatoires (*collaboration CORIN et INSERM St Etienne*)
- 4) Contrôler la transmission des contraintes mécaniques aux chondrocytes afin de stimuler la synthèse du cartilage *in vivo* ou *in vitro* (*collaboration TORNIER et Rush University USA*)

La figure 2 schématise le plan de ce manuscrit.



Chapitre A

Positionnement et stratégie scientifique

A1. Contexte

Les pathologies dues au vieillissement ou à des traumatismes des contacts frottant biologiques prennent de plus en plus d'ampleur. Cela est dû notamment à l'allongement de la durée de vie et à des exigences de qualité qui l'accompagnent. Ainsi 80% des personnes âgées de plus de 65 ans se plaignent de problèmes articulaires tandis que seulement la moitié sont diagnostiqués avec une pathologie. Cela est dû à une impossibilité de diagnostiquer précocement ces pathologies qui restent le plus souvent de cause inconnue. De plus, le caractère indolore du cartilage articulaire fait que le diagnostic arrive très tard quand la seule solution thérapeutique efficace est l'arthroplastie (remplacement de l'articulation par un implant). Ainsi, la complexité des pathologies ostéoarticulaires fait qu'actuellement il n'existe pas de traitements vraiment efficaces, hormis la pose d'un implant (arthroplastie). Par conséquent l'industrie des implants articulaires constitue un enjeu économique important : 150000 prothèses de hanches et 50000 prothèses de genoux ont été implantées en France en 2013, ce qui représente plus d'un million de français porteurs d'une prothèse totale de hanche aujourd'hui et un marché de plus de 500 millions d'euros par année, le marché mondial étant environ vingt fois supérieur [CETIM Informations 196(2013)]. En plus de cet enjeu économique, il existe aussi un enjeu sociétal car, en comptant tous les soins médicaux associés aux arthroplasties, on arrive à environ 2 milliards d'euros par an de dépenses pour la Sécurité Sociale [Comptes nationaux de la santé 2012], somme qui est en nette croissance due à l'allongement des durées de vie et des exigences de qualité qui l'accompagnent. Ainsi, malgré de nombreux efforts pour retarder la pose d'un implant et développer de nouveaux matériaux pour minimiser leur usure, la durée in vivo des implants articulaires s'avère souvent très décevante par rapport aux extrapolations faites à partir de simulations ex vivo [Goodman SB (2007) Biomaterials]. De plus, des études récentes montrent, d'une part, l'augmentation des réactions allergiques aux matériaux d'implant [Mitchelson A.J. (2015) BioMed Res. Int.] et d'autre part l'augmentation des réactions de nano-toxicité liée à la présence des particules ultrafines [Bitounis D. (2016) Biomaterials]) ce qui diminue considérablement la durée de vie de l'implant in vivo. Afin d'éviter ces réactions biologiques, l'industrie des implants cherche à développer des matériaux d'implant non inflammatoires de type polyéthylène chargé à la vitamine E [Brach E.M., (2009) J Orthopaed Traumatol] tandis que les chirurgiens conseillent de plus en plus aux patients de faire des tests d'allergie aux différents matériaux d'implant afin de mieux choisir le type d'implant à mettre.

De plus, sur le marché mondial on voit apparaître des nouveaux biomatériaux qui présentent moins de résistance in vivo que les anciens et surtout par rapport aux extrapolation ex vivo faites par rapport aux normes médicales en vigueur.

En effet, l'évolution de la société fait évoluer aussi notre environnement qui est soumis à des nouvelles habitudes nutritionnelles et a des sources des polluants auxquels il doit s'adapter en continu. Ainsi, l'évolution des nanotechnologies et nanomatériaux fait que l'organisme humain est de plus en plus en contact avec des micro/nanoparticules issues de divers processus industriels ou d'usure des différents couples de matériaux ou même des produits utilisés pour relever le goût dans notre nourriture ou améliorer l'aspect de nos cosmétiques.

D'autre part, le frottement est indispensable dans la vie de tous les jours. Par exemple, le frottement assure la sécurité routière par le freinage ; de même les prothèses de hanche ou

de genou, grand progrès médical, fonctionnent au prix de frottements et d'usure ; de même les ouvriers du bâtiment sont exposés à des poussières minérales lors de leurs activités (perçage, creusement, etc.). A l'heure actuelle on ne connaît pas de système de frottement qui fonctionne sans usure. Les nouvelles technologies essaient d'améliorer la résistance mécanique et de limiter l'usure, en réduisant la taille des particules émises. Cependant, plus les particules d'usure sont petites, plus la surface d'échange avec l'organisme est élevée et ainsi le risque toxique peut être majoré dans le cadre de la nano-toxicologie. L'impact sur la santé publique est de plus en plus important, car les micro/nanoparticules peuvent entraîner des réactions chimiques de production de radicaux libres, aboutissant à des mutations du génome ou agir directement en venant au contact de l'ADN dans le noyau cellulaire [Roland M. Du Bois, Jim J. Egan (2007) Diffuse Parenchymal Lung Disease publié par Ulrich Costabel ; Oberdorster (2005) Environmental Health Perspectives].

En effet, comme montré dans le chapitre introductif, afin d'optimiser les traitements des contacts frottant biologiques il faudra savoir caractériser l'évolution des sites biologiques en fonction des contraintes tribologiques.

Par conséquent la stratégie de ces recherche est de comprendre l'évolution des propriétés mécaniques et physicochimiques des sites biologiques du sain vers les pathologies et ensuite les reproduire ex vivo et/ou in vitro afin de comprendre les mécanismes tribologiques conduisant aux pathologiques. Cela permettra ensuite d'utiliser ces mécanismes pour mettre en évidence des paramètres clé pour la détection précoce des pathologies. Dans un deuxième temps, l'étude de la transmission des sollicitations tribologiques dans un contact articulaire saine / pathologique et prothétique permettra d'identifier les paramètres clés pour une thérapeutique cible sur le rééquilibrage des contraintes mécaniques par des lubrifiants et matériaux biomimétiques qui évitent l'arthroplastie totale en favorisant l'autoréparation de l'usure tissulaire par la stimulation mécanique des cellules.

Par consequence, l'originalité de cette approche est de comprendre la transmission des contraintes tribologiques dans les contacts articulaires et dans leur environnement mécanique, physicochimique et biologique afin de l'utiliser comme marqueur pour le diagnostic précoce et la thérapeutique des pathologies des contacts frottants biologiques.

Plus particulièrement, du côté **diagnostic** cette approche vise à comprendre la réponse des contacts vivants aux sollicitations tribologiques avant que les réactions inflammatoires s'installent. Cette approche, par rapport à la démarche classique qui vise à étudier les conséquences mécaniques et physicochimiques une fois que la pathologie est installée (notamment ses réactions inflammatoires), nous permette de faire ressortir les causes mécaniques et/ou physicochimiques de la multitude des conséquences biologiques inhérente à toute pathologie. Trouver des moyens pour la détection ciblée de ces causes mécaniques et/ou physicochimiques aidera au diagnostic précoce des pathologies.

Du coté **thérapeutique non prothétique** comprendre la réponse des cellules aux sollicitations tribologiques est importante pour trouver des moyens de contrôler la transmission des contraintes tribologiques aux cellules afin d'activer leur synthèse pour combler l'usure de manière efficace (synthèse du bon composant biologique qui redonne les bonnes propriétés mécaniques et physicochimiques au tissu)

Du coté **thérapeutique prothétique** le première objectif est de comprendre et de maîtriser les interactions mécaniques et physicochimiques entre l'environnement biologique (notamment le lubrifiant) et les surfaces d'implants articulaires. Ceci permettra ensuite, deuxième objectif, de concevoir des solutions prothétiques moins handicapantes qu'une arthroplastie totale, en développant par exemple des matrices polymère à hydrophilie contrôlée pour la mise en forme des cartilages et ménisques artificiels et l'optimisation des propriétés lubrifiantes par un accrochage judicieux des assemblages lipidiques sur ces matériaux. Par conséquent, la stratégie de mes recherches dans le domaine des implants articulaire vise à coupler des analyses biochimiques, physicochimiques, mécaniques et tribologiques afin de comprendre et prédire le coefficient de frottement et la durée de vie des implants. Les résultats de ces analyses seront utilisés pour concevoir des matériaux biomimétiques et bio-lubrifiants pour éviter l'arthroplastie totale.

A2. Méthodologie scientifique :

La démarche, méthodologie scientifique, s'inscrit dans la démarche générale de la tribologie et se base sur le **développement des moyens expérimentaux** permettant :

1. d'une part la reconstitution *ex-vivo* du triplet tribologique vivant,
2. d'autre part le suivi *in situ*, dans le contact frottant, des champs de déformées et vitesses.

Les données obtenues grâce à ces moyens expérimentaux sont ensuite **couplés aux modèles analytiques et numériques** afin de comprendre l'origine, prédire l'évolution des dégradations (le circuit tribologique) et optimiser la transmission mécanique afin de minimiser l'usure. Par exemple, la transmission des contraintes mécaniques aux cellules pourra être optimisée par la conception des matériaux et lubrifiants structuré à différentes échelles et a rigidité contrôlé afin de stimuler la bonne synthèse tissulaire et combler ainsi l'usure (conception des matériaux pour favoriser la bio-lubrification).

A2.1. Développement des moyens expérimentaux :

Grâce aux différents projets (3 BQRs INSA, deux projets d'équipement labo, un projet CIBLE de la Région Rhône-Alpes, un projet ANR, un projet CNRS, un projet inter-Carnot, un projet Manutech Sise, 2 CIFRE avec l'industriel TORNIER) j'ai pu aménager une salle ISO5 et une salle L2 dédiée aux expérimentations bio-tribologiques au LaMCoS équipé entre autre avec :

- deux systèmes pour la fabrication des lubrifiants biomimétiques (projets avec l'industriel TORNIER)
- un bioréacteur sous sollicitations tribologiques pour les cultures cellulaires. Ce dispositif a été développé en collaboration avec le Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'ingénierie Thérapeutique, LBTI, Lyon au cours du projet CNRS MecanoBiologie (2015-2017)
- une étuve CO₂ compatible avec le bioréacteur de cultures cellulaires (projet LaMCoS)
- un bio-tribomètre sous sollicitations dynamiques. Dispositif développé en collaboration avec l'Institut Lumière Matière au cours de l'ANR BioLub 2012-2016 et adapté pour étudier la réaction de bio-tribo-corrosion sur des cultures cellulaires *in situ* au cours de BQR INSA avec le laboratoire de Science des Matériaux MATEIS Lyon)
- un microscope Zeiss Axio Examiner équipé d'une tête confocale type LSM700, compatible avec le bioréacteur et le bio-tribomètre et permettant la visualisation *in situ* du contact frottant. (projets CIBLE TriboPath et BQR INSA avec l'Institut Multidisciplinaire

de Biochimie des Lipides (IMBL Lyon) et le Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères IMP Lyon)

- Couve de Langmuir adapté pour reproduire les sollicitations mécaniques du film de surfactant pulmonaire ainsi que un système de collecte des particules de l'air ambiant directement sur surfactant biomimétique (projet PEPS avec l'Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon (IRCELyon), projet BQI INSAVALOR et projet avec l'industriel MINAPATH)

Une vue générale des moyens expérimentaux mis au point afin d'étudier la transmission des contraintes dans les articulations synoviales ainsi que les analyses mécaniques et physico-chimiques associées est présenté dans la figure 3, les détails seront donnés dans les paragraphes qui suivent. Ainsi, pour l'étude des mécanismes:

- d'usure et de frottement des matériaux d'implant articulaires le tribomètre PeDeBa du LaMCoS a été transformé en simulateur du genou (figure A. a)
- de transmission des contraintes mécaniques aux chondrocytes un bio-tribo-réacteur sous microscopie confocale a été conçu, fabriqué et validé (figure A b)
- de la bio-lubrication par des multicouches lipidiques un bio-tribomètre sous microscopie confocale (figure A b) a été conçu, fabriqué et validé. Ce bio-tribomètre a été aussi modifié afin de permettre l'étude *in situ* de la toxicité des particules d'usure des implants articulaires en direct sous des cultures cellulaires.

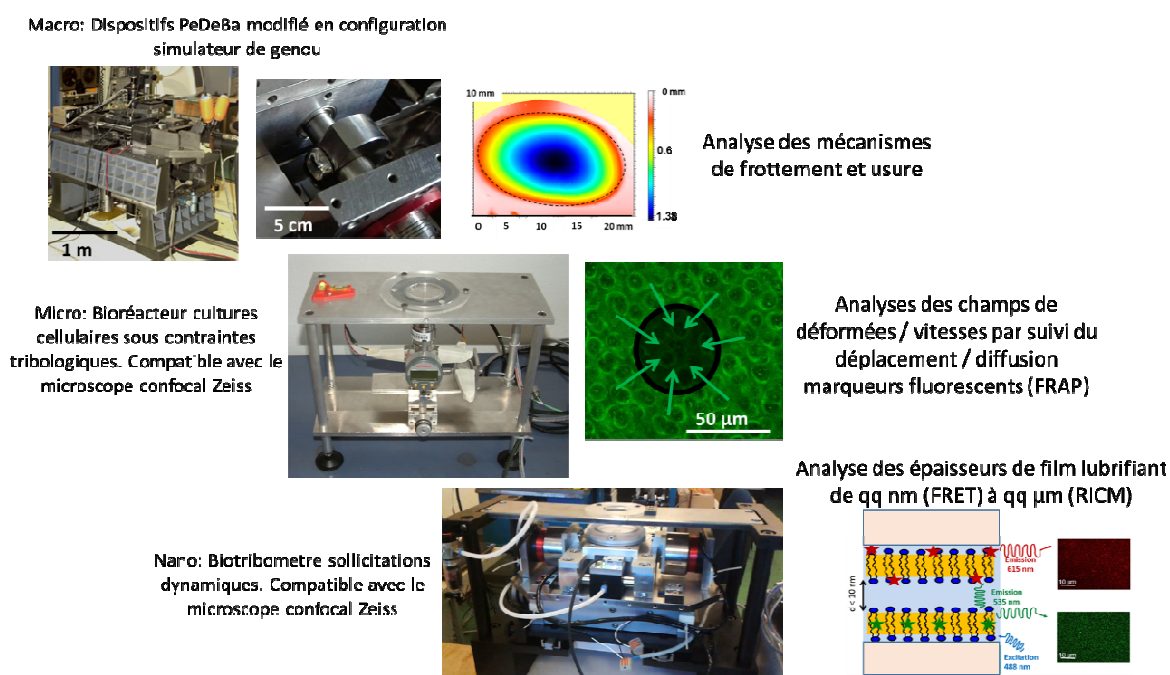


Fig.3. Schéma des moyens expérimentaux mis en commun pour quantifier la transmission des contraintes mécaniques *in situ* dans le contact articulaire

Ces moyens ont contribué à la mise au point d'une méthodologie d'analyse des prélèvements *ex-vivo* de fluides synoviaux et/ou cartilages au cours de pathologies articulaires. Cette méthodologie relie des analyses biochimiques, physicochimiques, nano-mécaniques et tribologiques des prélèvements afin de pouvoir diagnostiquer de manière précoce les pathologies et agir sur les causes mécaniques des dégâts articulaires en développant des traitements efficaces non prothétiques.

A2.1.1. Tribomètre BIOLUB

Ce bio-tribomètre unique a été conçu afin de permettre d'étudier à grande résolution les mécanismes de la bio-lubrification par multicouches lipidiques. Il est compatible actuellement avec la microscopie confocale à fluorescence, les cultures cellulaires et avec l'étude de la tribo-corrosion.

Ce dispositif unique a pu réaliser grâce au projet ANR BioLub 2012-2016 et adapté pour les cultures cellulaires grâce au projet Canot TROPISME 2015-2018 et en configuration tribo-corrosimètre grâce au projet BQR INSA Lyon 2016-2018.

Un dessin technique de ce dispositif dans sa conception initiale ainsi que une photo du dispositif sont montrés dans la figure A.3.

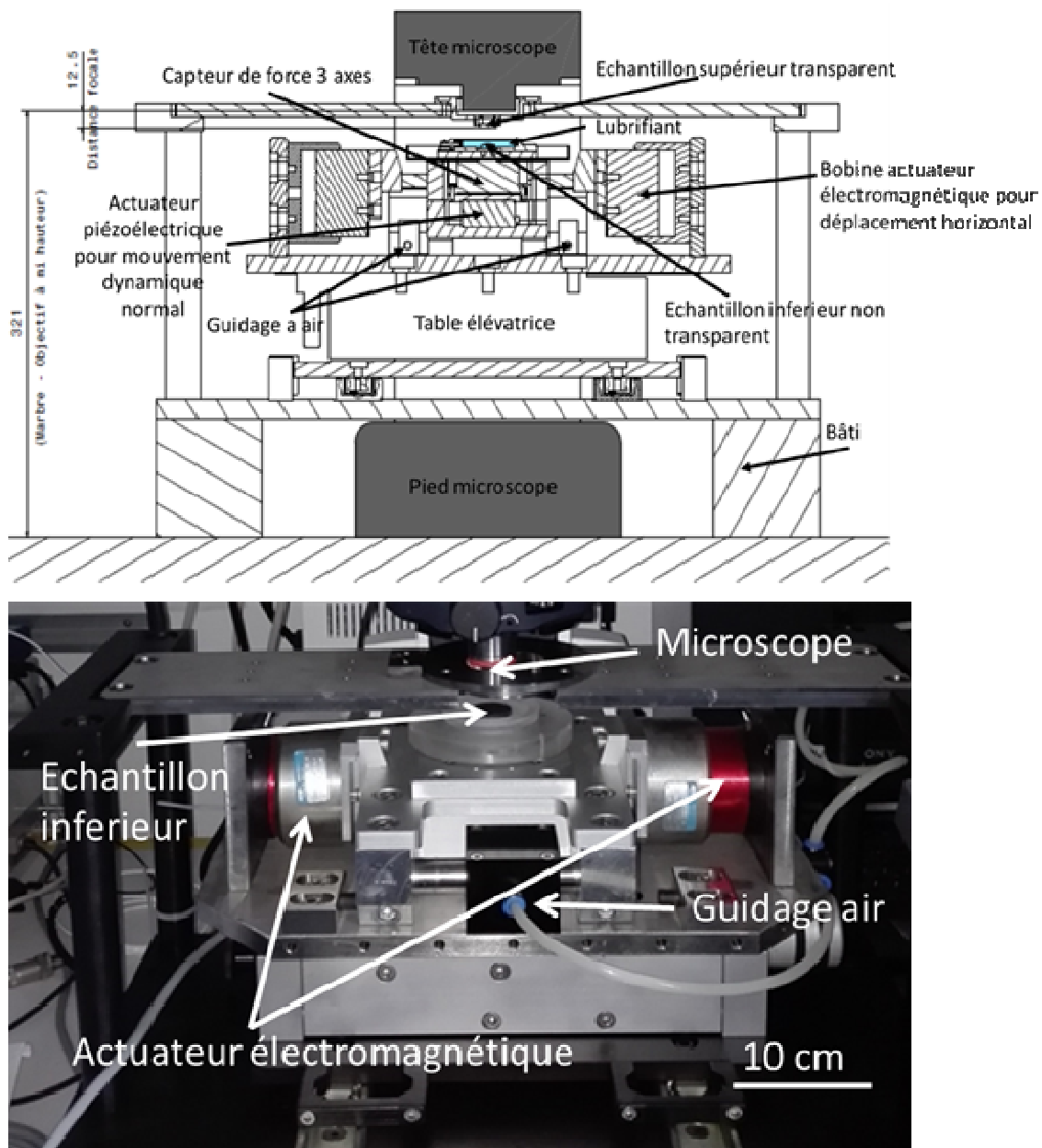


Figure A.3. Tribomètre BIOLUB

Ainsi, coté conception, nous avons choisi de travailler dans une configuration tribologique proche d'une machine de force de surface, mais en utilisant des déplacements relatifs de plus grande amplitude et de sollicitations dynamiques proches d'un rhéomètre.

Ce bio-tribomètre impose un mouvement tangentiel d'une course maximale de 15 mm à l'aide des 2 bobines électromagnétiques montées pour un mouvement synchronisé (Voice Coils, Encodé, Associated Electronics H2W). Piloté actuellement par un logiciel développé au LaMCoS (David Leveque) ce dispositif permet de réaliser des déplacements en triangle, sinus, fréquence variable, distance variable. Pour avoir de grandes résolutions dans les mesures de la force tangentielle, on a choisi des guidages à air pour éliminer tout frottement parasite. La conception ce bio-tribomètre a été faite de manière à permettre la visualisation *in situ* du contact par microscopie de fluorescence. Ainsi, le microscope Zeiss Axio Examiner a été adapté pour les expérimentations en rajoutant une réhausse et une tête confocal LSM 700 avec plusieurs filtres de fluorescence pour des expériences de type FRAP, FRET et RICM. La conception du port échantillon supérieur (figure A a) a été faite afin de permettre la visualisation:

- du centre du contact à travers l'échantillon supérieur qui doit être transparent
- de la trace de frottement ou des cultures cellulaires qu'on peut insérer à côté de l'échantillon inférieur.

Deux configurations du port-échantillon inférieur ont été conçues afin de faciliter son utilisation avec des multicouches lipidiques et des cultures cellulaires (figure A. c) ou avec des cultures cellulaires et électrochimie (figure A. d).

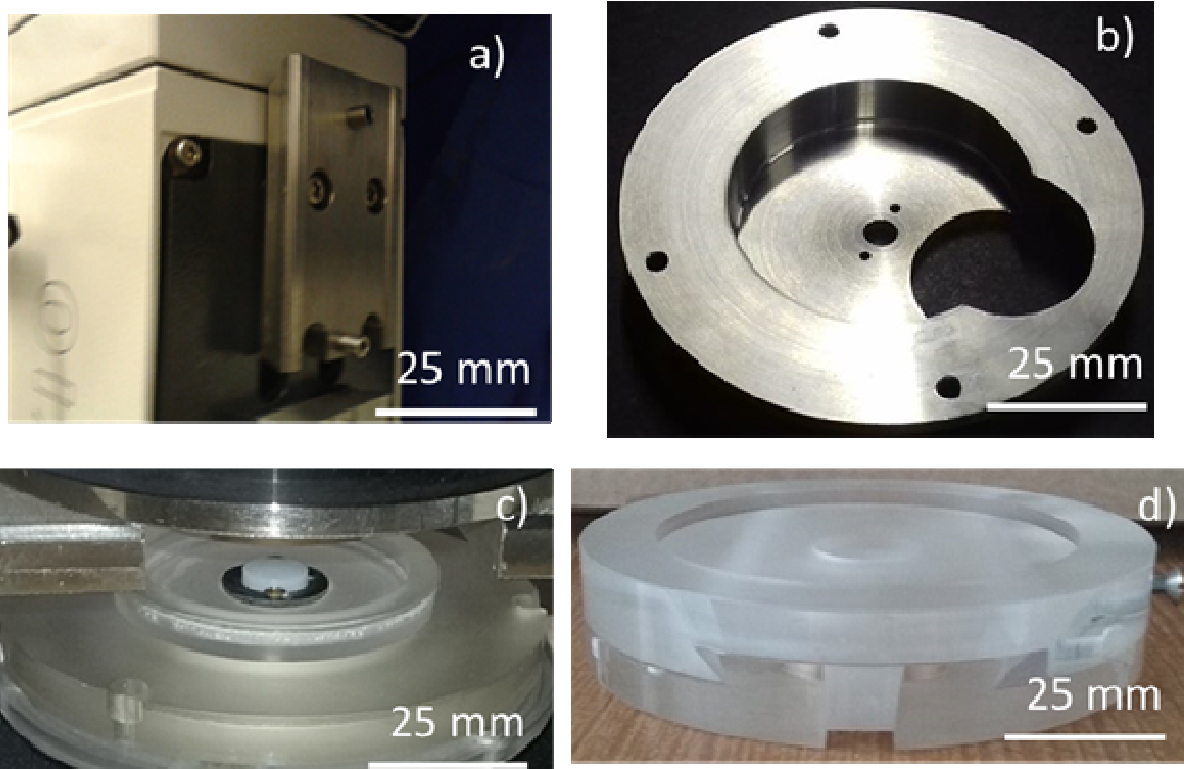


Figure A.4. Différentes photos des adaptations réalisées sur le bio-tribomètre (a) rehausse du pied du microscope conçu pour permettre l'insertion du bio-tribomètre sous le microscope Zeiss, (b) port échantillon supérieur conçu pour permettre la manipulation très facile des multicouches lipidiques (couplage conique fixé par un bon positionnement), (c) port échantillon supérieur conçu pour visualisation déportée (trace de frottement ou cultures cellulaires) – fixation par un queue d'aronde mieux adapté aux forts efforts de frottement que le système conique et conçu avec possibilité de fixation des électrodes pour l'électrochimie

Pour la mesure des forces normales et tangentielles nous avons choisi un capteur avec 3 axes à jauges de déformation monté sur des guidages à lames flexibles afin de pouvoir assurer des mesures à haute résolution (CAPTEUR DE FORCE 3 AXES MODELE K3D60 / $\pm 100\text{N}$ TESTWELL). Afin de détecter des variations de l'épaisseur du troisième corps au cours de frottement nous avons rajouté un capteur de position à courants de Foucault fixé au port-échantillon supérieur et mesurant les variations d'hauteur de l'échantillon inférieur.

Ce bio-tribomètre, peut fonctionner actuellement sous 3 régimes :

- 1) **Contrôle de la force normale.** Dans ce cas on impose la force normale par le déplacement de l'échantillon inférieur qui est fait à l'aide d'une table élévatrice NORELEM référence 21140-25 (course maximale ~ 20 mm) piloté actuellement avec un moteur pas à pas (RS Bipolaire, unipolaire Hybride, 125 Unipolar Ncm, 163 Bipolar Ncm 1.8, 8 Connector Pins fils) : déplacement en triangle, sinus et courbe prédéfinie par un nouage des points (reproduisant le cycle de la marche par exemple). Le pilotage de ce moteur se fait avec boucle d'asservissement pour le capteur de force (maintenance d'une force constante) et pilotage avec possibilité d'arrêt pour prise d'images confocal, pilotage « à la main » pour bien focaliser la zone d'intérêt et redémarrage avec la reprise de la position d'arrêt
- 2) **Contrôle de la position des échantillons (gap).** Ainsi la position précise de l'échantillon inférieur peut-être contrôlé pendant la manipulation à l'aide d'un actionneur piézoélectrique conçu pour la maintenance en position précise des miroirs optiques car il possède un contrôle boucle fermée par une jauge de position – (Platine d'élévation T-105-01 PZ 100 SG, TRIOPTICS France, Course $100\mu\text{m}$ Résolution $0,2\text{nm}$ Fréquence de résonance 660Hz , Charge max. 100N).
- 3) **Contrôle de la rhéologie du contact (rhéomètre avec sollicitation normale).** Cela peut être réalisé avec le même actionneur piézoélectrique que celui présenté au point antérieur, mais en découplant la boucle d'asservissement en position et en imposant des sollicitations dynamiques. Le fonctionnement en mode rhéomètre a été validé pour des sollicitations sinusoïdales ayant une fréquence entre 0.2 et 2 Hz et une amplitude comprise entre 5 et $20\mu\text{m}$

Le contrôle des conditions pour la culture cellulaire directement sur tribomètre a nécessité la disposition du dispositif dans la salle ISO5 LaMCoS et la mise en place d'une enceinte thermostat à 37°C et connecté à une arrivée de CO_2 (5%).

La figure A. montre une photo du dispositif complet monté sus microscope dans la salle ISO5 LaMCoS (thèse Amandine IMPEGRE – collaboration MATEIS) et une schéma du dispositif avec différents image de microscopie confocale (a droit – visualisation des structures lipidiques dans le contact frottant – thèses Ionut MATEI et Florence BLANCON, projet ANR BioLub ; à gauche – visualisation des cultures cellulaires à côté du contact frottant – macrophages thèse Amandine IMPEGRE et synoviocytes Samira FILALI, projets BQR INSA et Carnot TRPISME)

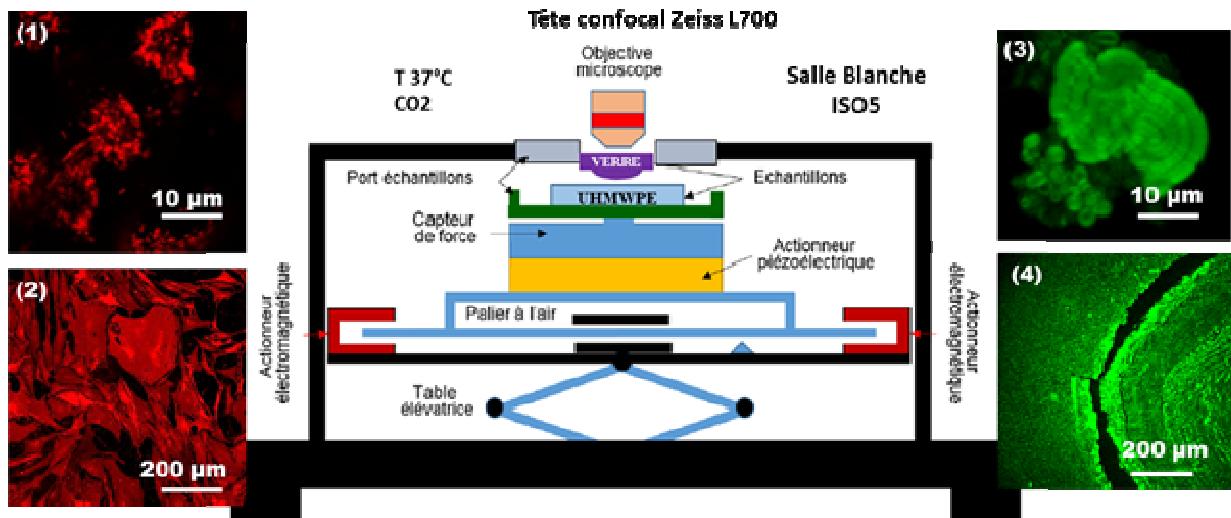
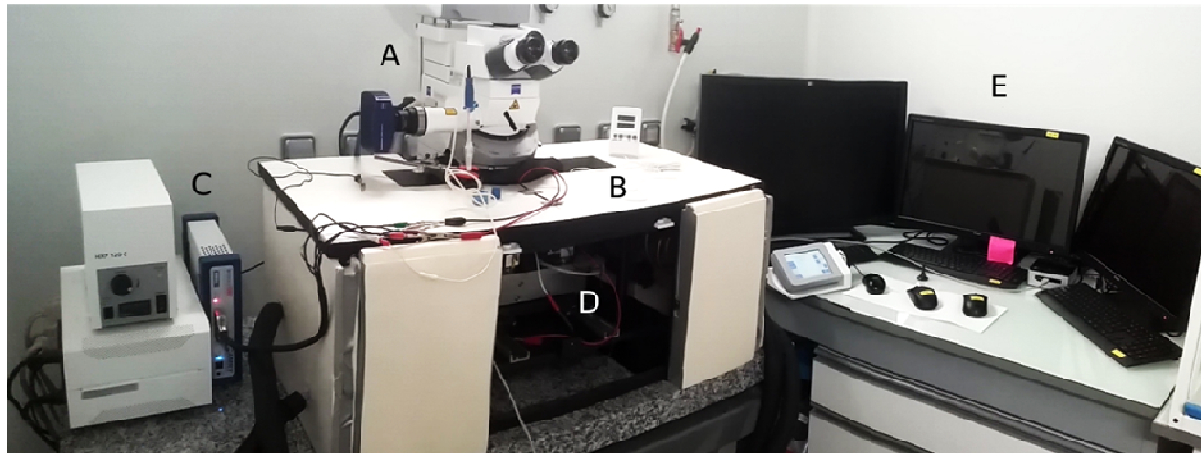


Fig. A.5 a) Photo de la configuration complète du bio-tribomètre dans la salle ISO5 LaMCoS : A = microscope a tête confocal, B = enceinte thermostatée et CO2, C = boîtier de contrôle pour la partie électrochimie, D = biotribomètre, E=poste de commande avec 3 PCs (1 pilotage et 2 acquisitions synchronisées). b) Schéma du tribomètre BIOLUB avec quelques exemples de visualisation *in situ* par microscopie confocale de fluorescence : (1) lignées cellulaire macrophagique Raw264.7 avec un marqueur de pH; (2) culture primaire des synoviocytes humaines avec un marqueur lipidique ; (3) visualisation des vésicules lubrifiantes a base des multicouche lipidiques; (4) visualisation de la dégradation des multicouches lipidiques lubrifiantes

Ce dispositif a été validé pour :

- 1) le frottement contact UHMWPE / CrCo des implants articulaires ou nos valeurs d'usure et du coefficient de frottement mesurés à sec sont réalistes par rapport à la bibliographie. D'autre part on a pu utiliser cette configuration pour optimiser les mécanismes de lubrification des implants articulaires (these Na Wang et Mirela Sava, résultats qui seront présentés dans le chapitre B)
- 2) les expérimentations rhéologiques sur des hydrogels mimant le cartilage articulaire (thèse Luciana Bostan et postdoc Bogdan Munteanu), résultats présentés dans le chapitre D
- 3) les expérimentations de bio-lubrification multicouches et vésicules lipidiques (thèse Ionut Matei, Florence Blanchon), résultats présentées dans le chapitre B et C.

A2.1.2. Bio-tribo-recteur

Ce dispositif unique a été conçu afin d'étudier la transmission des contraintes mécaniques aux cellules afin de stimuler leur synthèse tissulaire dans des études d'ingénierie tissulaire du cartilage. Il a pu être réalisé grâce au projet CNRS BioCart3D (collaboration IBCP Lyon) et à la collaboration avec l'industriel WRIGHT (thèse Amira Hannoun).

A2.1.2.1 Contexte bio-reacteur

Il est connu que la contrainte mécanique joue un rôle très important dans l'ingénierie tissulaire du cartilage et on peut conclure que les réponses cellulaires sont liées à sa durée, à sa fréquence et à son mode de transmission de l'échelle globale du mécanisme du bioréacteur à l'échelle locale de la cellule. Généralement, les recherches ont consisté à identifier comment les différents types des contraintes mécaniques globales imposées par différents types de bioréacteurs influencent la synthèse des chondrocytes polymère (Mauck RL 2000 ; Kisiday JD 2004 ; Lee DA 1997, 2000, Roberts SR 2001 ; Buschmann MD, 1995 ; Davisson T, 2003). La qualité de cette synthèse est identifiée principalement par des colorations spécifiques en histologie et des dosages biochimiques du collagène de type I (élément de résistance en traction mais uni axiale, non spécifique au cartilage), du collagène type II (élément de résistance en traction multiaxiale, spécifique au cartilage hyalin), des protéoglycannes (élément de hydratation et de résistance en compression mais non spécifique du cartilage hyalin) et les GAG ou les aggrécanes (élément de hydratation et de résistance en compression spécifiques du cartilage hyalin).

La plupart des bioréacteurs conçus pour obtenir du cartilage hyalin applique un seul type de stimulation mécanique (Barker MK1997, Mauck RL 2000) tels que la compression, la pression hydrostatique, le cisaillement ou l'étirement. Mais la charge mécanique perçue par le cartilage articulaire, *in vivo*, se compose d'une composante normale et une autre tangentielle. De plus, la différence de synthèse du cartilage dans ces bioréacteurs vient de la différence du niveau de force perçue par la cellule, car la manière de transmission des efforts du niveau commande bioréacteur (actuateurs) jusqu'au niveau cellulaire passe par les propriétés volumiques et surfaciques des biomatériaux support pour les cellules ainsi que par les conditions limite de fixation ou glissement de ces matériaux sous différents bioréacteurs.

Quelques études récentes présentes des systèmes qui sont capables de produire les deux contraintes normales et tangentielles (Frank EH 2000, Waldman SD 2003, Waldman SD 2007, Jin M 2001). Ainsi il a été montré que la composante tangentielle a une influence significative sur la synthèse des protéoglycannes (Frank EH 2000, Waldman SD 2007, Youssof et al. 2011). Malgré ces développements les résultats restent très dispersés car le niveau de sollicitation mécanique optimale vu par la cellule n'est pas estimé et il y a trop de variabilité en ce qui concerne le type de biomatériaux support pour les cellules, le flux de liquide nutritif et les conditions limites pour l'application des sollicitations.

A2.1.2.2 Conception bio-tribo-réacteur

Dans ce contexte, nous avons choisi de concevoir un nouveau bioréacteur à chargement bi-axial afin de contrôler plus les sollicitations mécaniques transmises aux cellules et pouvoir suivre *in situ* la formation du tissu.

Pour cela il a fallu faire plusieurs choix de conception :

1. Choix de la configuration du contact

Dans l'ingénierie tissulaire afin de garantir la reproductibilité biologique des expérimentations il est conseillé de faire plusieurs tests mécaniques en même temps (3 à 10 échantillons). Par

contre, d'un point de vue mécanique il est très difficile d'envisager plusieurs tests mécaniques en même temps sans altérer les conditions locales du contact (pressions vitesses relatives) car la manière d'effectuer la transmission mécanique d'un contact à l'autre peut induire des erreurs qui amplifient ou diminuent les conditions locales de contact de manière significative. Ainsi : mettre plusieurs contact mécaniques en série dans une sollicitation de cisaillement par translation linéaire ou rotation implique d'assurer une condition de planéité et parallélisme parfait des interfaces qui reste pendant la sollicitation mécanique. Afin de réaliser cette condition nous nous avons basé sur le modèle d'un rhéomètre plan / plan qui réalise des conditions de parallélisme avec résolution micrométrique. Pour cela, on a défini une configuration du contact de type disque en acier plan contre disque en verre (afin de permettre la visualisation en microscopie optique du contact). On a choisi un diamètre des deux disques de 50mm en diamètre afin de pouvoir se comparer ces mesures avec celles rhéologiques faites dans les mêmes conditions, ce qui servira de validation aussi pour la partie mesures mécaniques. Afin de stabiliser mécaniquement le contact on a choisi de travailler avec 3 échantillons positionnés à 20mm du centre du plateau en acier et une distance angulaire égale entre eux, équivalente à 120° . Afin de garantir un bon positionnement des échantillons sur le plateau en acier on a prévu sur la surface du plateau 3 emplacement pour positionner les échantillons (diamètre de 5mm, profondeur de 0.5 mm). Dans la configuration choisie il est également possible de travailler avec 6 échantillons (dans ce cas distance angulaire entre échantillons équivalente à 60°). Afin de garantir l'immersion totale des échantillons dans le milieu de culture on a prévu le plateau inférieur plus large avec une paroi de 5 mm d'épaisseur afin de former un bac pour contenir le milieu de culture. Afin de favoriser la visualisation des cellules au cours des sollicitations tribologiques nous avons choisi un plateau supérieur transparent en polyméthacrylate de méthyle (PMMA), qui est un thermoplastique transparent, résistant, stérilisable, facile à usiner et compatible avec les cultures cellulaires.

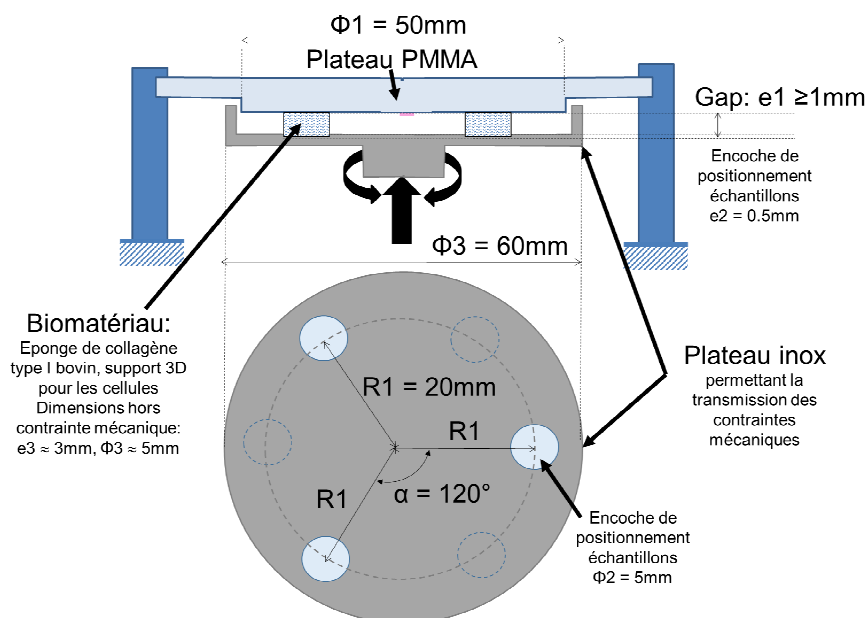


Fig. A6. A. Schéma de définition de la configuration du contact pour le nouveau bioréacteur à sollicitations bi-axiales

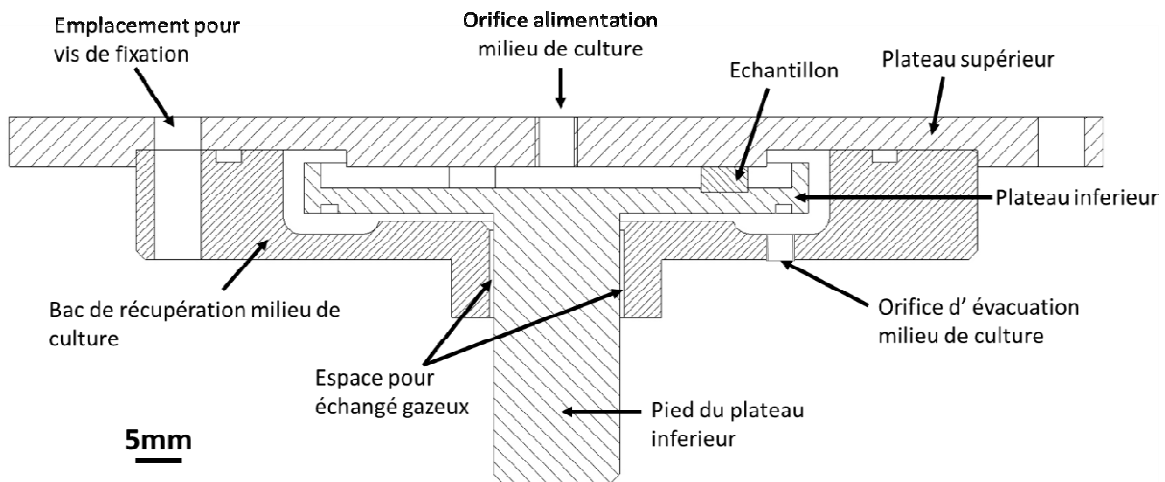


Fig. A6. B. Dessin technique de la configuration du contact pour le nouveau bioréacteur à sollicitations biaxiales

2. Choix d'actionneurs pour le chargement dynamique biaxial

Parmi plusieurs types d'actionneurs étudiés nous avons choisi des actionneurs piézoélectriques amplifiés. Ce type d'actionneurs utilise un amplificateur mécanique pour pré-charger l'empilement des composants piézoélectriques multicouches et pour amplifier mécaniquement le déplacement. Cela permet de conserver une raideur importante pour le système et donc d'augmenter les efforts qu'il est possible de générer. Dans le cadre d'applications dynamiques, la précontrainte permet de conserver l'intégrité de la céramique, même en traction. Une autre conséquence du précontraint est la possibilité d'obtenir des interfaces mécaniques, telles que des trous filetés, différentes des surfaces planes à coller. C'est le cas des « Amplified Piezo Actuators » (APA) (figure A7) qui utilisent la forme elliptique d'une coque pour la précontrainte de la céramique, mais aussi amplifier les déplacements suivants le petit axe de l'ellipse. [10]

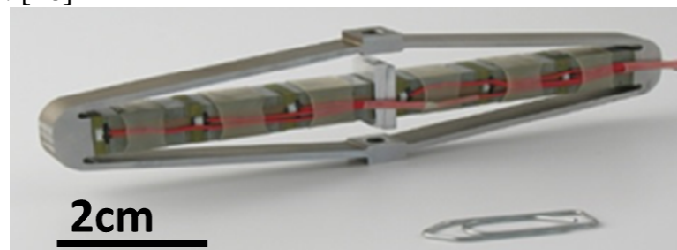


Figure A7: Actionneur piézoélectrique amplifié

Nous avons choisi ce type d'actionneurs APA pour l'effort normal, et pour l'effort tangentiel. Dans le cas du déplacement tangentiel, pour transformer son déplacement linéaire en mouvement de rotation, il a fallu trouver un système de guidage flexible en rotation et un système de liaison pour connecter les deux piézoélectriques.

Le pivot flexible choisi pour le bioréacteur est un palier de flexion, qui utilise des ressorts plats, internes, croisés, encapsulés dans un logement cylindrique pour fournir une rotation précise à faible hystérésis et éviter les pertes par frottement (FigureA8a). Ce palier offre une durée de vie indéfinie lorsqu'il est utilisé dans les conditions nominales de charge et de rotation. La rotation des segments de la douille du palier est facilitée par la flexion des ressorts plats sur lesquels les segments s'appuient.

La liaison de translation verticale choisie a été l'utilisation une liaison élastique (tige) comme le montre la figure A8b.

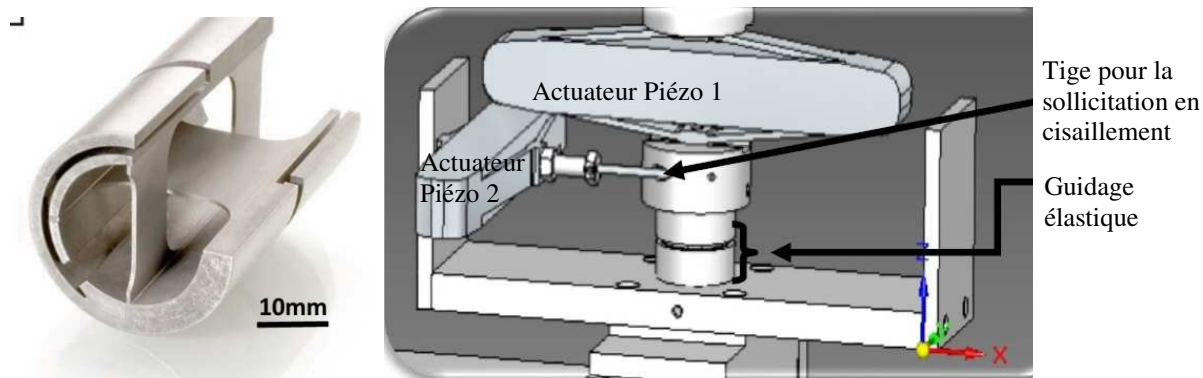


Figure A8 : a) Guidage en rotation choisi : C-Flex de bearing CO., INC, USA, (b) montage des deux actuateurs piezo sous bio-reacteur

3. Choix du contrôle de la synthèse tissulaire

Afin d'avoir un suivi en temps réel des modifications des échantillons au cours de la culture cellulaire nous avons choisi :

- de rajouter un capteur piézoélectrique bicomposante Kistler Type 9345B ayant une sensibilité "en place" de 0,001N pour la mesure d'effort normal et 0,001 N.m pour la mesure de couple. Cela nous a permis, à travers des modèles rhéologiques de mesurer la variation des propriétés viscoélastiques des échantillons au cours de la culture
- de rajouter un marqueur fluorescent aux cellules afin de pouvoir les visualiser en temps réel avec le microscope confocal à fluorescence du LaMCoS (Zeiss LMS 700)

Les mesures rhéologiques ont été calibrées en utilisant des hydrogels type HEMA (ayant un comportement principalement élastique, figure A9a) et du miel (ayant un comportement complètement visqueux, figure A9b). Le suivi des cellules par microscopie confocale a été aussi calibré en utilisant des billes fluorescentes en polystyrène de 5 μm et 0,2 μm de diamètre incluse dans un gel d'agarose (biomatériaux de référence pour l'inclusion des cellules). La figure A10 montre les images successives (chaque colonne représente un « steak » de 10 images prise dans l'épaisseur du gel d'agarose) du déplacement d'une bille de 0.2 μm pendant une sollicitation dynamique d'une amplitude de 200 μm . Comme la bille bouge en même temps que l'image est prise, il a fallu faire un compromis entre le temps de capture d'image (qualité d'image) et celui de la sollicitation mécanique (travailler dans une dynamique lente) afin de suivre le déplacement sinusoïdal de la bille. Cela permet de mesurer le déplacement réel de la bille à seulement 150 μm . Ainsi, grâce à une bonne synchronisation capture image / sollicitation on peut déterminer les champs de sollicitation réelles des cellules pendant l'expérimentation.

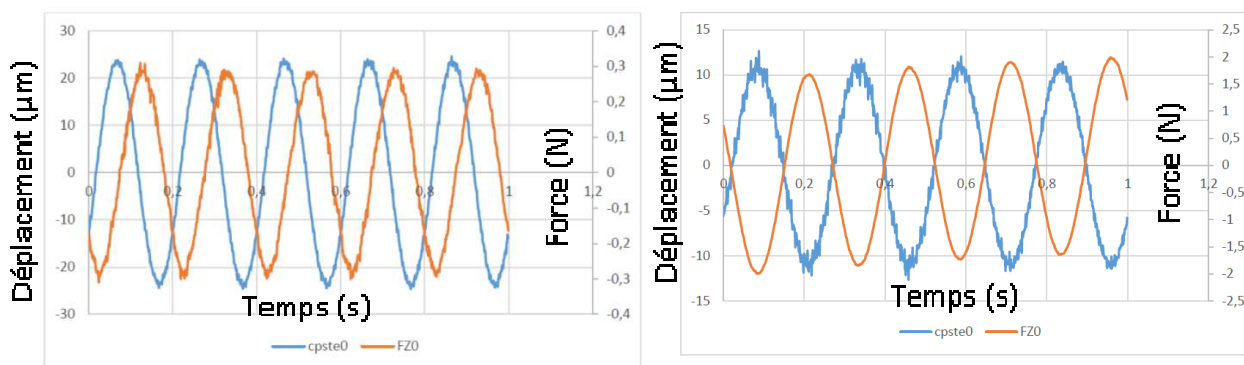


Fig. A9 Courbes rhéologiques déplacement et force en fonction du temps obtenues pour le calibrage avec miel (figure de gauche) et hydrogel HEMA (figure droite). Pour le miel la viscosité mesurée est similaire à celle obtenu en utilisant le rhéomètre commercial ARES du LaMCoS ($\eta = 1,2 \pm 0,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$). Module élastique du hydrogel similaire que celui donnée par le rhéomètre commercial ARES du LaMCoS ($G' = 2,2 \pm 0,3 \text{ MPa}$)

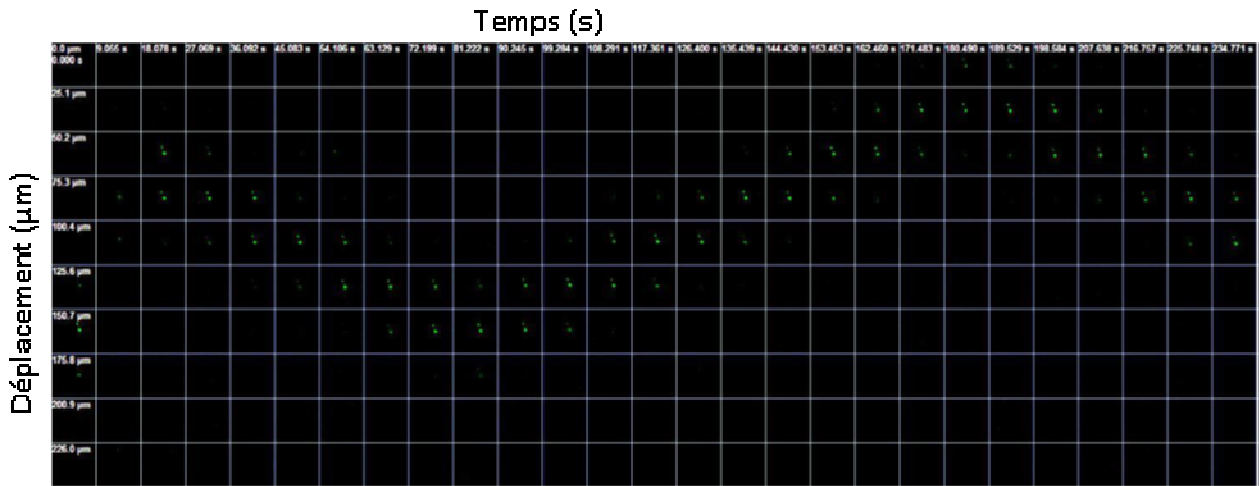


Fig. A.10. Suivi au microscope confocal d'une bille fluorescence de $0,2\mu\text{m}$ en diamètre incluse dans le hydrogel HEMA et pendant des manip rheologiques sous bio-tribo-reacteur. Amplitude du déplacement global imposé = $200\mu\text{m}$, amplitude du mouvement de la bille mesuré à l'aide du traitement d'images confocal = $150\mu\text{m}$

La figure A11 montre un vu d'ensemble du bio-tribo-reacteur (dessin technique + schéma de principe)

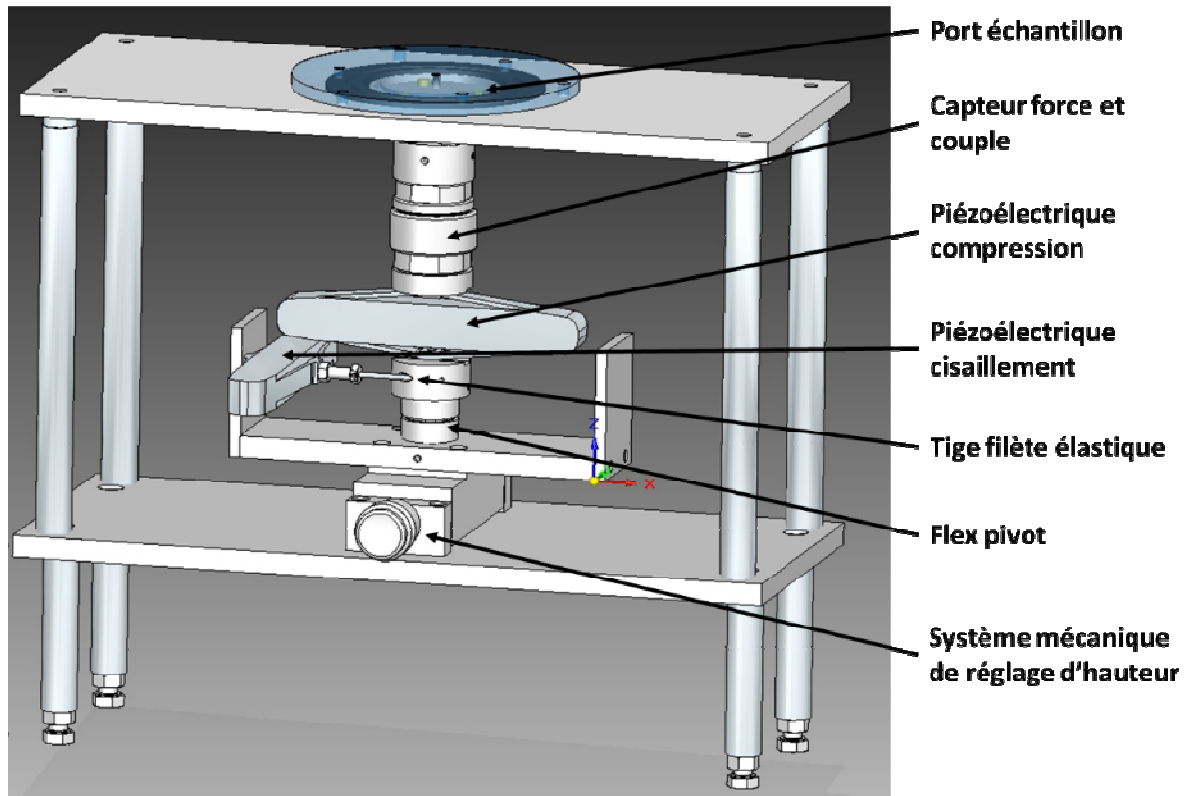


Figure A 11. A. Dessin technique du bioréacteur

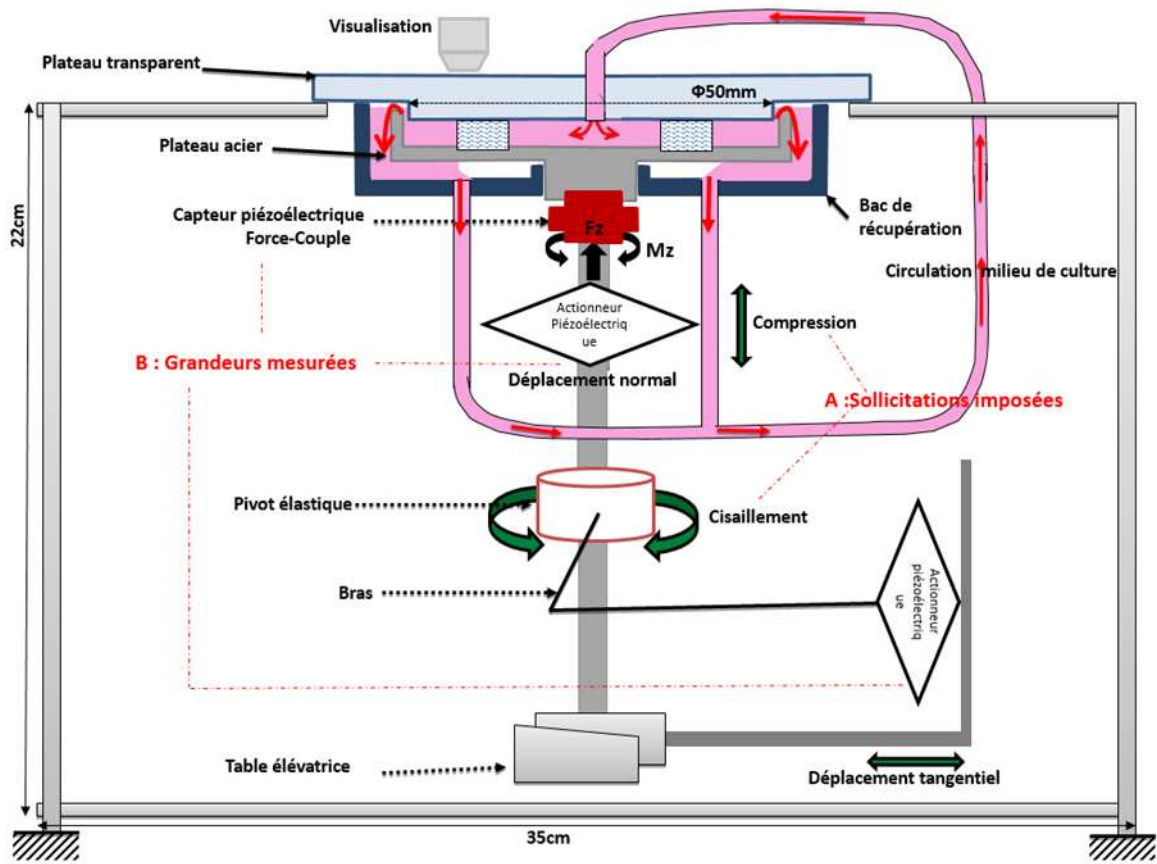


Figure A 11. B Schéma du principe du bioréacteur

A2.1.3. Développement du tribomètre PeDeBa pour des essais tribologiques en conditions de simulateur de genou

Grace au projet Carnot TROPISME et à la collaboration avec l'industriel nous avons pu développer le simulateur tribologique PeDeBa du LaMCoS afin de le mettre dans la configuration simulateur du genou (thèse Mirela SAVA).

Le tribomètre PeDeBa LaMCoS est un simulateur de frottement de grande rigidité pour l'étude du frottement en mouvement alternatif asservi en déplacement avec différentes possibilités de cinématique. Il permet des mesures tridimensionnelles de force et de variations d'épaisseur du contact en roulement, glissement... Asservissement vertical en force ou en déplacement.

- Charge : 50 à 1500N
- Fréquence : 0,01mHz à 150Hz
- Débattement : $\pm 2\mu\text{m}$ à $\pm 50\text{mm}$
- Température : -160 à 120°C

Géométrie du contact : plan/plan, sphère/plan, galet/plan, montages spécifiques

Afin de le transformer en simulateur de genou il a fallu l'adapter à 3 niveaux :

- Adaptation des ports échantillons afin de pouvoir insérer une prothèse unicompartmentale de genou (figure A11)
- Pilotage du mouvement vertical afin de reproduire la variation de la force normale correspond au cycle de marche (contrôle du pilotage des servo-valves du système hydraulique PeDeBa par une boucle d'asservissement avec le capteur de force Kistler),
- Adaptations mécaniques et pilotage d'un moteur pas à pas pour simuler le mouvement de roulement du genou,
- Adaptations mécaniques et physicochimiques afin de réaliser une circulation du lubrifiant biomimétique (bac, pompe péristaltique et système de chauffage à 37°C).

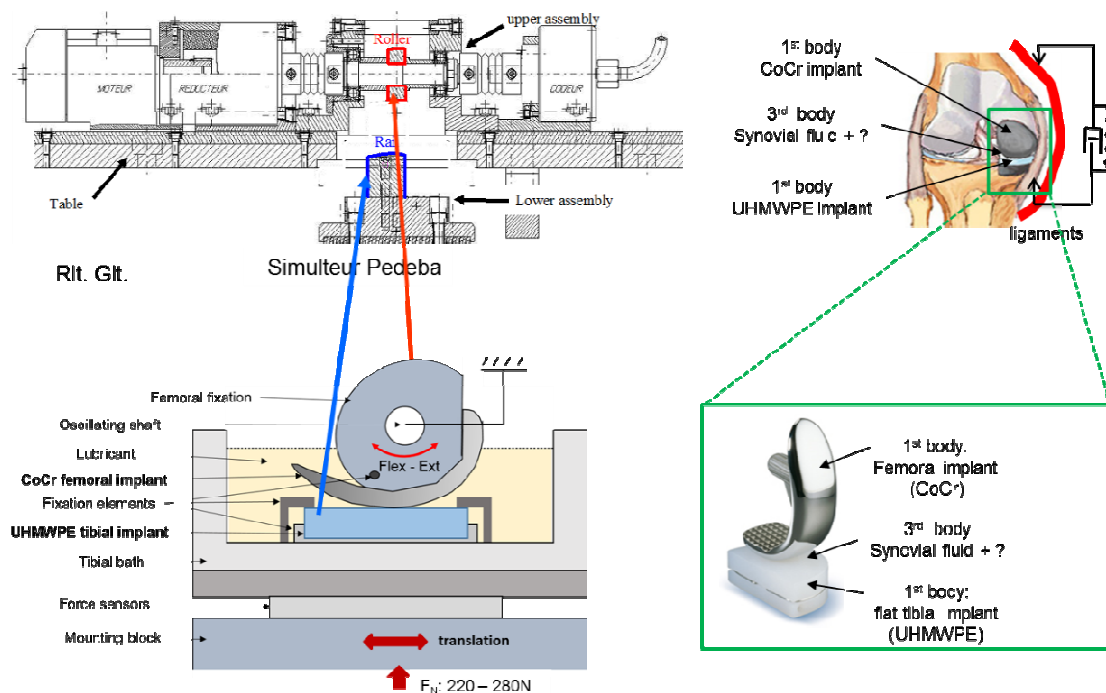


Fig.A11. Schéma adaptations du simulateur tribologique PeDeBa LaMCoS dans la configuration de simulateur du genou

A2.2. Développement d'une méthodologie permettant les couplages mécanique, physicochimie, biochimie, biologie

Tous ces moyens expérimentaux ont été mis en place pour étudier avec une grande résolution la réponse biologique des contacts vivants aux sollicitations mécaniques et physicochimiques. Par contre, la garantie de la réussite de ces expérimentations dépend essentiellement de l'étape préliminaire de récupération des prélèvements dans la salle opératoire dans des conditions qui garantissent l'éthique et une meilleure conservation des marqueurs biologiques nécessaires à une détection précoce des pathologies. Un protocole a été défini pour cette étape en collaboration avec le service de Rhumatologie de l'hôpital Edouard Herriot, le service de Chirurgie Orthopédique de l'hôpital de la Croix-Rousse Lyon (projet région Bio-tribo-minéralopathologies). Ce protocole donne les durées et les conditions spéciales de conservations et de manipulation pour pouvoir coupler les analyses ultérieures :

- biochimiques (lipidomique),
- physicochimiques (différents techniques de microscopie électronique)
- nano-mécaniques (différents techniques de microscopie à force atomique)
- rhéologiques et bio-tribologiques

L'originalité de ce couplage est d'identifier des molécules biochimiques, spécifiques aux différents pathologies, dans les prélèvements, de les marquer par des fluorescences spécifiques (utilisation de techniques de type immunomarquages) et de suivre leurs évolutions au cours des expérimentations nano-mécaniques, rhéologiques et/ou tribologiques. De plus, l'adaptation des techniques nano-physiques telles que le transfert de fluorescence (FRET) ou de suivi de la diffusion de la fluorescence (FRAP ou FRAPP) permette de caractériser l'évolution des films lubrifiants d'épaisseurs nanométriques piégées entre des surfaces nano-poroélastiques et développer différentes théories de lubrification.

La figure A12 schématise la méthodologie des analyses mécaniques et physicochimiques à grande résolution (rhéologiques / nano-mécaniques couplées à la suivi des marquages fluorescents) afin de caractériser :

- différents types des liquides synoviaux pathologiques dont les membranes des vésicules lipidiques sont marquées avec une fluorescence spécifique,
- des tissu cartilagineux sains et/ou pathologiques ou des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire, dont ou les cellules sont marquées avec des marqueurs de fluorescences spécifiques ou un marqueur fluorescent non spécifique peut être diffusé dans la matrice extracellulaire. Des fluorescences dans les longueurs d'ordre différent peuvent être employé afin de pouvoir réaliser en même temps le suivie des déformées / déplacements de cellules et la diffusion dans la matrice extracellulaire (champ des vitesses). La seule limitation actuelle est la vitesse d'acquisition des images de fluorescence qui a été nettement améliorée par l'acquisition d'une tête confocale, mais pas assez pour permettre la visualisation en temps réel des essais à plus de 2Hz. Cela pourrait être limitant pour des manips plus rhéologiques, mais, ne l'ai pas pour des manips biomimétiques tribologiques (la fréquence de sollicitation du genou dans la marche normale étant de 0 à 2Hz)

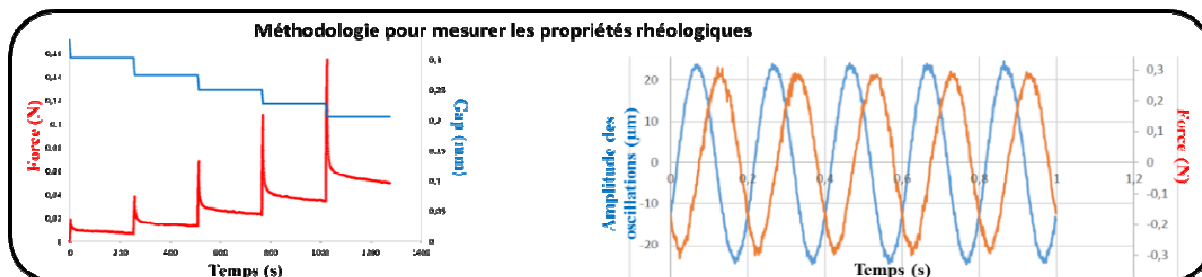
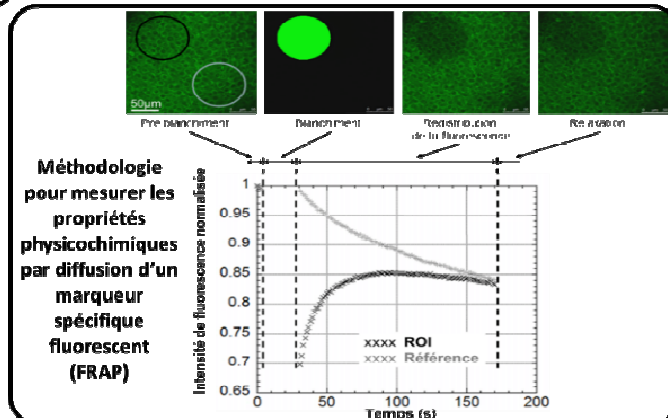
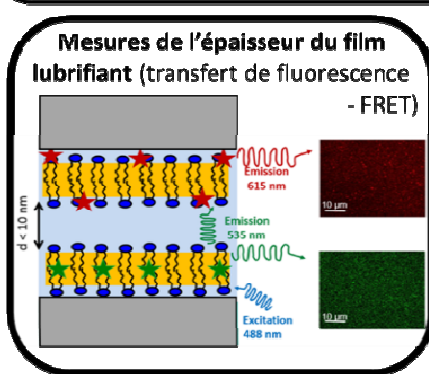
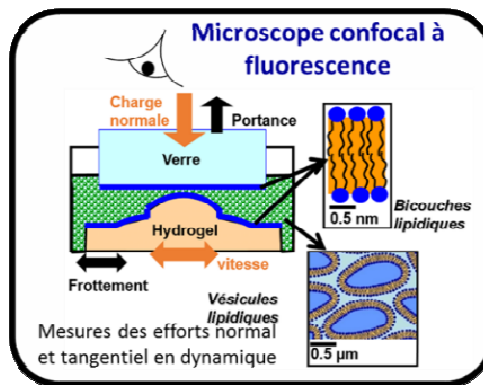
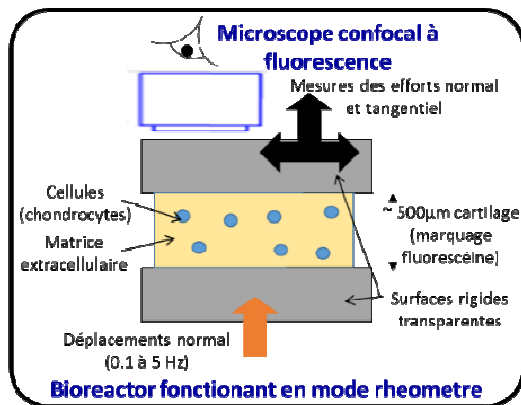


Fig.A12. Schéma de la méthodologie mise en place pour coupler les analyses mécaniques et physicochimiques à grande résolution (rhéologiques / nano-mécaniques / tribologie couplées à la diffusion ou au transfert de fluorescence) utilisant des marqueurs biochimiques fluorescents

Chapitre B.

Complexes de surface du cartilage articulaire – caractérisation et rôle dans la biolubrification

De nombreuses études expérimentales et théoriques ont tenté d'améliorer la compréhension des mécanismes de lubrification des articulations à travers l'identification des composants moléculaires du liquide synovial capable de s'adsorber sur la surface du cartilage pour la protéger contre l'usure en jouant le rôle de lubrifiant limite [McCutchen1962, Schmidt2007]. Comme il n'y a jamais un seul composant moléculaire, mais une structure protectrice composée de plusieurs composants appelée dans ce manuscrit « complexe de surface ».

Ainsi, deux candidats jouent un rôle majeur en tant que complexes de surface pour favoriser la biolubrification du cartilage articulaire: la "surface active protéine" (SAP) [Swann DA 1977, Jay GD2001, Mavraki A. 2009, Murukami, T 1990] et les "surface actives phospholipides" (SAPL) [Hills BA 1984, Hills BA 1987]. Ces termes sont généralement utilisés pour expliquer les très faibles coefficients de frottement obtenus lors de différentes expérimentations de biolubrification avec ces molécules.

De plus, ces termes sont souvent regroupés dans un autre terme appelée "lubricin", défini à l'origine comme un mélange de protéines extraites de la surface du cartilage et capables de maintenir un très faible coefficient de frottement [Swann DA 1977, Jay GD2001, Schwann, 1976]. Initialement, la caractérisation chimique de ce mélange a montré qu'il contenait des molécules de type glycoprotéine, également appelées SZP ou protéoglycane 4 (PRG4), une glycoprotéine de type mucine avec une affinité forte pour les surfaces des cartilage [Young A.A2006, Jay GD2004]. Ensuite, les progrès des techniques d'analyse chimique ont montré que ce mélange n'est pas seulement protéique mais qu'il contient également une quantité importante de SAPL non détectées avec les techniques plus anciennes en raison de leur faible poids moléculaire. Les recherches en microscopie électronique de transmission de Hills et al. [Schwarz IM1998] ont montré que les échantillons de liquide synovial contenaient des molécules de phospholipides tensioactifs (SAPL), tandis qu'une analyse biochimique a montré que la phosphatidylcholine (41%), la phosphatidyléthanolamine (27%) et la sphingomyéline (32%) étaient les composants principaux de la couche lipidique sur la surface normale du cartilage [Sarma AV2001].

En effet, même si la concentration de phospholipides dans le volume de lubrifiant synovial est faible (0.1-0.3 mg/ml dans le cas sain) comparée à celle d'autres composants (hyaluronane environ 3mg/ml et protéines sériques environ 20mg/ml), il convient de garder à l'esprit que les phospholipides sont des structures amphiphiles avec une concentration critique micellaire (CMC) très basse (par exemple, 90 nM ou 56 µg / ml pour DLPC [19]), nécessitant donc une très faible concentration pour former des structures d'interface telles que:

- vésicules, dans le volume de lubrifiant, comme celles identifiées dans le liquide synovial de souris [Watanabe M 2000];
- multicouches lipidiques, à l'interface avec la surface du cartilage articulaire [Hills BA1989], comme décrit ci-dessous.

Une simple estimation prenant en compte la concentration en phospholipides du liquide synovial entre 0,1 et 0,3 mg / ml environ [Sarma AV2001, Hills BA1989] et la surface du cartilage articulaire du genou ~ 121 cm² [Gleghorn JP 2007, Levick JR1983] montre que la concentration en phospholipides est environ 13 fois supérieure à celle nécessaire pour couvrir toute la surface articulaire avec 1 bicouche lipidique, on déduit que l'interface liquide synovial / cartilage contient une grande quantité de multicouches lipidiques. L'existence de

ces multicouches «plates» sur la surface du cartilage articulaire a été confirmée par Hills et al. En 2002 en microscopie électronique à transmission et montré qu'elles étaient formées de 3 à 7 couches de bicouches lipidiques séparées les unes des autres par des couches de solution saline physiologique [Hills BA 1989, voir fig. 5 dans la réf. Hills BA 2002].

Alors que les discussions actives entre les communautés qui considèrent que les protéines et / ou les lipides sont importantes dans la biolubrification sont toujours d'actualité, nous nous sommes fixés six objectifs pour comprendre le mécanisme d'action des SAPL au cours de la bio-lubrification des articulations synoviales.

1. Un **premier objectif de ce chapitre à étudier l'interaction entre les SAPL et différents protéines du liquide synovial afin de définir leurs rôles couplés ou non dans la lubrification des articulations synoviales** (thèse Dragos Mirea 2011)
2. Un deuxième objectif nous nous sommes intéressés à comprendre **comment les paramètres physicochimiques des empilements type multicouches lipidiques peuvent modifier leurs performances tribologiques** (thèse Magdalena Corneci 2012)
3. Un troisième objectif nous sommes intéressés à comprendre **comment la composition biochimique des multicouches lipidiques influence leurs propriétés lubrifiantes et comment cette composition peut être un marqueur des pathologies** (these Ionut Matei 2012)
4. Un quatrième objectif nous sommes intéressés à comprendre **comment on peut améliorer les propriétés lubrifiantes des multicouches lipidiques en injectant des molécules thérapeutiques favorisant la lubrification des multicouches lipidiques** (projet Bancusi avec la Roumanie 2016-2018)
5. Un cinquième objectif nous sommes intéressés à vérifier si **le système type multicouche lipidique est actif sur des surfaces rugueuses mimant l'usure des cartilages ou les surfaces des implants** (these Florence Blanchon 2016)
6. Un sixième objectif nous sommes intéressés à comprendre comment on peut **optimiser les surfaces flottantes des implants en augmentant leur affinité pour les multicouches phospholipidiques** (these Na Wang 2013)

B.1. Etude de l'interaction entre les SAPL et les différentes protéines du liquide synovial afin de définir leurs rôles couplés ou non dans la lubrification des articulations synoviales

Comme montrés dans plusieurs travaux [Schonherr H 2004 ; Bayerl TM 1990; Richter PR 2006] les bicouches SAPL se forment spontanément par éclatement des vésicules sur des surfaces hydrophiles en présence d'ions de Ca^{++} . Dans notre étude nous avons utilisé des hydrogels biomimétiques pour le cartilage [HEMA, Bostan L. 2011] ainsi que des verres en pyrex nettoyés à la soude alcoolique et rincé abondamment avec de l'eau pure comme substrat pour les SAPL. Pour faciliter le travail à température ambiante nous avons travaillé avec des bicouches lipidiques en phase liquide (température de transition thermique inférieure à 10°C) de type : DLPC, POPC et DOPC. Nous avons obtenu de résultats semblables pour tous ces lipides, par contre nous avons enregistré des différences dans la qualité de la bicouche lipidique (présence des trous, îlots) en fonction de la méthode du dépôt. Dans ce document on se concentre seulement sur les bicouches obtenues par éclatement des vésicules car c'est cette méthode qui apparaît la plus reproductible avec un minimum de défauts dans notre cas. Des détails sur les différentes techniques et défaut sont présentés dans les thèses de doctorant de Dragos Alexandru MIREA 2011 et Magdalena Carla CORNECI 2012.

Pour la mesurer les forces d'interaction entre les bicouches SAPL et différents composant du liquide synovial nous avons utilisé la spectroscopie des forces atomiques. Elle consiste à mesurer les forces au cours d'une expérience de compression / décompression d'une bicouche

SAPL a l'aide d'une pointe nanométrique supportée par un levier flexible a raideur calibré afin de être dans la gamme de forces mesurables. Ainsi nous avons utilisé les points AFM de type « Vshaped silicon nitride tips, NP (Veeco) » avec une constante élastique $K = 0.06\text{--}0.12\text{N/m}$. Ces pointes ont été fonctionnalisées chimiquement afin de pouvoir liées des molécules protéiques ou d'acide hyaluronique. Plus de détails sur la méthodologie figurent dans la thèse d'Alexandru Dragos MIREA [Mirea AD 2011].

Les principaux résultats (figure B.1) montrent que les grosses molécules glucidiques de type acide hyaluronique, mucine III et protéoglycan 4 présentent plus d'affinité pour les couches lipidiques (plus de pourcentage d'adhésion et une force d'adhésion significativement plus grande)

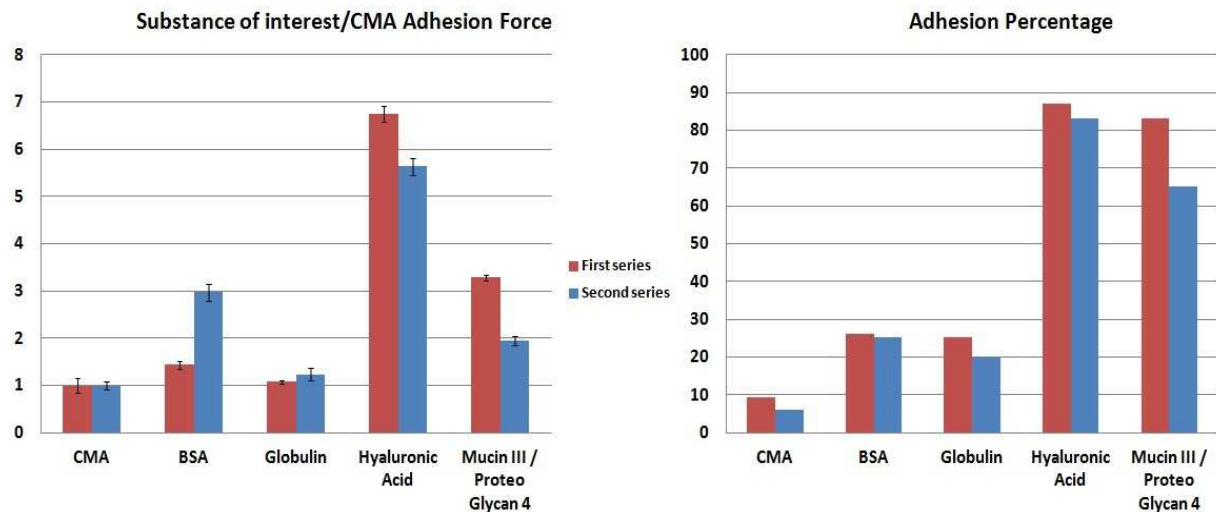


Figure B.1. Résultats des mesures de forces d'adhésion (en nN – figure de gauche) et du pourcentage d'adhésion (en % - figure de droite) des bicouches lipidiques en contact avec différents macromolécules du liquide synovial

Afin d'étudier comment cette adhésion influence les propriétés tribologiques des couches lipidiques des expériences bio-tribologiques ont été effectuées (Master M2 Mirela Maria SAVA 2015). Ainsi, les propriétés tribologiques (coefficient de frottement, usure) dès l'empilement bicouches lipidiques format l'interface tribologique d'un contact modèle d'une articulation synoviale [figure B.2. – adapté de la référence Trunfio-Sfarghiu 2008] ont été mesurés à l'aide du bio-tribomètre, présenté dans le chapitre A, et en présences des différents composants moléculaires du liquide synovial : acide hyaluronique, albumine, gammaglobuline, mucine. Ces composants moléculaires ont été rajoutés dans le lubrifiant (troisième corps de la figure B.2) qui en état référence est composé tampon TRIS, 150mM NaCl, pH 7.4. Ainsi les 4 composants moléculaires du liquide synovial ont été rajouté dans cette référence à des concentrations physiologiques (3mg/ml acide hyaluronique, 18 mg/ml albumine, 2mg/ml gammaglobuline, 0.2 mg/ml mucine) et à des concentrations massique ou molaires égales (1mg/ml et $2\mu\text{M}$).

Les résultats de ces expériences tribologiques (coefficient de frottement et usure des couches phospholipidiques) ont été interprétés grâce aux expériences complémentaires en diffusion FRAPP (collaboration M. Bernard Tinland, CINAM Marseille) pour identifier plus précisément le site d'accommodations des vitesses à l'intérieur d'une bicouche lipidiques (feuille distal – en contact avec la solution des macromolécules ou feuille proximal en contact avec le substrat).

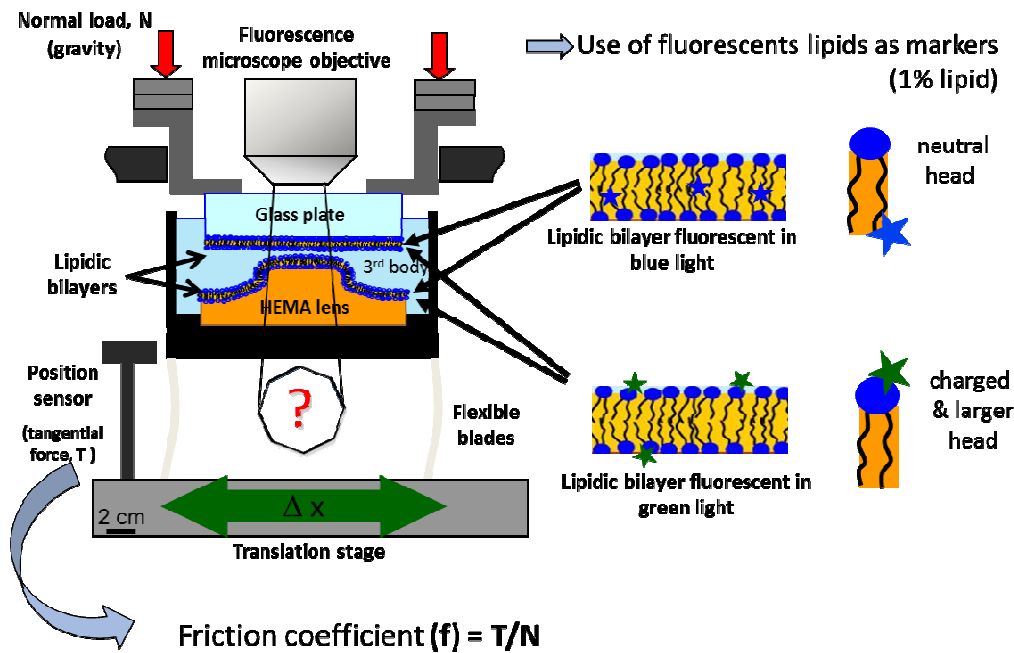


Fig. B.2. Schéma du contact modèle pour l'articulation synoviale utilisé pour l'étude des propriétés tribologiques (coefficient de frottement et dégradation des bicouches lipidiques) en présence des différents lubrifiants (3eme corps). Un hydrogel HEMA sous forme de lentille convexe reproduit les propriétés mécanique et physico-chimique du cartilage articulaire, tandis que les interfaces lipidiques sont reproduites par deux bicouches lipidiques déposées une sur la lentille HEMA et sur la contre face en verre permettant la visualisation du contact en microscopie de fluorescence. La référence pour le lubrifiant est une solution tampon avec 150mM NaCl et pH 7.4 qui crée une couche aqueuse piégée entre les deux bicouches lipidique du contact model articulaire. (Référence thèse de doctorat Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu 2006)

Les résultats (figure B.3) montrent que :

- les meilleures propriétés lubrifiantes (très faible frottement sans usure) sont obtenues quand le glissement se localise dans la couche aqueuse du lubrifiant référence piégée entre deux bicouches lipidique. Si on introduit d'autres molécules biologiques (protéines ou polysaccharides) dans cette couche aqueuse le coefficient de frottement augmente de 2 à 100 fois avec l'usure du contact,

- concernant l'ajout des protéines nous avons mis en évidence que les protéines de petite taille (50-150 kDa) passent à travers la bicouche lipidique et se fixent entre le feuillet proximal de la bicouche et le substrat entraînant des défauts. Dans le cas des protéines non adhésives (globulin) ces défauts entraînent le décollement total de la bicouche avec la formation des rouleaux éjectés hors contact lors du frottement. Dans le cas des petites protéines un peu plus adhésives (Albumin BSA) les défauts sont moins visibles et l'usure moins évidente,

- concernant l'ajout des macromolécules type polysaccharides (acide hyaluronique, mucine) on constate que ces molécules ne traversent pas la bicouche lipidique, mais qu'elles restent collées sur le feuillet distal, ce qui entraîne une augmentation du frottement et de l'usure. Cette augmentation est dépendante des charges électriques et des poids moléculaires des polysaccharides solubilisés dans la couche aqueuse frottant entre les deux bicouches lipidiques. Ainsi, les grosses macromolécules de type acide hyaluronique (~4000 kDa) créent des ponts de liaisons entre les deux bicouches ce qui entraîne une forte usure du contact. Les plus petites molécules de mucine (~400 kDa) se collent sur les bicouches lipidique générant des rugosités qui produisent l'arrachement local des bicouches avec leur étalement dans le contact par le frottement ce qui génère une usure plus faible.

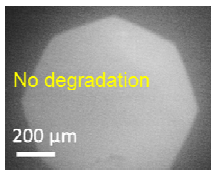
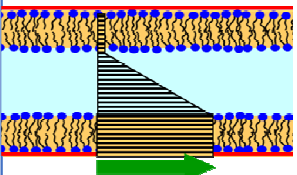
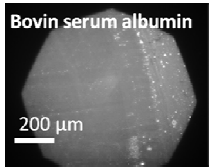
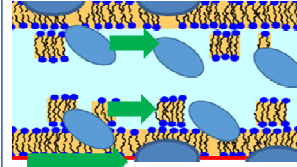
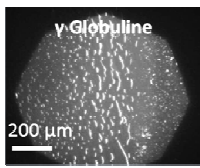
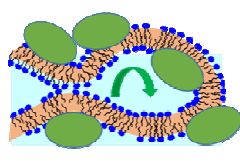
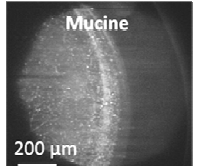

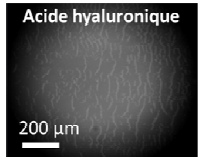
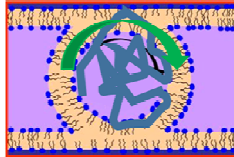
Molécules	Friction coef.	Diffusion $\times 10^{-8}$ (cm ² /s)	Degradation of phospholipids bilayer	Velocity accommodation mechanism
Without	0,006 ± 8,4E-4	$D_p = D_d = 11 \pm 0.4$		
Albumin	0,053 ± 0,002	$D_d = 7.2 \pm 0.3$ $D_p = 0.9 \pm 0.04$		
γ globuline	0,15 ± 0,015	$D_d = 7.7 \pm 0.3$ $D_p = 1.7 \pm 0.04$		
Mucine	0,035 ± 0,002	$D_d = 0.8 \pm 0.03$ $D_p = 3.8 \pm 0.3$		
Hyaluronic acid (HA)	0,065 ± 0,010	$D_d = 0.7 \pm 0.03$ $D_p = 3.1 \pm 0.1$		

Figure B.3. Tableau des valeurs du coefficient de frottement (deuxième colonne) mesuré à l'aide du bio-tribomètre et dans la configuration d'un contact model artulaire (fig.B.2) et en présence des concentrations physiologiques des molécules biologiques (colonne 1). Colonne 3 –valeurs du coefficient de diffusion des molécules lipidiques à l'intérieur de la monocouche située à proximité du substrat (D_p) et de la monocouche lipidique située plus distal de substrat (D_d). Colonne 4 – image de microscopie de epifluorescence du contact frottant montrant dans l'octogone du diaphragme du microscope une couche lipidique intacte (fluorescence uniforme) – ligne 1 et pour les autres lignes on observe des dégradations situées plutôt à l'intérieur du contact frottant (ligne 4) ou plutôt à l'extérieur du contact (ligne 2) ou concernant tout le contact intérieur et extérieur (lignes 3 et 5). Colonne 5 schémas des mécanismes d'accommodations des vitesses issus des analyses des mesures colonne 2, 3 et 4

Par conséquent, pour que les bicouches lipidiques puissent minimiser le frottement et l'usure (avoir un vrai rôle du lubrifiant limite) il faudra qu'elles ne piègent pas d'autres composants moléculaires et que l'accommodation des vitesses se passe principalement dans une couche aqueuse piégée entre deux bicouches lipidiques (figure B.4).

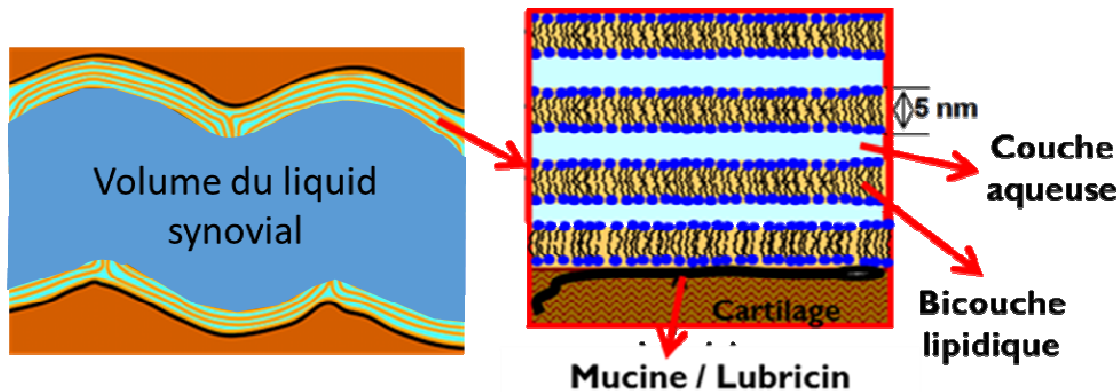


Figure B.4. Schéma du liquide synovial montrant du côté droit les complexes de surface de type multicouches lipidiques formées par empilement des bicouches lipidiques et couches aqueuses

En conséquence le prochain objectif a été d'étudier quels sont les paramètres de la couche aqueuse qui influencent le plus les propriétés tribologiques des multicouches lipidiques (thèse Magdalena Corneci 2012)

B.2. Etude du rôle des paramètres physicochimiques des couches aqueuses dans le fonctionnement tribologique des multicouches lipidiques (thèse Magdalena Corneci 2012)

L'épaisseur des couches d'hydratation des têtes lipidiques est influencée par la concentration ionique. D'autre part, les pathologies articulaires sont associés à une variation du pH de 7.3-7.4 pour le cas sain du liquide synovial sain à 7.4-7.6 pour le liquide synovial arthrosique et 6.6-7.6 pour le liquide synovial dans les polyarthrites rhumatoïdes [Cummings NA 1966, Kitano T 1998].

Afin d'étudier comment la concentration ionique et le pH influencent les propriétés tribologiques des couches lipidiques des expériences bio-tribologiques ont été effectuées (thèse Magdalena Corneci 2012). Ainsi, les propriétés tribologiques (coefficient de frottement, usure) dès l'empilement bicouches lipidiques format l'interface tribologique d'un contact modèle pour l'articulation synoviale (figure B2) en présences des différents milieux hydratants ont été étudiées.

Les principaux résultats ont montré une forte corrélation entre la résistance mécanique à la nano-indentation des couches lipidiques et leurs performances tribologiques (frottement, usure). Ainsi la figure B.5 montre que la bicouche lipidique (DOPC dans notre cas) est rompue par indentation plus facilement lorsque le pH de la solution de hydratation est faible (5.6). Pour des pH physiologiques (7.2-7.4) nous avons montré que le maintien du pH via une solution tampon augmente plus la résistance mécanique (seulement 38% de cas de rupture) que la pression osmotique physiologique donnée par 150mM de NaCl (80% de cas de rupture). On remarque moins de rupture (seulement 14%) avec une hydratation pH et pression osmotique physiologique (pH 7.2 + 150mM NaCl). Le pH 8.4 est aussi associé à une grande résistance mécanique des bicouches lipidiques (seulement 16% de rupture). Par contre, ce pH pathologique entraine l'activation des enzymes comme la phosphatase alcaline – ALP qui active la précipitation des ions de Ca^{++} en présence des résidus phosphate et la formation des cristaux de phosphate de calcium qui augmentent l'usure. Le travail de la thèse de Magdalena Corneci 2012 a mis en évidence une augmentation du coefficient de frottement et de l'usure des bicouches lipidiques en présence d'ALP incubé pendant 12h à pH de 8.4 (figure B.5)

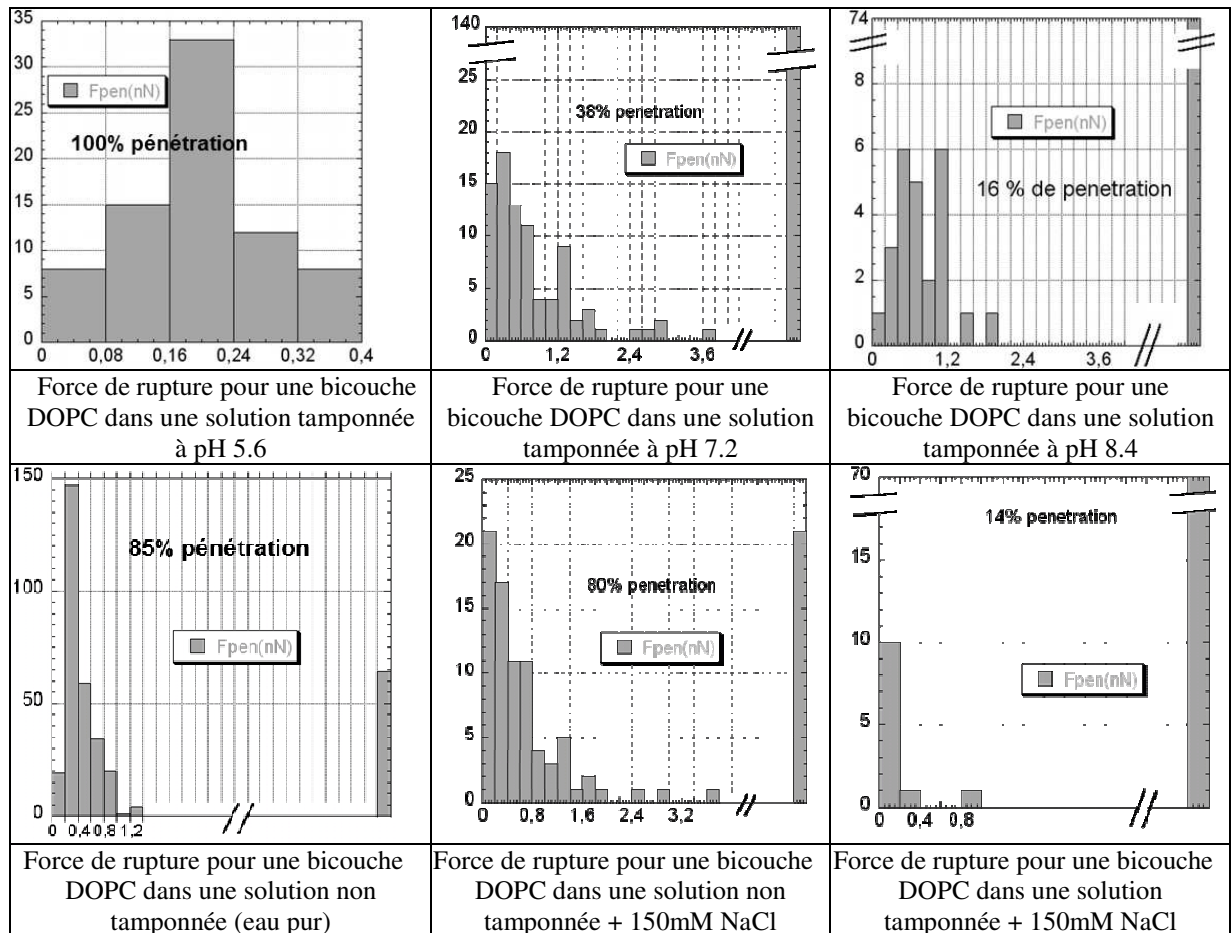


Figure. B.4. Tableau des histogrammes de distribution des forces de rupture des bicouches lipidiques au cours des centaines d'expérimentation de nano-indentation utilisant la spectroscopie de force atomiques

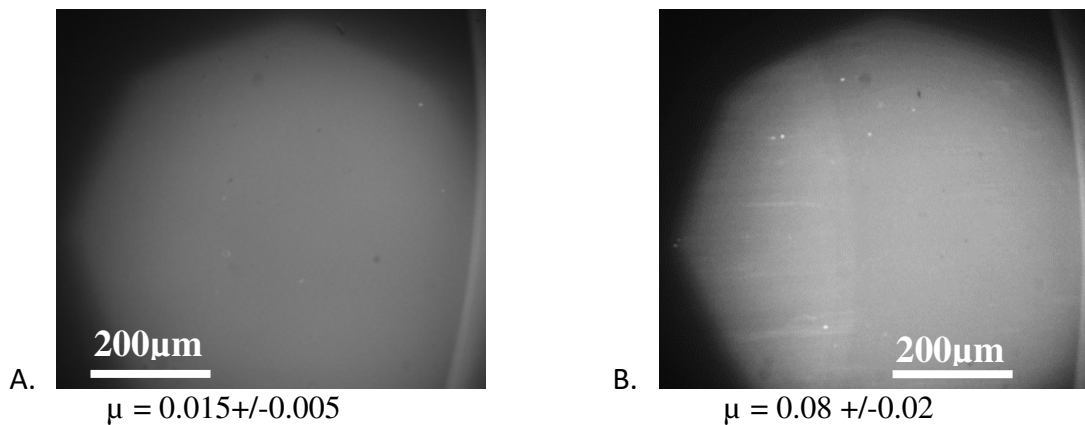


Figure. B.5. Valeurs du coefficient de frottement (μ) et images de microscopie a epifluorescence du contact frottant model bio-tribologique en présence d'un empilement des deux bicouches lipidiques DOPC en présence d'une solution aqueuse (A) tampon pH 8.4 + 150mM NaCl, (B) tampon pH 8.4 + 150mM NaCl + 12h d'incubation de l'enzyme PLA (10 μ g/ml) (travaux de thèse Magdalena CORNECI 2012)

Ainsi, nous avons montré que **les meilleures propriétés lubrifiantes sont obtenues par la localisation du glissement dans une couche aqueuse avec une concentration ionique de 150mM et ayant un pH compris entre 7.2 et 7.4**. Grace aux expérimentations de transfert de fluorescence (FRET) sur le bio tribomètre nous avons estimé **l'épaisseur de cette couche aqueuse à environ $2,84 \pm 0.03$ nm**.

Des propriétés lubrifiantes similaires ont été obtenues par Klein J. 2006 pour des couches aqueuses nanométriques contenant du NaCl et piégées entre des surfaces chargées de mica.

Ces travaux ont montré que le faible coefficient est obtenu grâce à un échange des molécules d'eau très rapide entre les sphères d'hydratation ioniques. Ainsi l'échange des molécules d'eau entre les sphères d'hydratation autour des ions dissous dans la couche d'eau et ceux fixé aux surfaces frottantes (têtes lipidiques dans notre cas, mica dans le cas d'article de Klein) est très rapide (10^9 s^{-1}) ce qui permet l'obtention d'un coefficient de frottement macroscopique de l'ordre de 0.0015. Ce mécanisme appelé dans la littérature « ball bearing » peut aussi s'appliquer aux couches aqueuses piégées entre deux bicouches lipidiques (figure B.6). Grâce au projet ANR BioLub et à la collaboration avec Mme. Claire Loison de ILM Lyon, nous avons modélisé ce mécanisme en utilisant des modèles de dynamique moléculaire et nous avons confirmé que les couches d'hydratation des lipides jouaient un rôle primordial dans l'obtention d'un faible coefficient de frottement [Falk K 2014, Botan A. 2015]

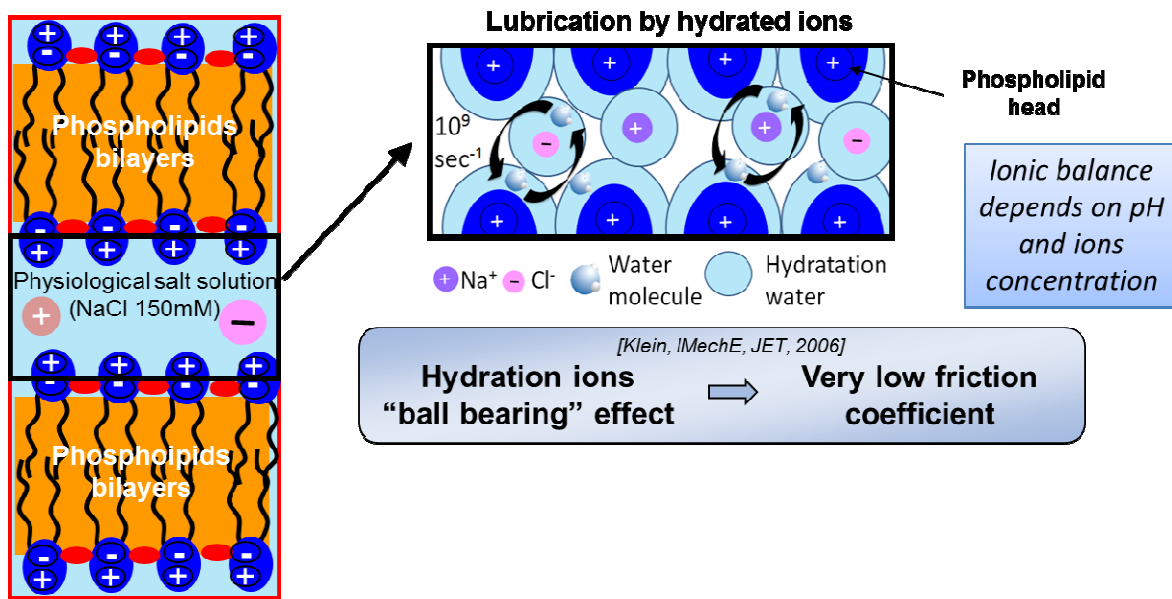


Figure. B.6. Schéma du rôle de la couche aqueuse piégée entre deux bicouches lipidiques dans la bio-lubrification (extrait de la présentation – conférence Leeds-Lyon de tribologie 2011)

B.3. Etude des propriétés biolubrifiantes des multicouches lipidiques dans les pathologies

Il est connu que 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 [Dowson D 1989],
- liquide nutritif pour le cartilage et de draineur des déchets métaboliques [Garnero P 2000].

Il est produit par l'action commune des cellules synoviales et des échanges plasmatiques [Ea H-K 2008]. Il correspond à un dialysat du plasma sanguin (produit par ultrafiltration passive à travers les capillaires de la membrane synoviale) auquel s'ajoute une production locale d'acide hyaluronique et des phospholipides.

Le liquide synovial normal est transparent. Il est peu abondant, son volume varie selon la taille de l'articulation [Neu CP 2008]. Dans une articulation humaine du genou sain, le volume de liquide synovial est de l'ordre de 0.2 ml [Dumbleton, JH, 1981] et est donc difficile à prélever.

Dans le cadre des 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.

La bibliographie est vaste et dispersée en fonction des méthodes de prélèvement et de conservation. Ainsi, par exemple, les lavages de l'articulation par du détergent font sortir des molécules dans le cartilage et dans la membrane synoviale tandis que dans l'extraction post mortem le liquide synovial est plus dilué chez les sujets décédés probablement à cause des changements hémostatiques qui influencent l'afflux de liquide synovial [Mazzocco D, 2003].

Ainsi, nous avons choisi de réaliser une analyse lipidique complète sur des liquides synoviaux prélevés sur des animaux (collaboration Ecole Vétérinaire de Lyon) ou des humains ou reproduites dans des cultures cellulaires des synoviocytes humaines (collaboration avec l'équipe 'Immunologie et Biothérapie', Département d'Immuno-Rhumatologie de Hôpital Edouard Herriot – thèses Ionut Constantin MATEI 2012 et Samira Filali 2018)

Les résultats d'analyse lipidomiques de ces liquides synoviaux ont été comparés avec :

- 1) le lubrifiant standard d'un simulateur de marche – sérum bovin (norme ISO implants)
- 2) le milieu de culture standard des cultures cellulaires de synoviocytes

Ces dosages ont été réalisés sur la plateforme lipidomique de IMBL au cours des deux projets collaboratif : le BQR INSA 2015-2017 et un projet inter-CARNOT Tropicisme (depuis 2016 – l'équipe biomécanique du LaMCoS fait partie du GIS IMBL)

Le principal résultat concerne le pourcentage des lipides lubrifiants (de type phospholipides = PL par la suite) par rapport au total des lipides mesurés et aux autres classes des lipides ayant plutôt des rôles métaboliques (ES= esters de stérols et TG= triglycérides). Ainsi, on remarque (figure B.7A) une augmentation significative du pourcentage des phospholipides dans le liquide synovial sain ainsi que dans le liquide synovial produit dans les cultures cellulaires après 20 jours de culture par rapport au milieu de culture classique et par rapport au lubrifiant standard des simulateurs de marche. Par conséquent, pour reproduire la lubrification des structures phospholipidiques, le lubrifiant ISO des implants et le milieu de culture seul ne sont pas des lubrifiants appropriés pour reproduire le liquide synovial.

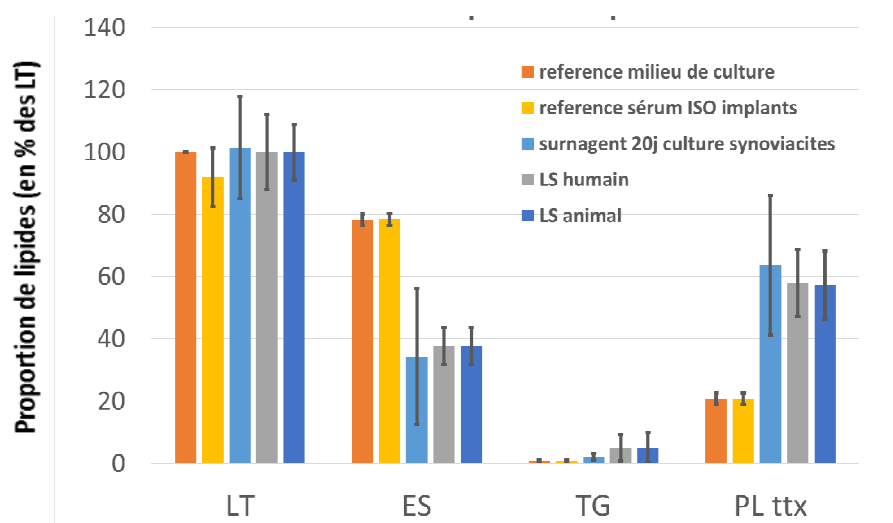


Figure. B.7.B Répartition des principales classes des lipides dans le liquide synovial sain (animal et humain) par rapport au liquide reproduit en cultures cellulaires des synoviocytes humaines et le lubrifiant ISO des implants

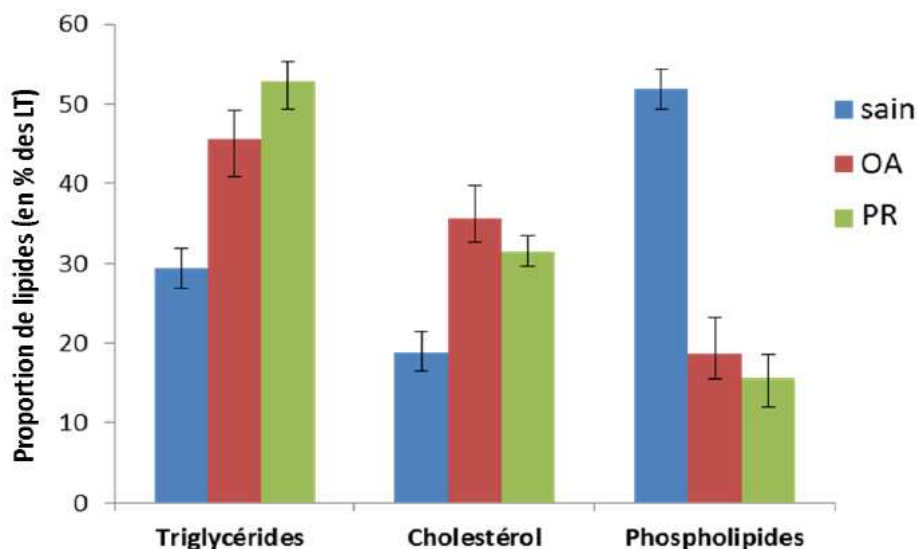


Figure. B.7.B Répartition des principales classes des lipides dans le liquide synovial sain (chien, cheval, rat) et pathologique humain (OA et PR)

En ce qui concerne les pathologies nous avons d'abord mis en évidence une diminution significative des concentrations molaires des phospholipides par rapport aux autres classes des lipides (figure 7.B).

Aussi nous avons mis en évidence que dans le cas des pathologies on observe une augmentation significative des lipides chargées de type PE et PS et une diminution des lipides de type PI (figure B.8) qui peuvent favoriser l'adsorption des multicouches lipidiques sur les surfaces du cartilage articulaire. Par ailleurs, nous avons montré que les lipides de type PE et PS augmentent significativement le coefficient de frottement ce qui détruit les complexes de surface de type multicouches lipidiques (résultats rapportées dans la thèse de Magdalena CORNECI 2012)

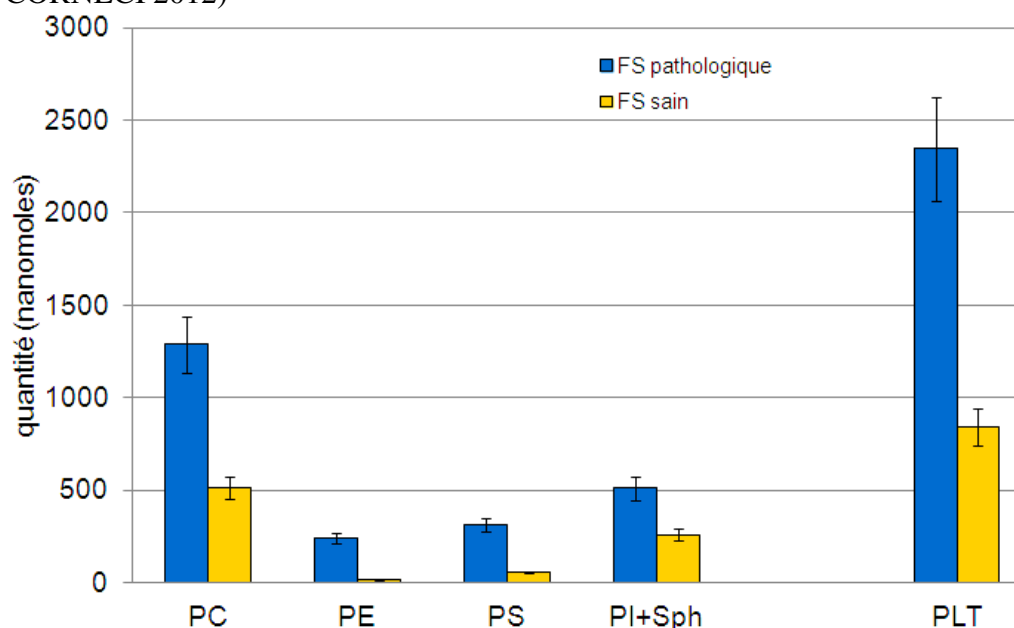


Figure. B.7. Répartition des principales classes des phospholipides dans le liquide synovial sain (chien, cheval, rat) et pathologique humain (OA et RA)

Coté queues lipidiques, nous avons analysé les acides gras formant ces queues lipidiques. Nous nous sommes focalisées principalement aux proportions des acides gras saturés par rapport aux acides gras mono-insaturés et polyinsaturés. En effet, ces insaturations influencent l'accommodation des vitesses à l'intérieur de la bicouche lipidiques. Ainsi, un acide gras insaturé possède une ou plusieurs liaisons double C=C ce qui le rend plus mobile que un acide gras saturé et c'est de ce fait qu'une bicouche contenant beaucoup des acide gras insaturés déplace plus facilement ces molécules lipidiques à l'intérieur de la couche afin d'accommoder les vitesses. Grâce au couplage avec des simulations de dynamique moléculaires (collaboration Claire LOISON ILM – ANR BioLub) nous avons montré que l'accommodation des vitesses à travers le mouvement des acides gras des queues lipidiques nécessite plus d'énergie que l'accommodation des vitesses dans la couche aqueuse ce qui fait augmenter le coefficient de frottement mesuré à l'échelle macroscopique. Ainsi, une couche ayant plus d'acides gras saturés préfère déporter l'accommodation des vitesses dans les couches aqueuses piégées entre les bicouches lipidiques. Ces résultats de simulation ont été vérifiés expérimentalement et constaté qu'une couche lipidique ayant que des acides gras saturés (de type DPPC) avait un coefficient de frottement environ cinq fois plus faible qu'une couche avec des acides gras insaturés (de type DOPC) (Trunfio-Sfarghiu Langmuir2008)

Nous avons aussi observé que les acides gras saturés sont significativement plus abondants (~60%) dans les liquides synoviaux sains que dans les liquides synoviaux pathologiques (~44%) (Détails dans la thèse de Thèse Magdalena CORNECI 2012).

Par ailleurs, nous avons mesuré une quantité significativement plus importante de sphingolipides dans les liquides synoviaux sains (~20%) par rapport à ceux pathologiques (~12%) (Détails dans la thèse de Thèse Magdalena CORNECI 2012). Ces lipides à gros tête pyramidale contribuent aussi à empêcher les molécules lipidiques de se déplacer à l'intérieur des couches lipidiques et donc de transférer l'accommodation de vitesse dans la couche aqueuse piégée entre les deux bicouches lipidiques.

D'autre part, grâce à ces analyses nous avons pu définir une composition biomimétique précise des phospholipides du liquide synovial :

- 20% de sphingolipides
- 32% de lipides estérifiées avec des acides gras saturés de type DPPC (16%), DSPC (16%),
- 48% des lipides estérifiées avec acides gras insaturés de type POPC(8%), SOPC (8%), PLPC (16%) et SLPC (16%)

Cette composition a été retenue comme référence biomimétique dans nos études sur les vésicules du liquide synovial (chapitre C)

Grâce à un marqueur fluorescent placé dans la phase fluide (1% molaire de 18:1 Liss Rhod PE) nous avons analysé les extraits lipidiques des cultures cellulaires de synoviocytes humaines. Ainsi, nous avons mis en évidence que le liquide synthétisé par les cellules saines (H dans la figure B.8) contenait plus de phases solides que le liquide synthétisé dans les cellules arthrosiques (OA) et encore beaucoup plus des phases solides par rapport au liquide synthétisé dans les cellules polyarthritiques (RA). Ce type de marquage lipidique simple pourra donc aider le diagnostic précoce à partir d'une ponction articulaire (examen pratiqué souvent en clinique, mais, seulement pour les examens cytologiques et bactériologiques de routine).

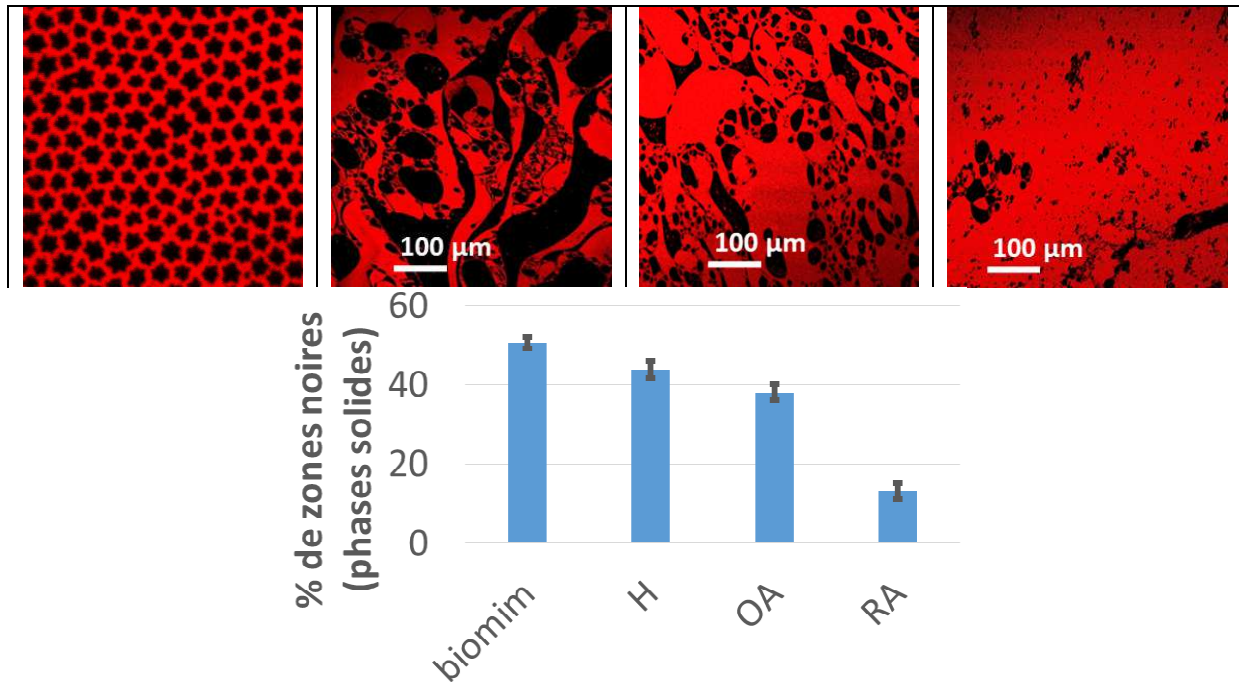


Figure. B.8. Images de microscopie confocale des monocouches lipidiques déposées en monocouche à la surface d'une solution tampon pH 7.4 à une tension de surface de 30mN/m correspondant à une tension physiologique. Le rouge représente la phase fluide tandis que le noir la phase solide. De gauche à droite : mélange lipidique biomimétique, lipides extraites de surnagent des cultures cellulaires des synoviocytes saines, lipides extraites des surnagent de cultures cellulaires des synoviocytes arthrosiques, lipides extraites des surnagent des cultures cellulaires des synoviocytes arthritiques. En bas le traitement d'une dizaine des images montrant les différences significatives (p inférieur à 0.001) du pourcentage des phases solides dans différents pathologies

En résumé nos résultats portant sur les analyses lipidiques montre clairement que pour obtenir un faible coefficient de frottement et une faible usure des multicouches lipidiques (figure B.9):

- 1) la présence majeure de l'acide gras saturé dans les queues lipidiques qui confère la solidité mécanique de ces structures,
- 2) une présence majeure des têtes lipidiques de type PC qui favorise une lubrification de type « ball bearing »

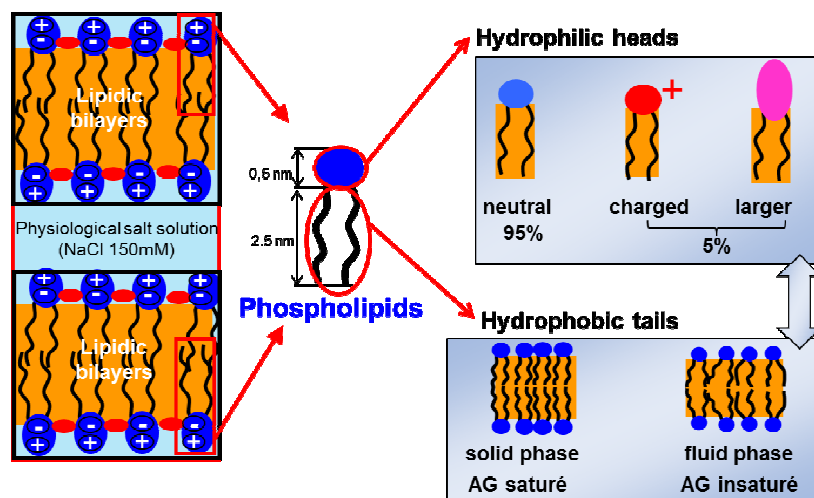


Figure. B.9. Schéma du rôle des paramètres biochimiques lipidiques dans la bio-lubrification (extrait de la présentation – conférence Leeds-Lyon de tribologie 2017)

Vu qu'on a montré, dans ce paragraphe, que la phase solide diminuait significativement le frottement et l'usure des complexes de surface de type multicouches lipidiques, dans les deux paragraphes suivants on s'est intéressé à savoir :

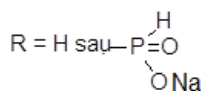
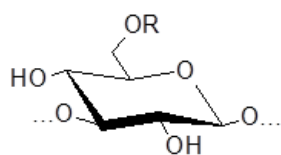
- 1) Comment on peut augmenter la rigidité d'une bicouche lipidique par injection de molécules à but thérapeutique,
- 2) Est-ce que la bio-lubrification par des multicouches lipidiques est active aussi sur des surfaces rugueuses,
- 3) Comment on peut modifier les surfaces des implants articulaires afin d'activer la bio-lubrification par des multicouches phospholipidiques.

B.4. Développement des molécules à but thérapeutique pour améliorer les propriétés lubrifiantes des multicouches lipidiques

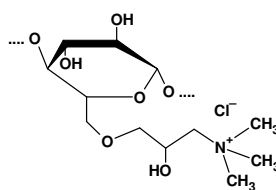
Comme nous l'avons montré dans le paragraphe précédent, la mobilité des molécules lipidiques à l'intérieur des bicouches lipidiques est augmentée dans les pathologies.

Afin d'empêcher cette mobilité, en collaboration avec l'Institut de Chimie Macromoléculaire « Petru Poni » de Iasi, Roumanie, nous avons modifié des polysaccharides naturelles afin d'augmenter leur affinité pour les bicouches lipidiques. (projet Bancusi Campus France 2016-2018).

Pour cela nous avons choisi une molécule polysaccharidiques similaire à l'acide hyaluronique décrit dans le paragraphe B.1. avec une grande force d'adhésion pour les bicouches lipidiques. Ainsi, notre choix c'est porté sur la molécule de curdlan, molécule polymère composé des monomères de type glucidique (formule du monomère dans la figure B.10) et format une structure 3D en double hélix (comme la molécule d'ADN). Cette structure fait que la molécule de curdlane fait l'objet des recherches à visé thérapeutique pour les traitements des cancers. Du coté tribologique cette structure nous intéresse car elle confère une plus grande rigidité moléculaire ce qui pourra diminuer les défauts d'adsorption sur la bicouche lipidique induisant la dégradation par frottement des bicouches (comme dans le cas d'acide hyaluronique ou de la mucine).



$M_{\text{pour 100 unit.struct}} = 21790 \text{ Da}$
Curdlan phosphorylé



$M_{\text{pour 100 unit.struct}} = 17496$
dérivé de curdlan avec groupement ammonium quaternaire (triméthyle ammonium)

Figure. B.10. Formule chimique des deux dérivées de curdlan synthétisées a ICMPP Iasi Roumanie (projet Bancusi Campus France 2016-2018)

Le curdlane est produit par des bactéries du genre *Alcaligenes* comme *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* (aujourd'hui identifiée comme *Agrobacterium biovar*) ; il a été découvert en 1966 par T. Harada qui lui a donné le nom de curdlane à cause de sa capacité à se gélifier (curdle en anglais). Le curdlane est insoluble dans l'eau, l'alcool et dans la majorité des solvants organiques c'est pour cela qu'il est difficile de l'injecter directement dans la couche aqueuse piégée entre deux bicouches lipidiques.

Pour cela nos collaborateurs de l'Institut de Chimie Moléculaire « Petru Poni » Iasi Roumanie ont modifié chimiquement la molécule de curdlan en incluant des groupements phosphate et amino pour la rendre plus hydrophile (figure B10)

Ainsi, nous avons réussi à injecter ces molécules dans la couche aqueuse piégée entre deux bicouches lipidiques en phase fluide (POPC). Nous avons alors montré que la molécule de curdlan phosphorylé améliore les propriétés biolubrifiantes des multicouches lipidiques par un mécanisme de pontage des têtes lipidiques qui diminuant ainsi significativement le coefficient de diffusion de la bicouche lipidique (figure B.11)

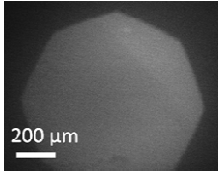
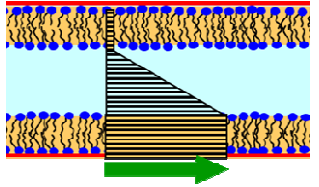
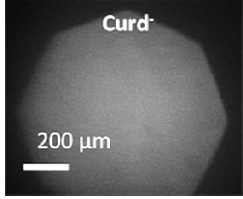
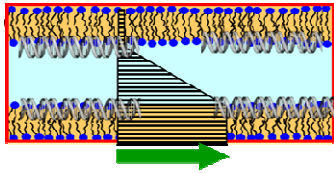
Polysaccharides molecules	μ	$D \times 10^{-5}$ (cm ² /s)	Wear of phospholipids bilayer	Velocity accommodation mechanism
Without	$0,006 \pm 8,4E-4$	$D_d = D_p = 11$		
Curdlan	0.0024 ± 0.0012	$D_p = 3.7$ $D_d = 0.8$		

Figure B.11. Tableau des valeurs du coefficient de frottement (deuxième colonne) mesuré à l'aide du bio-tribomètre et dans la configuration d'un modèle de contact articulaire (figure B.2) et en présence ou absence du curdlan (concentration 1mg/ml). Colonne 3 –valeurs du coefficient de diffusion des molécules lipidiques a l'intérieur de la monocouche situé à proximité du substrat (D_p) et de la monocouche lipidique situé plus distal de substrat (D_d). Colonne 4 – image de microscopie de épifluorescence du contact frottant montrant dans l'octogone du diaphragme du microscope une couche lipidique intacte (fluorescence uniforme) (repris de la présentation à la conférence Leeds-Lyon 2018 Mirela Sava)

B5. Etude des propriétés lubrifiantes des multicouches lipidiques en présence des surfaces rugueuses (travaux de thèses de Magdalena Corneci 2012 et Florence Blanchon 2016)

Les différentes expériences rapportées dans la thèse de Magdalena Corneci 2012 ont mise en évidence que les lavages répétées de nos substrats de verre changeaient leur rugosité de surface. Ainsi, nous avons montré que la fabrication des bicouches lipidiques à partir des vésicules lipidiques permettait de combler cette rugosité de substrat et de garder les propriétés lubrifiantes des bicouches lipidiques. Par contre, la fabrication des bicouches lipidiques à partir des micelles génère une bicouche lipidiques avec beaucoup de défauts sur les surfaces rugueuses ce qui augmente le coefficient de frottement ainsi que l'usure (figure B.12. extrait de la publication Tribology International 2012)

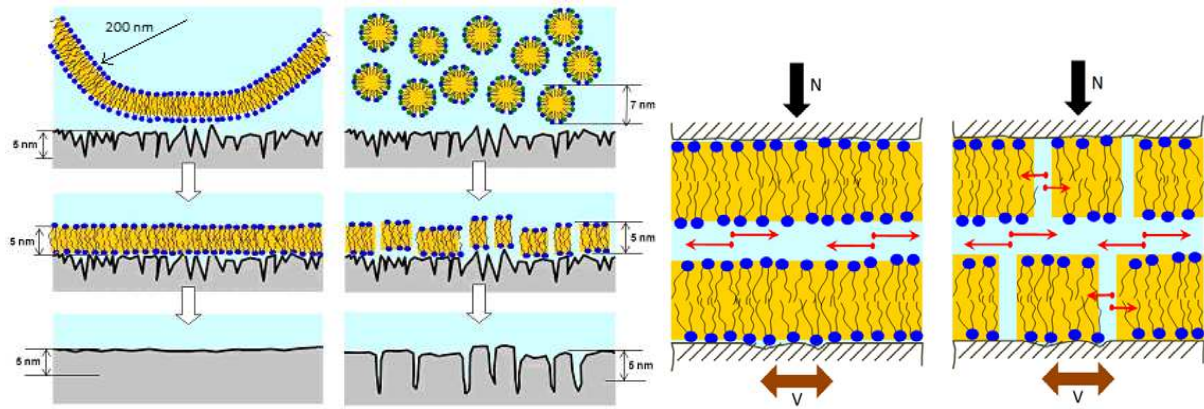


Figure B.12. Modification de la rugosité de surface en fonction de la méthode du dépôt des bicouches lipidiques : (a) fusion des vésicules; (b) co-adsorption des micelles, conséquence sur le mécanisme d'accommodation des vitesses dans le cas (c) fusion des vésicules : accommodation dans la couches de hydratation avec un coefficient de frottement faible et sans usure; (b) co-adsorption des micelles : accommodation dans la couches de hydratation avec une coefficient de frottement 10 fois plus grand et usure importante des bicouches

Par la suite nous nous sommes intéressés (projet ANR BIOLUB) à obtenir des rugosités contrôlées sur des surfaces en verre afin de voir si le mécanisme de bio-lubrification restait actif et dans quelles conditions. Ainsi trois stagiaires de M1-M2, encadrées par JP Rieu, ce sont relayés pour essayer évaluer par imagerie AFM (atomic force microscope) et réflectivité des neutrons (2 runs d'expériences en juillet 2012 à l'ILL Grenoble) si la structure verticale de bicouches de lipides supportées sur surface solide est affectée par la rugosité de celle-ci. Les surfaces (verre BK7 ou silicium) ont été attaquées par RIE (Reactive Ion Etching, plateforme NanoLyon). Ces expériences ont été complétées par des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) pour mesurer le coefficient de diffusion des lipides. Le principal résultat de ces expérimentations est que les bicouches fabriquées par cette méthode ne parvenaient pas à combler les aspérités de quelques nm de haut. Par conséquent, nous avons changé la méthode de fabrication et nous avons travaillé sur des multicouches fabriquées par spin-coating (thèse de F. Blachon 2016) et là nous avons pu faire des expérimentations tribologiques car il semble qu'au-delà de quelques bicouches, des aspérités peuvent être comblées.

Les principaux résultats sont montrés dans la figure B.13 qui semble confirmer le rôle des multicouches lipidiques dans le maintien d'une bonne lubrification même sur des surfaces rugueuses (coefficient de frottement très faible sur les verres BK de rugosité 3.5nm RMS en présence des multicouches lipidiques tandis que les mêmes surfaces sans lipides présentent un coefficient de frottement 30 fois plus grand). Les images de fluorescence montrent qu'une grande partie des multicouches lipidiques restent piégées dans le contact frottant et contribuent à lubrifier. Par contre, on remarque que dans le cas des surfaces peu rugueuses (BK 0.7nm) la quantité de lipides piégés dans le contact frottant est moins importante et au cours du frottement la multicouche lipidique est détruite (formation des amas à l'intérieur du contact visible dans la figure B.13.B) ce qui explique aussi l'augmentation du coefficient de frottement en fin d'expérimentation pour ces surfaces. Ces données doivent être confirmées afin de définir plus précisément le type de rugosité de surface afin que les multicouches lipidiques garantissent une bonne bio-lubrification. (L'objectif d'un stage M2 prévu en 2019)

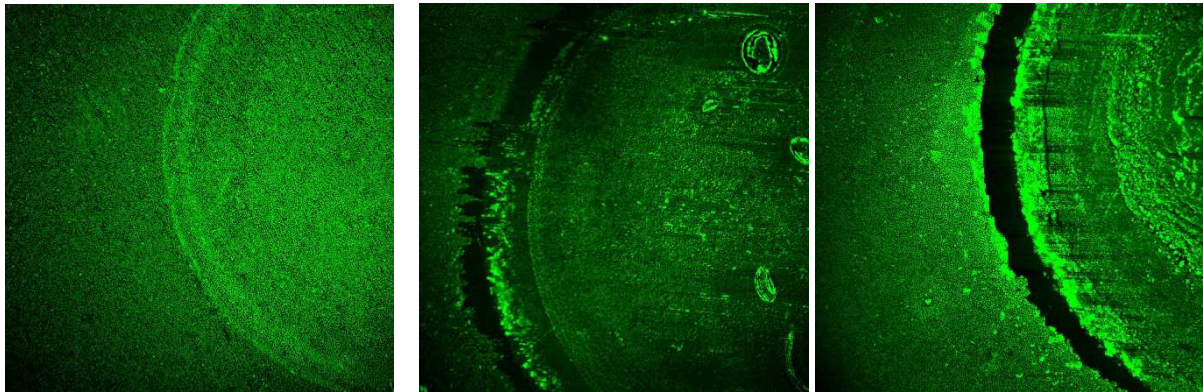
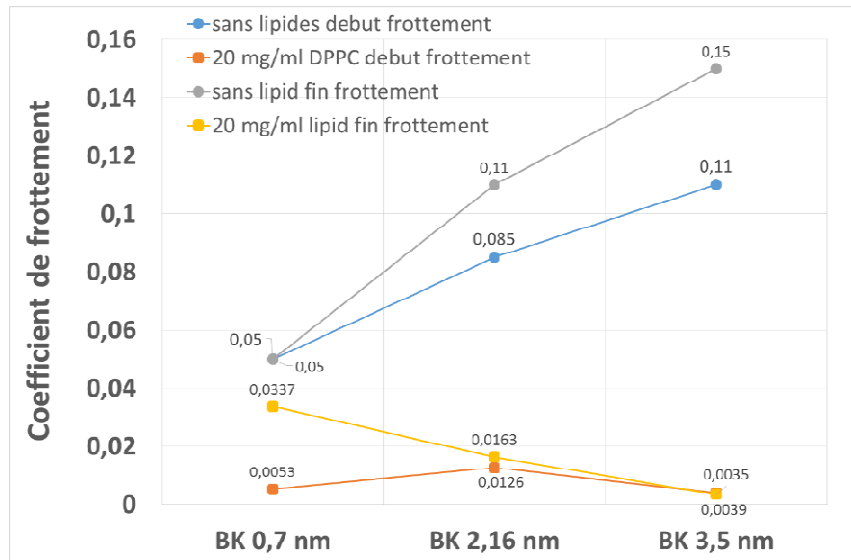


Figure B.13. Figure haut : évolution des valeurs du coefficient de frottement mesurées à l'aide du bio-tribomètre et dans la configuration d'un contact model articulaire (figure B.2) et en présence des multicouches lipidiques fabriquées par spin-coating à une concentration de 20mg/ml et sur différents rugosités de surface. En bas de gauche à droite les images de microscopie confocale à fluorescence du contact frottant, observée : 1) au début de frottement, 2) au fin du frottement pour des surfaces à faible rugosité (0.7nm RMS), 3) à la fin du frottement pour des surfaces à plus grande rugosité (3.5nm RMS)

B.6. Optimisation des surfaces d'implant en UHMWPE afin de favoriser la bio-lubrification par des couches phospholipidiques (travail de these de Na WANG 2013)

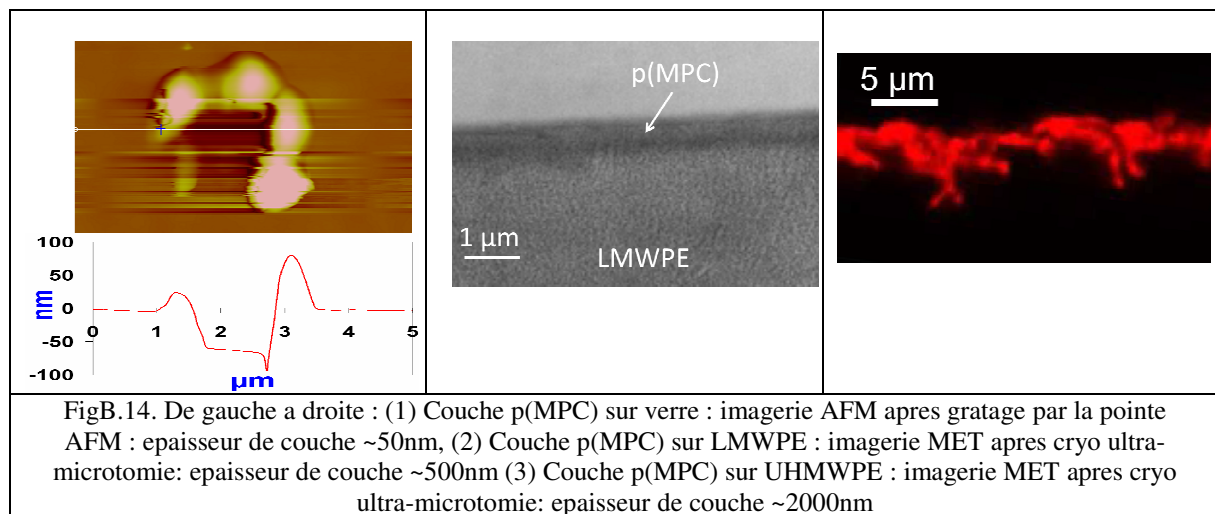
Ce travail vise à agir sur la réactivité physicochimique des surfaces frottantes des implants articulaires en polyéthylène haute densité (UHMWPE) afin de maîtriser l'accrochage des molécules biologiques de type phospholipidique et à augmenter leurs performances tribologiques. Pour cela nous nous sommes intéressées plus particulièrement, au cours de la thèse de Na WANG 2013, à la fonctionnalisation des surfaces de UHMWPE par le greffage des polymères p(MPC) (poly(2-méthacryloyloxyethyl phosphorylcholine) qui présentent des têtes phospholipidiques qui pourront reproduire la lubrification par multicouches lipidiques d'une articulation saine. Le comportement tribologique des différentes surfaces UHMWPE obtenues par différents techniques d'usines industrielles a été testé en présence et absence de couches p(MPC) greffées et interprété à l'aide des caractérisations physicochimiques et nanomécaniques des couches de p(MPC).

Dans un premier temps, en collaboration avec Jean-Paul Rieu de ILM, nous avons développé une méthodologie pour caractériser les couches moléculaires adsorbées sur les

surfaces rugueuses d'implants UHMWPE. Cette méthodologie se base sur le calibrage des mesures en spectroscopie de force atomique ce qui a nécessité la fabrication de couches moléculaires modèle greffées et/ou adsorbées sur différents supports plus ou moins rigides et plus ou moins rugueux.

Pour la fabrication nous avons collaboré avec M. Daniel Porthina de IMP Lyon avec qui j'ai co-encadré deux stages de master et un stage PFE INSA et nous avons pu réaliser des greffages de monomères hydrophiles de type MPD et polymères hydrophiles de type MPC sur des substrats rigides en verre borosilicate, sur des substrats de polyéthylène a basse densité mais rugueux et moins rigides (LMWPE=low molecular weight polyethylene) et sur des substrats plus rugueux polyéthylène et un peu plus rigides a grande densité (UHMWPE=ultra-high molecular weight polyethylene).

L'épaisseur des couches greffées a été mesurée par imagerie AFM (en grattant avec la pointe AFM le dépôt des substrats en verre), par microscopie électronique de transmission en cryo-coupe sur les substrats LMWPE et par microscopie confocale en utilisant le marquage fluorescent à la rhodamine et en cryo-coupe sur les substrats UHMWPE (figure B.14).



Le calibrage des mesures de nano-indentation en AFM, en collaboration avec Jean-Paul Rieu, nous avons développé une méthode de calibrage de l'expérimentation AFM (choix des pointes et leviers AFM en fonction des substrats utilisés pour le greffage) et une méthode de traitement des courbes d'indentation AFM qui nous a permis de retrouver les mesures d'épaisseur effectuées par les méthodes d'imagerie classiques (figure B.14). Cette méthode nous a permis d'évaluer les propriétés mécaniques des couches adsorbées / greffées (FigB.15)

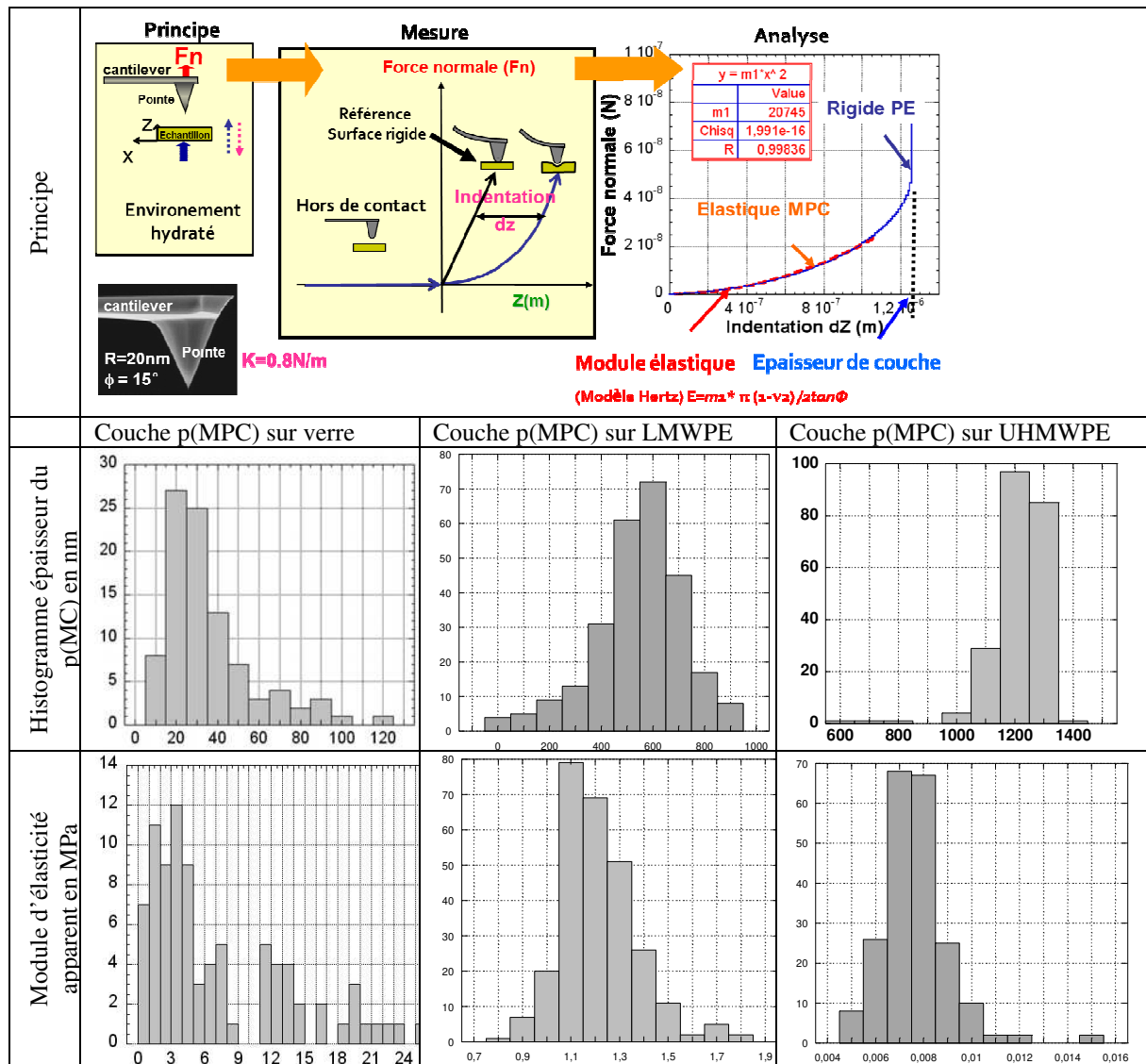


Figure B15 Principe et résultats des mesures de nano-indentation des couches p(MPC) greffées sur différents substrats. Epaisseurs des couches p(MPC) (deuxième ligne) sont en accord avec les images de microscopie électronique et confocale à fluorescence (fig. B.14).

Du côté substrat polyéthylène, les résultats tribologiques, synthétisés dans la figure B16, montrent que les différents types de polissage des surfaces UHMWPE que nous avons testés modifient de manière significative l'usure des surfaces frottantes. Paradoxalement, l'usure la plus faible est obtenue avec l'usinage qui donne la plus grande rugosité (dernière ligne de la figure B.16). Cela est dû à la formation d'une couche plastifiée discontinue de polyéthylène qui favorise le glissement en s'étirant sans se rompre car les rugosités de la surface permettent d'avoir des réservoirs pour cette couche, réservoirs localisées dans les ceux de ces rugosités. Par contre dans les conditions d'une rugosité moyenne cette couche se forme mais elle est vite rompue par les sollicitations tribologiques (deuxième et troisième ligne de la figure B16) ce qui impose une usure modéré. L'usure la plus grande est obtenue avec le polissage le plus faible (première ligne de la figure B.16). Ce polissage génère beaucoup des particules sur la surface qui vont se détacher au cours du frottement et empêcher la formation d'une couche plastifiée.

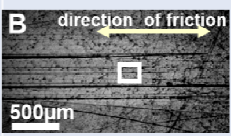
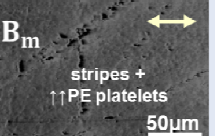
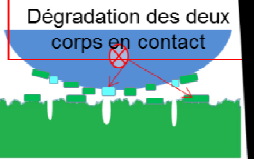
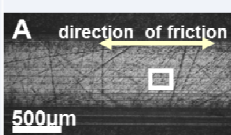
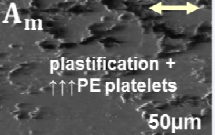
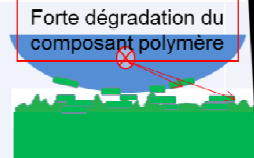
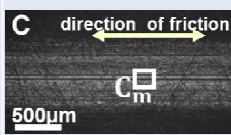
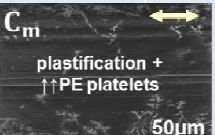
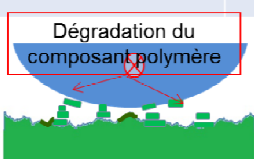
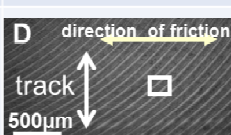
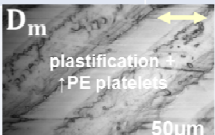
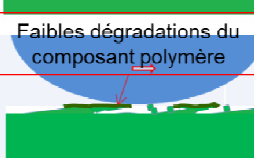
Paramètres surface: - rugosité - angle de contact	Expertise tribologique: - analyses des surface frottée - mécanisme d'accommodation des vitesses		Usure
$0.25 \pm 0.05 \mu\text{m}$ $94 \pm 2.5^\circ$	B direction of friction  500µm	B_m stripes + ↑↑PE platelets  50µm	 Dégradation des deux corps en contact
$0.53 \pm 0.05 \mu\text{m}$ $158 \pm 5.5^\circ$	A direction of friction  500µm	A_m plastification + ↑↑PE platelets  50µm	 Forte dégradation du composant polymère
$0.43 \pm 0.05 \mu\text{m}$ $153 \pm 4.6^\circ$	C direction of friction  500µm	C_m plastification + ↑PE platelets  50µm	 Dégradation du composant polymère
$0.57 \pm 0.05 \mu\text{m}$ $95 \pm 2.5^\circ$	D direction of friction track  500µm	D_m plastification + ↑PE platelets  50µm	 Faibles dégradations du composant polymère

Fig.16. Synthèse des résultats tribologiques pour quatre types d'usure de surfaces UHMWPE (chaque ligne d'images correspond à un type d'usure) : première colonne à gauche correspond à l'état de surface UHMWPE avant frottement, deuxième colonne correspond à l'état de surface UHMWPE après frottement, troisième colonne correspond à l'état de surface de la contre face en acier après frottement, quatrième colonne correspond aux schémas des mécanismes d'usure

D'autre part, nous avons montré que le contrôle des paramètres physicochimiques du greffage des couches p(MPC) influence aussi significativement le coefficient de frottement et l'usure. Ainsi, nous avons constaté que le greffage :

- 1) dans lequel nous avons contrôlés le mieux la réaction de polymérisation (image A de la figure B.17) par la formation d'une couche d'épaisseur homogène (quelques centaines de nanomètres) présente le plus d'usure. Cela a été corrélé par une fragilisation du substrat polymère après le traitement d'activation pour initier beaucoup des radicaux libres pour une polymérisation contrôlée,
- 2) dans lequel nous n'avons pas contrôlé la réaction de polymérisation (température variant librement, peu des radicaux libre sur le substrat) on a obtenu la plus faible usure (image C de la figure B.18). Cela a été corrélé par une forte réaction de polymérisation en solution qui forme des grandes chaînes moléculaires non liées chimiquement sur la surface mais entremêlées aux chaînes greffées. Ces chaînes contribuent à former des îlots de lubrifiant capable de combler complètement la rugosité de la surface et favoriser un flottement hydrodynamique sans usure,
- 3) dans lequel nous n'avons nettoyé tous les chaînes du polymère non greffée après une réaction de polymérisation moyennement contrôlé (non contrôle du nombre des radicaux libre, mais contrôle de la température – image B de la figure B.17) on a obtenu une usure moyenne.

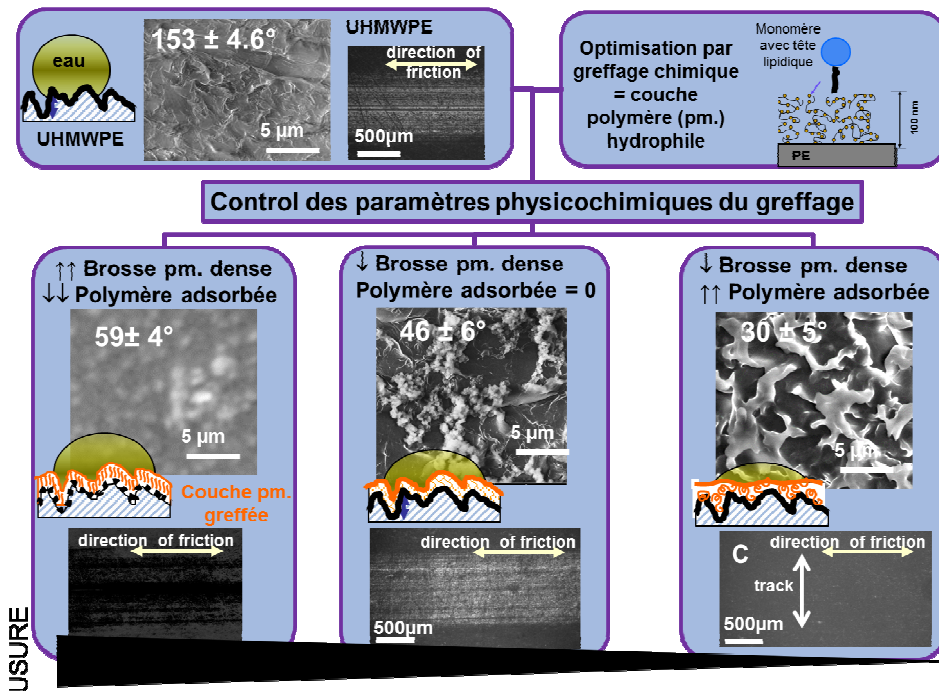


Fig.17. Synthèse des résultats tribologiques pour quatre types trois types de greffage p(MPC) (les trois rectangles en bas de l'image) sur de surfaces UHMWPE référence avant greffage présenté dans le premier rectangle haut gauche

L'ensemble des résultats, plus détaillés dans la thèse de Na WANG (2013), montre que l'activation physicochimique des surfaces d'UHMWPE par greffage des couches de p (MPC) peut favoriser la lubrification des surfaces polymères d'implants. Pour que cette lubrification soit efficace il est nécessaire un contrôle des conditions de fabrication des surfaces UHMWPE (notamment la morphologie, la rugosité et la physicochimie de la surface frottant induite par l'usure, le nettoyage et la stérilisation) des conditions de greffage (notamment densité surfacique, épaisseur, accrochage chimique, adsorption physico-chimique induite par les conditions physicochimiques comme la température, % d'oxygène, énergie et type des radiations utilisées ainsi que le choix de la substance chimique qui amorce le greffage). En particulier, nous avons montré qu'il existe en fait deux types de couche de p(MPC). La première est greffée chimiquement sur la surface (liaison covalente) et peut donner de bonnes propriétés lubrifiantes pour la surface UHMWPE lorsqu'elle est réalisée avec une bonne densité de greffage. La seconde est adsorbée et fortement liée à la première mais elle peut être éliminée par une extraction forte de type Soxhlet. Elle confère à l'UHMWPE de très bonnes propriétés lubrifiantes, mais, sa durée de vie en frottement est variable en fonction des conditions physico-chimiques d'obtention et des propriétés mécaniques de surface en UHMWPE.

Chapitre C.

Vésicules lipidiques dans le volume du lubrifiant articulaire – caractérisation et rôle dans la bio lubrification

Depuis les années 50 de nombreux travaux cherchent à comprendre les performances tribologiques remarquables du liquide synovial sain ainsi que la perte de ces performances dans les cas pathologiques. Les performances tribologiques du liquide synovial sain ont tout d'abord été corrélées avec une lubrification de type hydrodynamique qui localise le glissement à l'intérieur d'un film fluide homogène et continu [Dowson, D., 1967]. Ultérieurement, les difficultés liées à la caractérisation rhéologique du liquide synovial ont motivé des études physico-chimiques de ce lubrifiant. Ces études ont montré que la composition moléculaire du fluide synovial entraîne une séparation de phase entre le composant lipidique et les composants glycoprotéiques [Watanabe M 2000] ce qui entraîne la formation de vésicules ou de rouleaux entourant les « grosses » molécules d'acide hyaluronique [Pasquali-Ronchetti I., 1997]. Ces vésicules ont des dimensions de quelques micromètres de diamètre, ce qui correspond à l'épaisseur du film lubrifiant estimé par les théories de lubrification hydrodynamique. Cela contredit l'hypothèse sur laquelle se basent ces théories car le film n'est pas continu.

Dans ces conditions et afin de comprendre le mécanisme de lubrification synoviale saine nous nous sommes intéressées dans ce chapitre à :

- 1) caractériser les vésicules présentes dans différents liquides synoviaux sains (animaux) et pathologiques humains,
- 2) reproduire ces vésicules de façon biomimétique afin de trouver les paramètres clés pour comprendre leur comportement mécanique et tribologique,
- 3) étudier les structures vésiculaires au cours de leur synthèse dans les cultures cellulaires des synoviocytes humaines afin de trouver des solutions pour un diagnostic et/ou une thérapeutique précoce,
- 4) évaluer les conséquences sur l'usure des implants en utilisant des lubrifiants biomimétiques à base des vésicules lipidiques.

C.1. Caractériser les vésicules présentes dans différents liquides synoviaux sains (animaux) et pathologiques humains (travaux de thèse de Constantin Ionut Matei 2012)

L'analyse tribologique des structures supramoléculaires à bases des lipides présente dans les lubrifiants biologiques a été réalisée grâce à l'ANR BioLub et à la thèse de Constantin Ionut MATEI 2012. Ainsi nous avons montré que les prélèvements du liquide synovial comportent des structures lipidiques sous forme :

- des grandes vésicules (de qq centaines de nm) ayant la paroi formée par l'empilement de 3 à 7 bicouches lipidiques dans le cas sain animal (figure C.1.G),
- des réseaux et grandes vésicules (de qq centaines de nm) ayant la paroi formée par l'empilement de 3 à 5 bicouches lipidiques dans le cas non inflammatoire humain (fig. C.1.A et B),
- des petites vésicules de qq dizaines de nm à qq centaines de nm ayant la paroi formée par une seule couche lipidique dans le cas inflammatoire humain (fig. C.1.C).

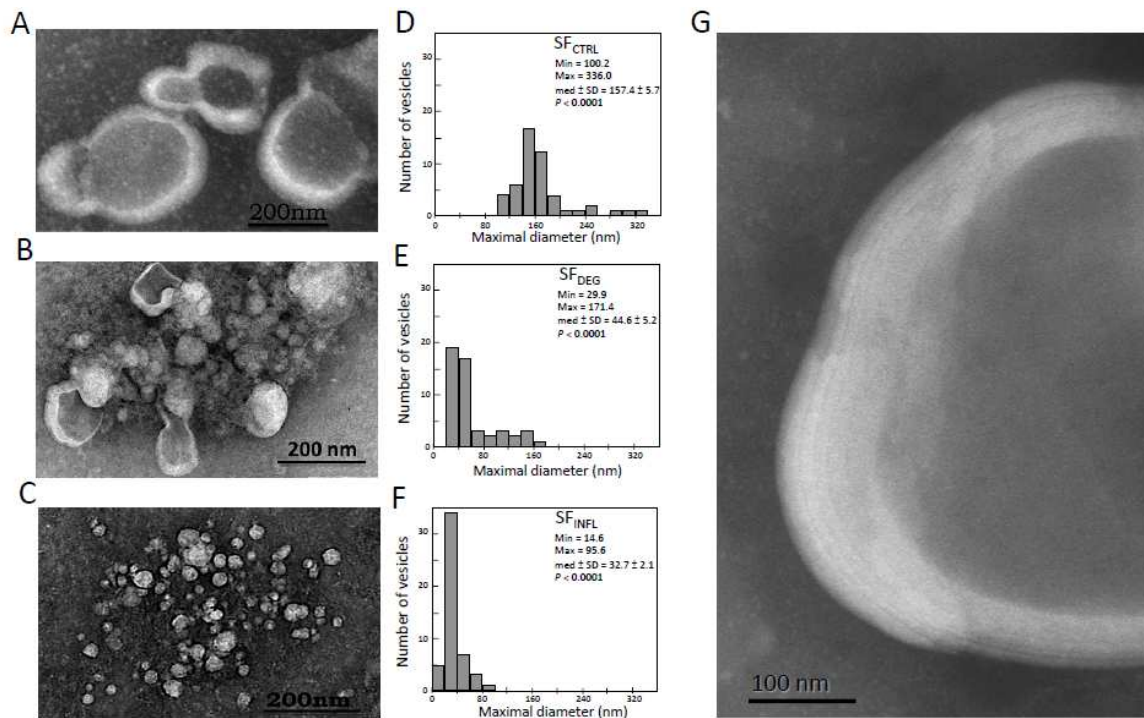


Fig. C.1. Synthèse des résultats sur la structure de liquide synoviaux : A et D : structure et taille des vésicules lipidiques présentes dans le liquide synovial sain de chien, G : détails de la proie des vésicules du liquide synovial sain : paroi contenant de 3 à 7 bicouche lipidiques, B et E structure et taille des vésicules lipidiques présentes dans le liquide synovial pathologique non-inflammatoire humain, C et F structure et taille des vésicules lipidiques présentes dans le liquide synovial pathologique inflammatoire humain

D'autre part, un étude critique sur les techniques de préparation des échantillons pour la microscopie électronique nous a permis de montrer que la taille des vésicules est diminuée par le séchage dans la préparations de type coloration négative MET par rapport aux vésicules visualisées directement par des techniques MEB cryo (figure C.2 montre le même échantillon en différents préparations). Ainsi, la préparation MEB cryo montre une coexistence des grosses vésicules (taille micrométriques) avec des réseaux lipidiques tandis que la préparation MET coloration négative permet de visualiser le nombre des bicouches lipidique format la paroi d'une vésicule du même échantillon. Par conséquence ces techniques sont complémentaires car d'un côté (MEB cryo) on peut avoir la taille réelle des vésicules et d'autre coté on peut avoir le nombre de bicouches constituant la paroi des vésicules.

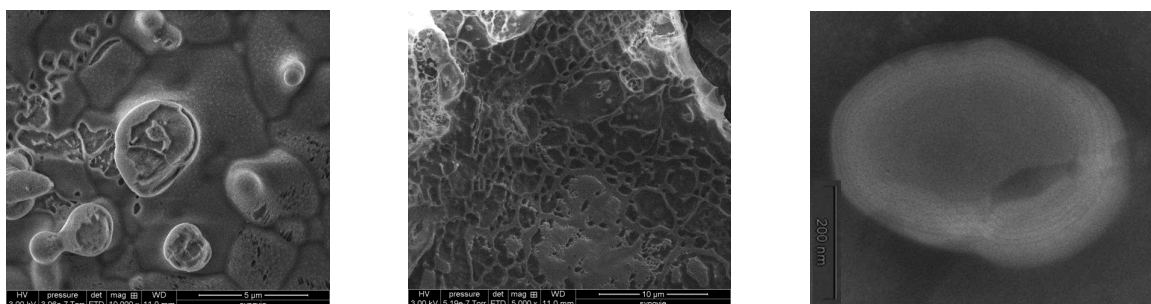


Figure C.2. Different types of structures observed by SEM (A and B) and TEM cryofracture (C and D) and TEM coloration negative

Grâce à la collaboration avec le laboratoire MATEIS (BQR INSA Lyon 2008-2010), nous avons aussi utilisé une technique originale couplant l'ESEM et le TEM : wetSTEM. Ainsi, nous avons observé *in situ* une goutte de liquide synovial de rat au cours du séchage (figure C.3) et nous avons pu mettre en évidence que des vésicules de quelques centaines de nanomètres apparaissent sous forme d'un réseau à de forts taux d'hydratation. De plus, ces

vésicules fusionnent des que le taux de hydratation devient plus faible ce qui crée des vésicules de plus en plus grosses. Ce phénomène a été mis en évidence seulement sur des prélèvements animaux ou humains, mais pas sur des liquides « reproduits » à base des vésicules biomimétiques. (Cet aspect sera repris dans le paragraphe suivant)

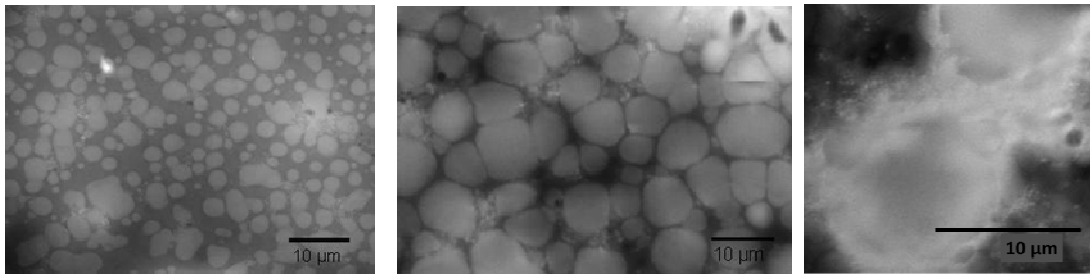


Figure C.4. Visualisation des structures vésiculaires dans le liquide synovial de rat (50% dilution en DMSO) par la technique de STEM au cours du séchage (de gauche à droite humidités 70%, 50%, 20%)

Du côté comportement tribologique nous avons étudié les performances tribologiques (coefficient de frottement, usure) des liquides synoviaux prélevés *in vivo* et testés *ex vivo* sur le bio-tribomètre dans la configuration du modèle articulaire (hydrogel HEMA / verre – ref. these doctorat Trunfio-Sfarghiu) en présence et en absence des complexes de surface de type bicouches lipidiques. Ainsi, nous avons montré que les bicouches lipidiques jouent un rôle très important dans l'obtention d'un coefficient de frottement bas : valeurs du coefficient de frottement jusqu'à 100 fois plus grandes en absence des couches lipidiques (figure C.5). Aussi nous avons montré, pour la première fois, que le liquide synovial sain (prélèvement animal) conserve les interfaces lipidiques intactes (protège contre l'usure les cartilages) tandis que les liquides pathologiques détruisent ces interfaces lipidiques pendant le frottement (indifféremment que ces liquides soient inflammatoire ou non inflammatoire).

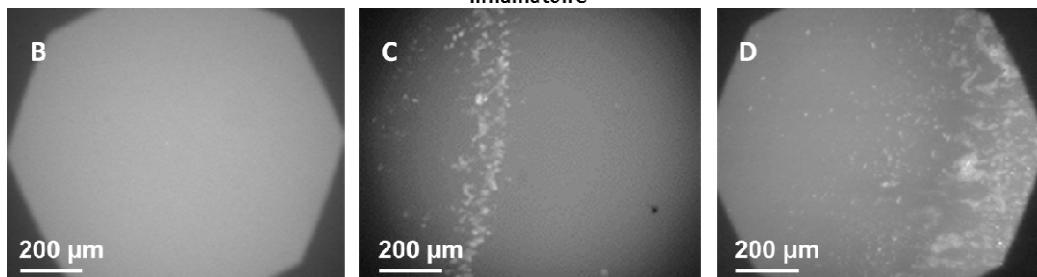
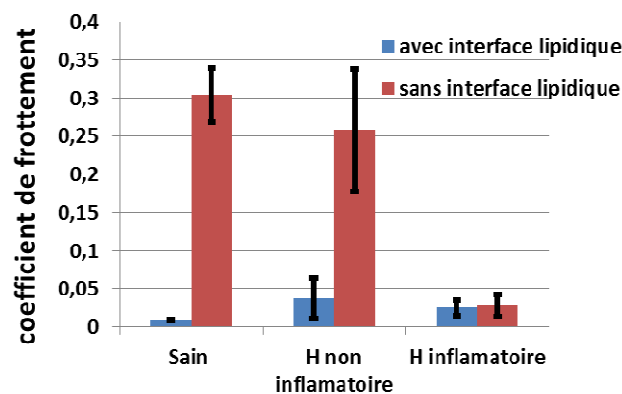


Figure C.5. Les résultats tribologiques : en haut les valeurs des coefficients du frottement et en bas les images de fluorescence montrant : la non dégradation (B liquide synovial animal sain : image montrant une fluorescence uniforme – fond clair à l'intérieur de l'octogone noir du diaphragme de focalisation du microscope) et la dégradation (C liquide synovial pathologique non inflammatoire humain et D liquide synovial pathologique inflammatoire humain – images présentant des tache plus claires) des bicouches lipidiques format l'interface du frottement d'un contact articulaire modèle (figure B.2) du contact articulaire.

D'autre part, nous nous sommes intéressés aux valeurs très grandes du coefficient de frottement obtenues en absence des interfaces lipidiques pour les liquides synoviaux sains et non inflammatoires par rapport au liquide synovial inflammatoire qui a un coefficient de frottement beaucoup plus petit (figure C5A). Cela pourra être expliqué par les théories de lubrification hydrodynamique qui montrent que plus un liquide est visqueux plus il sépare mieux les surface mais il augmente aussi le coefficient de frottement. Ainsi, nous nous sommes intéressées aux modifications de viscosité des liquides synoviaux pathologiques afin de savoir si ces changements peuvent expliquer les variations observées pour les coefficients de frottement. Ainsi, la figure C.6. montre que les valeurs de viscosité mesurées sur nos échantillons sont en accord avec celles de la bibliographie.

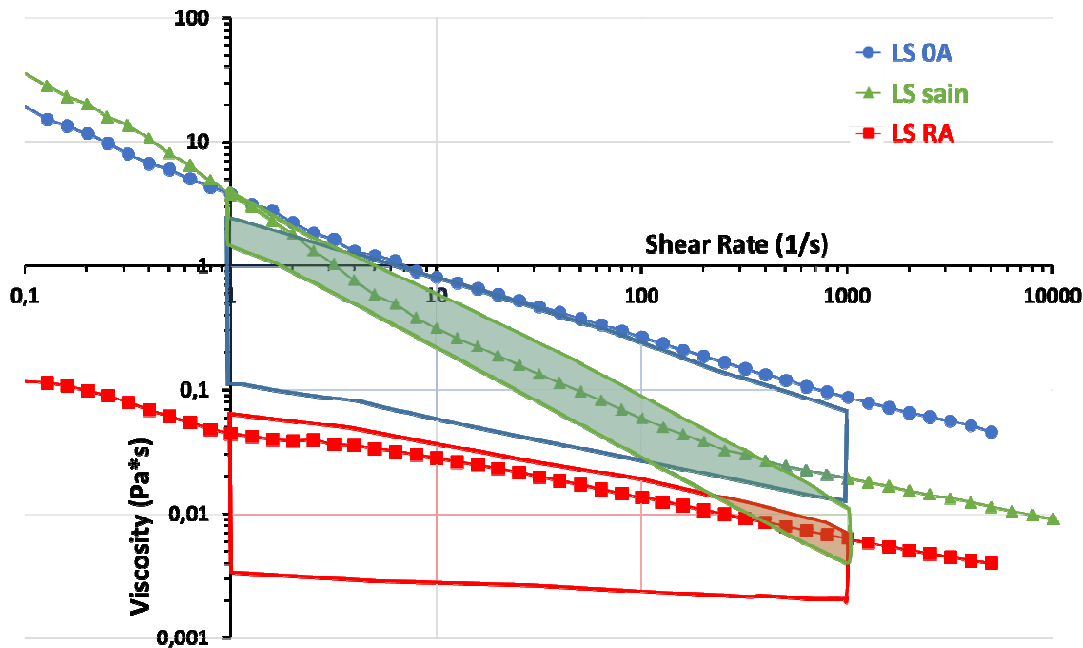


Figure C.6. Résultats montrant les courbes moyennes des viscosités mesurées sur un rhéomètre classique en configuration con/plan à 37°C : en bleu la courbe correspondant à nos liquides arthrosiques, en rouge la courbe correspondant à nos liquides arthritiques, en vert la courbe correspondante à nos liquides sains. Nous observons que nos courbes correspondent aux valeurs de la littérature : le pavé rouge correspond aux mesures de la bibliographie pour les liquides arthritiques, le pavé bleu – liquide arthrosiques, pavé vert – liquides sains (d'après la référence [Schurz, J 1987])

On constate que pour un taux de cisaillement d'environ 100 1/s, correspondantes à nos expérimentations tribologiques, on devrait avoir autant de variations du coefficient de frottement entre le liquide synovial sain et le liquide synovial pathologique non inflammatoire (OA) qu'entre liquide synovial pathologique inflammatoire (RA) et le liquide synovial pathologique non inflammatoire (OA) ; ce qui n'est pas le cas. Nous avons expliqué cette baisse significative du coefficient de frottement par une augmentation de la concentration des phospholipides. Ainsi, nous avons enregistré dans nos liquides inflammatoires une augmentation de la concentration des phospholipides jusqu'à 3mg/ml tandis que la concentration enregistré au maximum dans nos liquides non inflammatoires a été de seulement 0.3mg/ml ; ce qui est en accord avec les compositions données par Mazzuco 2004 (tableau ci-dessous). Cela explique aussi pourquoi les valeurs du coefficient de frottement mesuré pour le liquide inflammatoire avec ou sans bicouches lipidique sont semblables.

	Normal	Osteoarthritis	Rheumatoid Arthritis
Protein	15–25	29–39	36–54
Phospholipid	0.1 ^a	0.2–0.3	1.5–3.7
HA Conc.	1–4	0.7–1.1	0.8–1.5
HA M_p^c	2 ^a	0.3 ^a	0.6 ^a

Tableau 1 : composition des liquides synoviaux sains et pathologiques d'après Mazzuco 2004

Donc, par la suite on s'est intéressée à reproduire *ex vivo* ces liquides synoviaux afin de mieux comprendre leur propriétés lubrifiantes et envisager :

- 1) des liquides biomimétiques comme substitut thérapeutique du liquide synovial (actuellement les substituts de liquide synovial reproduisent seulement le composant viscosifiant : acide hyaluronique)
- 2) des liquides biomimétiques afin d'estimer de manière réaliste la durée de vie des implants (actuellement le lubrifiant standard est le sérum bovin qui reproduit principalement le composant protéique)

C.2. Reproduction des vésicules synoviales *ex vivo* afin de trouver les paramètres clés pour comprendre leur comportement mécanique (travaux de masters M2 de Mirela Maria SAVA 2013, Nesrine Raies-Darragi 2016 et Amani Zouari 2017)

Dans un premier temps le but a été de reproduire *ex vivo* la structure des différents liquides synoviaux afin de voir si on peut retrouver leur propriétés tribologiques (frottement et usure des interfaces lipidiques) et ensuite de mieux comprendre l'origine de ces propriétés a travers le suivi *in situ* du contact par microscopie à fluorescence.

Dans un premier temps nous nous sommes basés sur la composition du liquide synovial sain (3mg/ml d'acide hyaluronique, 20mg/ml des protéines sériques – BSA et 0.3 mg/ml des phospholipides). Avec cette même composition biochimique nous avons reproduit deux structures. Pour les deux structures nous avons utilisé une solution tampon pH 7.4 de l'acide hyaluronique et des protéines sériques que nous avons appelée par la suite le « gel glycoprotéique » dans laquelle nous avons mis 0.2% massique de BSA fluorescente (excitation en lumière bleue, émission en lumière verte) afin de pouvoir la visualiser en épifluorescence. Ensuite :

- 1) pour la structure qu'on appellera par la suite « gel in » nous lui avons incorporé des multicouches lipidiques après leur séchage uniforme sur la paroi d'un tube d'essai et ensuite la mise en contact avec le gel glycoprotéique et l'attente de l'équilibre thermique (12h d'agitation légère à la température de transition de phase des lipides),
- 2) pour la structure qu'on va appeler par la suite « gel out » nous avons fabriqué des vésicules lipidiques unilamellaire de taille 200nm (par la méthode d'extrusion à travers des membranes filtrante en polycarbonate) que nous avons mélangé ensuite avec la solution du gel glycoprotéique.

Dans les deux cas nous avons marqué les lipides en incluant 1% molaire du lipide fluorescent (excitation en lumière bleue, émission en lumière verte). Ainsi, la bonne formation des structures a été vérifiée par microscopie confocale et électronique (MET coloration négative) pour faire ressortir les membranes lipidiques.

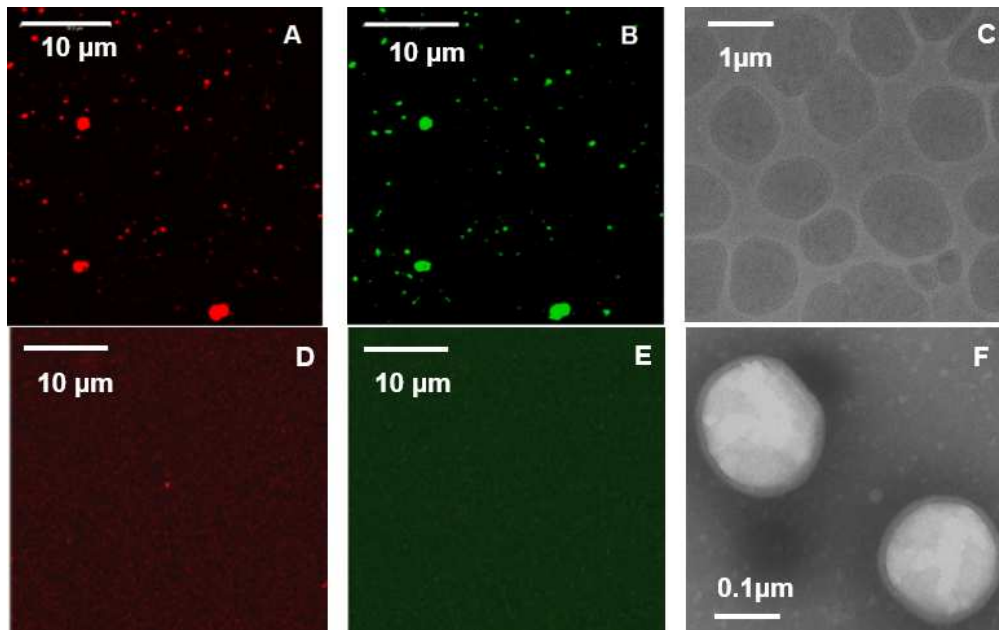


Figure C.7. A,B,D,E images de microscopie confocale de fluorescence montrant des vésicules ayant les deux types de fluorescences superposées dans le cas de liquide biomimétique « gel in » (A, B) et une fluorescence uniforme sur toute l'image dans le cas de liquide biomimétique « gel out » (D,E). C et E images de microscopie électronique de transmission montrant des vésicules lipidiques d'environ 2 μ m en diamètre pour le liquide biomimétiques « gel in » et d'environ 200nm en diamètre pour le liquide biomimétiques « gel out »

Ainsi, la figure C.7C montre l'existence des grosses vésicules d'environ 2 μ m en diamètre dans la structure biomimétique « gel in » tandis que les figure C7.A et B montre la superposition des fluorescences dans les vésicules (le gel glycoprotéique est bien situé dans les vésicules). La figure C7.F montre l'existence des petites vésicules d'environ 200 nm en diamètre dans la structure biomimétique « gel out » tandis que les figures C7.D et E montrent une fluorescence uniforme – on en déduit que, les vésicules (trop petites pour pouvoir être détectée de manière individuelle par la microscopie de fluorescence utilisée) sont incluses de manière homogène dans le gel glycoprotéique.

Pour tester les propriétés tribologique ce ces deux structures nous avons utilisé le bio tribomètre dans la configuration du modèle *ex vivo* du contact articulaire (hydrogel HEMA frottant cotre Verre couverts chacun par une bicouche lipidique).

Les résultats ont montré que :

1. la présence de grandes vésicules lipidiques (qq μ m) qui entourent les autres composants du liquide synovial (Gel-in) donne un coefficient de frottement bas (0.008 -0.01) sans dégradation des surfaces en contact, indépendamment de la concentration lipidique (on a testé des concentrations comprise entre 0.3 et 3 mg/ml). Ce coefficient de frottement est similaire au celui obtenu par le frottement des deux bicouches lipidiques ce que signifie que l'accommodation des vitesses se fait dans les couches aqueuses d'épaisseur nanométrique piégées entre des vésicules/bicouches lipidiques,
2. la présence de petites vésicules lipidiques (qq dizaines nm) entourées par les autres composants du liquide synovial (Gel-out) augmentent le coefficient de frottement de 10 à 30 fois par rapport aux mêmes concentrations lipidiques Gel-in. Ce grand coefficient de frottement a été corrélé à une forte dégradation des surfaces en contact avec l'apparition d'amas et rouleaux fluorescents en contact.

Ces résultats démontrent que le liquide synovial biomimétique de type Gel-in peut être un prototype pour le remplacement du liquide synovial dans le case des maladies articulaires.


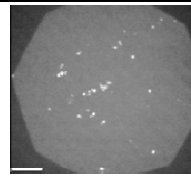

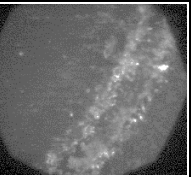
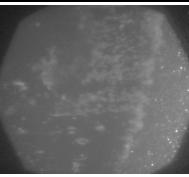
Structure	Bicouches lipidiques sans gel	Gel-in		Gel-out	
Conc. lipidique		0.3 mg/ml	3 mg/ml	0.3 mg/ml	3 mg/ml
C.F	0.008	0.01	0.011	0.28	0.1
Visualisation in situ					

Figure C.8. Synthèse des résultats tribologiques coefficients de frottement (CF) et usure des bicouches lipidiques format l'interface tribologique du modèle de contact articulaire (hydrogel HEMA / verre).

Par conséquent, il semble que la structure du liquide synovial sain est de type « gel in » : suspension très concentrée des vésicules lipidiques (figure. C9) de taille micrométriques séparés par des membranes lipidiques qui localisent l'accommodation des vitesses avec un minimum de frottement et d'usure.

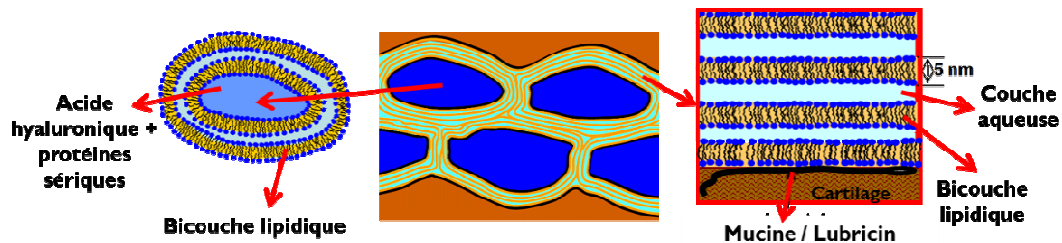


Figure C.9. Schéma de la structure du liquide synovial mis en évidence par nos expérimentations et faisant apparaître les deux structures lipidiques importantes dans la bio-lubrification : vésicules lipidiques de taille micrométrique (à gauche) et empilement des plusieurs bicouches lipidiques séparées par des couches aqueuses format l'interface liquide synovial / cartilage.

Par contre la structure du liquide synovial pathologique semble à être de type « gel out ». Par contre si on associe la structure de « gel out » ayant 3mg/ml lipides avec le liquide synovial arthritique (RA) nous observons que nos coefficients de frottement obtenus avec ce liquide biomimétique sont plus grands que ceux obtenus avec les prélèvements. Par conséquent, nous nous somme intéressé aux changements du comportement rhéologique de ces liquides biomimétiques en présence des différents types des lipidiques (master Elliot Speirs 2018 et postdoc Constantin Ionut MATEI 2013). Ainsi nous avons synthétisé des liquides biomimétiques « gel in » et « gel out » en utilisant trois types des lipides : DPPC (en état solide à 37°C), POPC (en état fluide à 37°C) et des lipides de composition biomimétiques définis dans le chapitre B. Ensuite, nous avons réalisé des études rhéologiques comparatives à celles des liquides synoviaux prélevées.

La synthèse des résultats (figure C10) montre que l'allure de la courbe rhéologique caractérisant l'évolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement des solutions glycoprotéiques de type acide hyaluronique / acide hyaluronique + albumines ou « gel out » se ressemble. Ainsi, on observe les mêmes phénomènes que ceux déjà décrits dans la littérature:

- le composant important qui impose la rhéologie c'est l'acide hyaluronique. En effet, la molécule d'acide hyaluronique qui se déploie selon la direction du cisaillement fait baisser la viscosité à des taux de cisaillement élevés,
- les protéines augmentent la viscosité sans changer le comportement d'ensemble (on parle des réticulations que les protéines forment avec la molécule d'acide hyaluronique qui se déploie moins facilement en présence des protéines),

- les lipides empêchent les protéines de réticuler la molécule d'acide hyaluronique. De ce fait la courbe de « gel in » est plus proche de la courbe d'acide hyaluronique.

Par contre, on observe que l'allure de ces 3 courbes « gel out » est bien différente de l'allure des 3 courbes des solutions « gel in ». Les courbes « gel out » semblent avoir la même allure que la courbe du prélèvement du liquide synovial, mais on enregistre une différence significative de viscosité. Ainsi si on prend un taux de cisaillement physiologique de 2.5 1/s on constate que la viscosité du liquide synovial prélèvement est 100 fois plus grande que le liquide biomimétique « gel in POPC » et 10000 fois plus grande que le liquide biomimétique « gel in DPPC » ou « gel in biomimétique ».

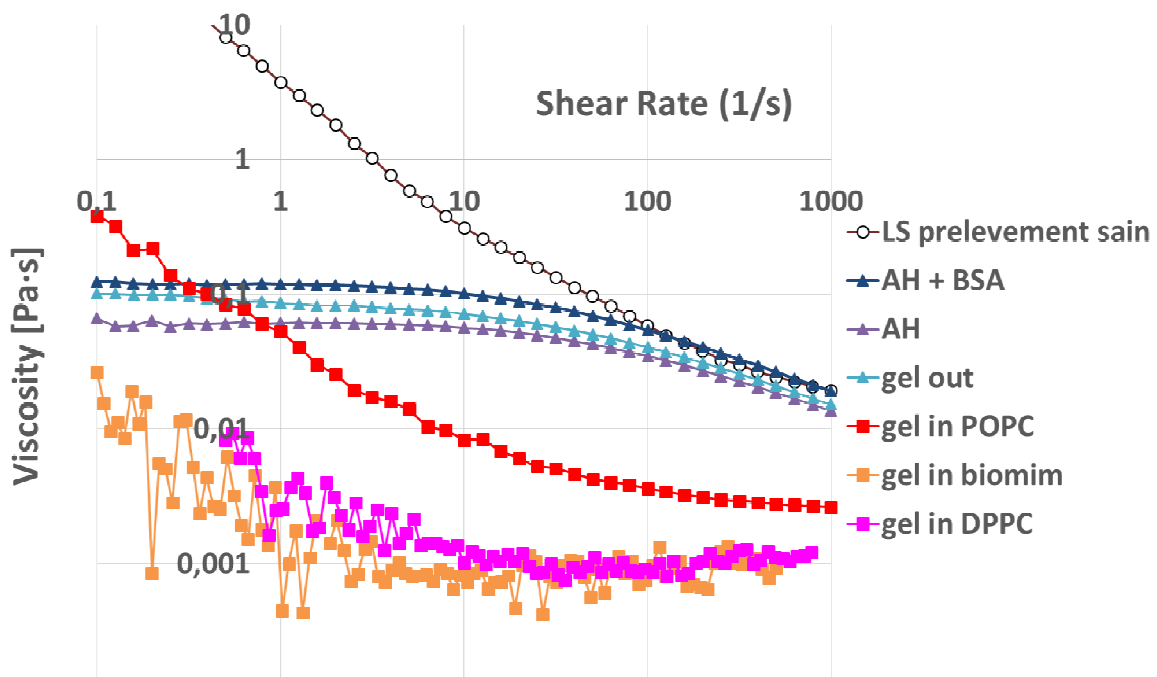


Figure C.10. Synthèse des résultats rhéologiques concernant différents compositions biomimétiques

Il semble que dans nos compositions biomimétiques il y a un composant important qu'on ne reproduit pas. Vu qu'on reproduit bien les vésicules lipidiques on s'est intéressée par la suite à étudier quelques sont les paramètres importants qui peuvent influencer la rhéologie de ces vésicules :

- 1) la rigidité membranaire qui est différente entre POPC, DPPC et biomimétique
- 2) le nombre des bicouches lipidiques format la paroi d'une vésicule
- 3) l'adhésion inter-vésicules
- 4) la rugosité du substrat

Ainsi, avec des collègues plus numériques et avec des collègues biochimistes de l'INSA (BQR INSA 2015-2017) nous nous concentrons actuellement à modéliser la bio-lubrification par les vésicules lipidiques (organigramme du projet dans la figure C11)

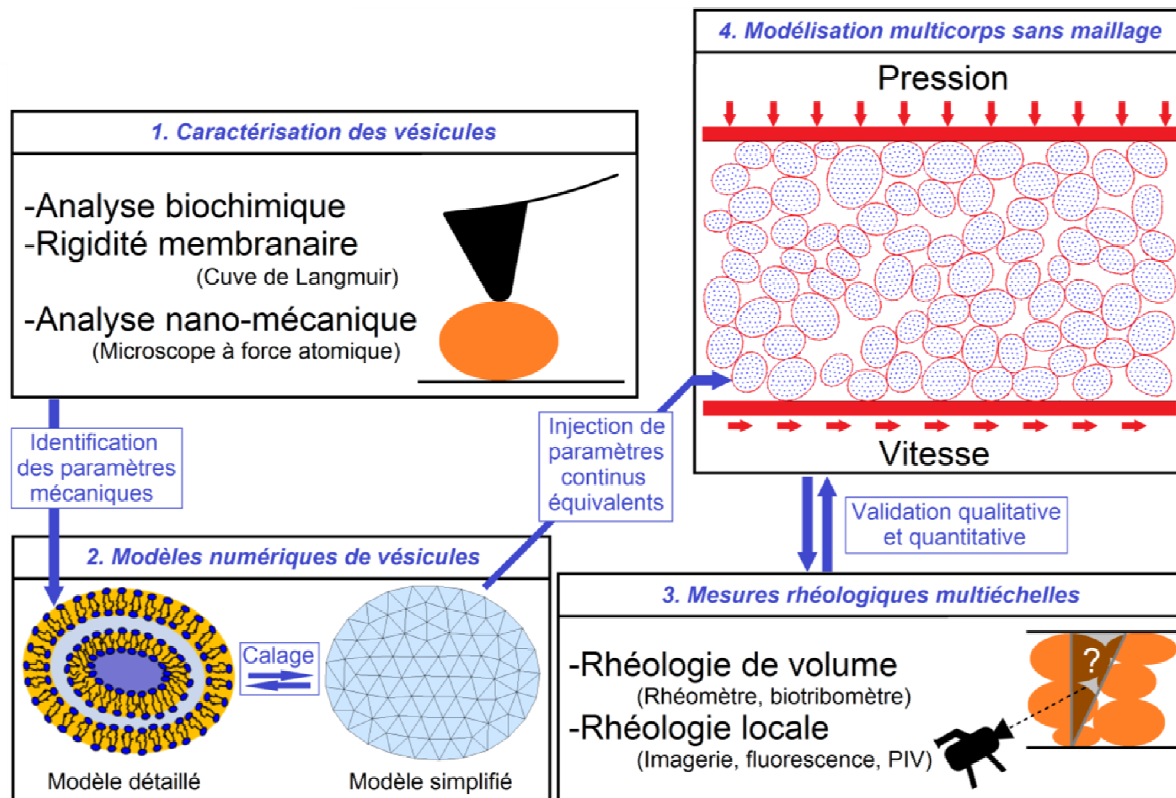


Fig. C11. Organigramme du projet BQR INSA Guilhem Mollon 2015-2017 : « Modélisation numérique de la lubrification par des vésicules lipidiques déformables : application à la conception de lubrifiants biomimétiques »

Du côté numérique, mon collègue Guilhem MOLLON grâce à deux stages M2 (Marie Dalémat 2016 et Cédric Devillers 2017) a pu mettre au point :

- 1) un modèle numérique détaillé d'une vésicule lipidique multimembranaire soumise à une contrainte de compression ,
- 2) un modèle numérique des vésicules déformables simplifié soumise aux contraintes tribologiques

Du côté expérimental, grâce à deux stages de M2 (Nesrine Raies-Darragi 2016 et Amani Zouari 2017), on a pu développer des expérimentations nano-mécaniques en spectroscopie de force atomique en utilisant des vésicules extraites directement du liquide synovial de chien, des vésicules biomimétiques (reproduisant la composition exacte des membranes lipidiques – résultats présentés dans la figure B8) et des vésicules modèles pour reproduire seulement la phase lipidique solide (DPPC) ou seulement la phase lipidique fluide (POPC).

Les résultats montrent que les lipides fluides favorisent la formation des amas ($\sim 5\mu\text{m}$) de petites vésicules unimembranaires (diamètre $0.1\mu\text{m}$) (figure C12) qui ne résistent pas à la compression mécanique (appliquée à l'aide d'un levier AFM de raideur 0.06 N/m et une pointe - sphère borosilicate de diamètre $10\mu\text{m}$) tandis que la phase solide favorise la formation des grosses vésicules lipidiques ($2-5\mu\text{m}$) (figure 6B) avec toute une paroi bi-membranaire et une bonne résistance en compression.

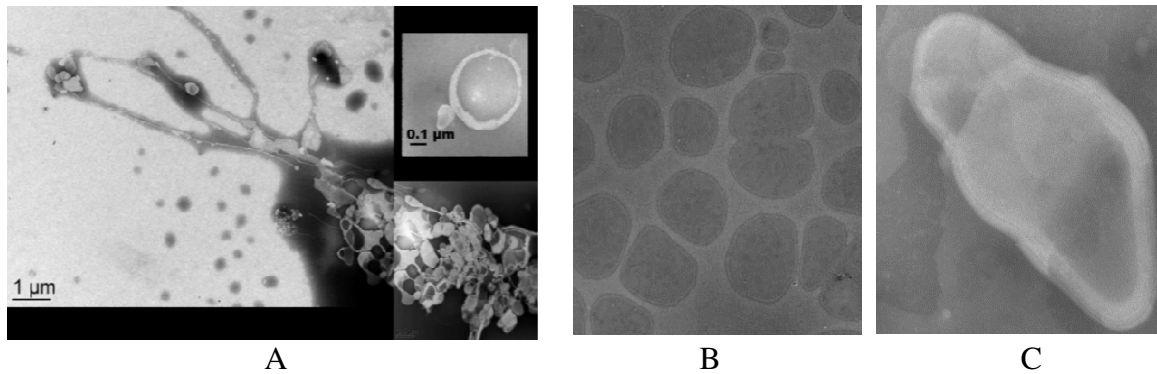


Fig. C12 Structure des vésicules (MET coloration négative) lipidiques biomimétiques synthétisés à partir des différents types lipidiques : A = lipides en phase fluide (POPC) – l’image montrant des gros amas (~10µm) des petites vésicules avec paroi unilamellaires (zoom haut droit); B = lipides en phase solide (DPPC) – l’image montre des vésicules entre 1 et 5µm de diamètre avec paroi double-lamellaire ; C = mélange des lipides biomimétiques – l’image montre des vésicules d’environ 1 µm de diamètre avec paroi quadri-lamellaire

En ce qui concerne les vésicules formées à partir des lipides biomimétiques (fig 6C) on a constaté qu’elles sont toutes d’une taille comprise entre 1 et 2 µm et avec une paroi quadri couche. La rigidité de ces vésicules est environ 5 fois plus importante que celles des vésicules formées seulement des lipides en phase solide (DPPC). Ces résultats sont très nouveaux et l’exploitation des données AFM n’est pas encore finie car des itérations expérimentales / numériques sont en cours.

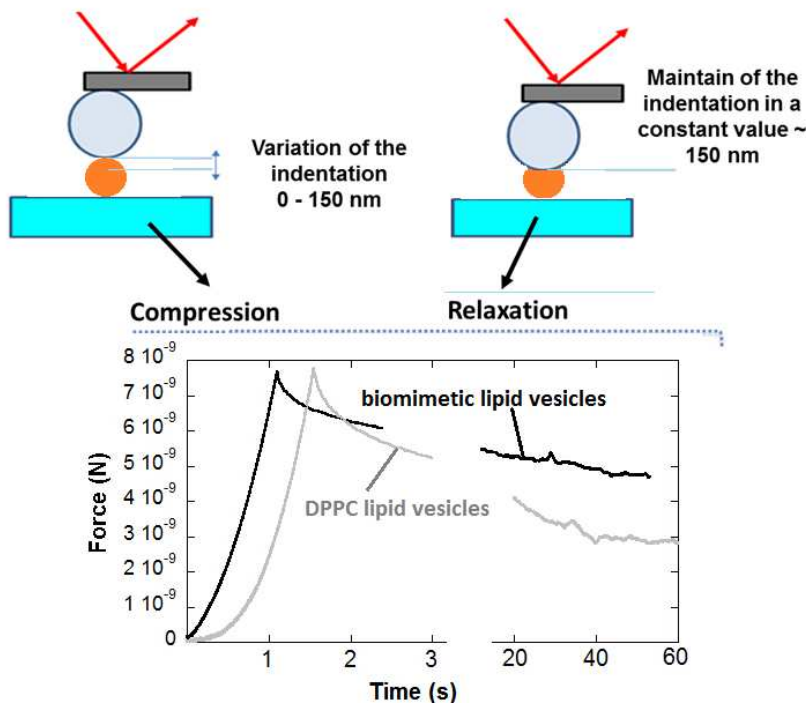


Fig. C13. Figure de principe des mesures des forces visco-élastiques en utilisant la microscopie de force atomique avec un indenteur de type bille de verre de rayon 5 µm. Deux courbes type montrant les différences du reponse mécanique des vésicules DPPC par rapport aux vésicules biomimétiques

Des expérimentations tribologiques et rhéologiques sont prévues pour analyser comment les structures multilamelaires des vésicules lipidiques influencent les propriétés tribologiques. Pour cela nous avons pu obtenir un bourse Eiffel Campus France pour une thèse en co-tutelle avec la Tunisie (Nesrine Raies-Darragi 2017-2020)

En parallèle de ces questions fondamentales, afin de comprendre les mécanismes de lubrification par des vésicules lipidiques nous nous sommes intéressés à comprendre comment sont synthétisés *in vivo* ces vésicules lipidiques et comment les pathologies influencent leur synthèse.

C.3. Etude de vésicules lipidiques synthétisées dans des cultures cellulaires des synoviocytes humaines. Application au diagnostic et à la thérapeutique précoce. (Master M2 Bogdan Munteanu 2011, thèse Samira Filali 2018)

Cette étude a été faite en étroite collaboration avec l'unité immunogénomique et inflammation EA 4130, de l'Hôpital Edouard Herriot de Lyon et a démarré en 2010 dans le cadre du projet CIBL TriboPath financé par la région Rhône-Alpes. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la synthèse des vésicules lipidiques dans différents types de cultures cellulaires primaires humaines issues directement de patients (cela repose sur une importante biocollection développée depuis 1992 dans le service d'immunologie clinique et de rhumatologie de l'Hôpital Edouard Herriot, responsable Prof. Miossec). Ainsi, on s'est intéressé dans un premier temps à comprendre comment cette synthèse est perturbée par des pathologies inflammatoires (RA) ou non-inflammatoire (OA) par rapport aux patients sains (H). Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à comprendre comment cette synthèse vésiculaire est influencée par ajout de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu de culture (cytokines de type IL17 et TNF) ; cela afin de pouvoir mettre en place des moyens de contrôle efficace des biothérapies anti-cytokines développées par l'unité EA4130.

Ainsi, l'utilisation d'un marqueur fluorescent lipidique (DiI) qui marque toutes les membranes lipidiques de la cellule et du milieu synthétisé par la cellule (surnageant) nous avons pu analyser la synthèse des vésicules dans différentes cultures en utilisant la microscopie confocale à fluorescence (figure C14).

Ainsi, les résultats présentés dans la figure C14 montrent :

- à grande échelle (première ligne de la figure) - une différence significative de la morphologie des cellules. Ainsi : les cellules saines (premier colonne) sont des cellules allongées ayant une fluorescence de même intensité dans toutes les cellules ; les cellules arthrosiques (deuxième colonne) sont des cellules beaucoup plus étalées ayant une fluorescence qui change avec l'étalement des cellules ; les cellules arthritiques (troisième colonne) sont des cellules plus étalées que dans le cas sain, mais moins étalées que dans le cas OA et avec plus d'intensité de fluorescence associé avec une synthèse plus importante des vésicules lipidiques,
- à petite échelle (deuxième ligne de la figure) - une différence significative de la répartition des vésicules et membranes lipidiques dans la cellule et dans l'espace intercellulaire. Ainsi, les vésicules des cellules saines (première colonne) sont présentes dans toute la cellule et un grand nombre est visible dans l'espace extracellulaire aussi, on remarque aussi des fines membranes lipidiques faisant la communication intercellulaire ; les vésicules des cellules arthrosiques (deuxième colonne) sont concentrées principalement autour des noyaux, on remarque juste quelques-unes dans l'espace extracellulaire et les membranes lipidiques faisant la communication intercellulaire sont beaucoup plus nombreuses et plus épaisses ; les vésicules des cellules arthritiques (troisième colonne) sont réparties soit de manière uniforme dans toute la cellule soit principalement autour des noyaux, les membranes lipidiques faisant la communication intercellulaire sont très nombreuses mais beaucoup plus fines que dans le cas arthrosique,
- à l'échelle du surnageant synthétisé par les cellules (troisième ligne de la figure) - une différence significative des structures vésiculaires. Ainsi, les vésicules du surnageant saine (premier colonne) sont présentes dans toute la cellule et on voit beaucoup dans l'espace bien visible de manière individuelle séparée par un fond noir (absence des lipides entre les vésicules) ; les vésicules du surnageant arthrosique (deuxième colonne) sont accumulées dans des gros amas (les vésicules semblent s'agréger) et entre ces amas on voit un fond

légèrement fluorescent (présence des vésicules nanométriques dispersées de manière homogène dans tout le surnageant), les vésicules du surnageant arthritique (troisième colonne) sont plus petites et dispersées de manière homogène dans une masse avec une grande fluorescence (nombreuses vésicules nanométriques dispersées de manière homogène dans tout le surnageant).

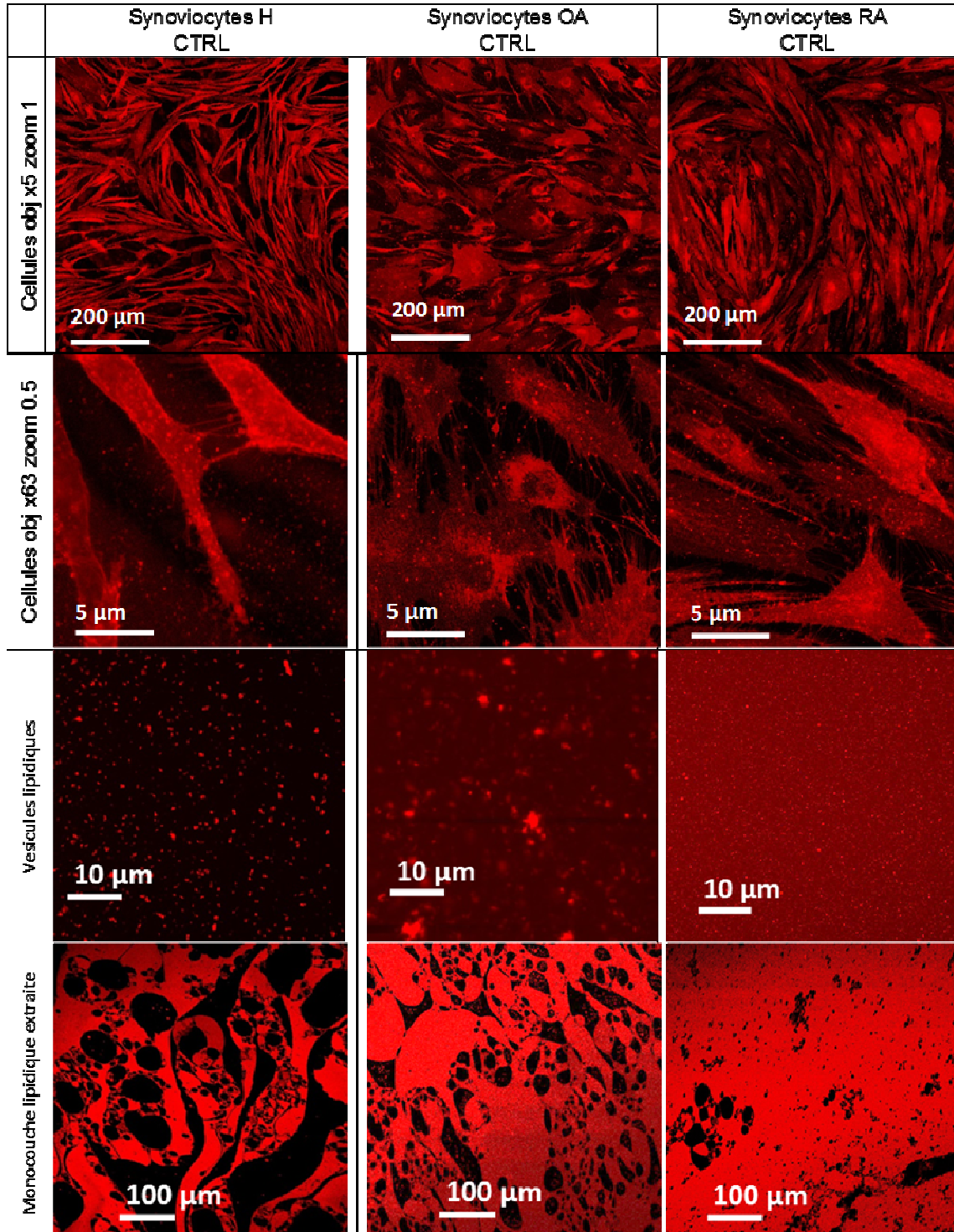


Fig. C14. Tableau présentant les images de microscopie confocale à fluorescence (marquage lipidique DiI) obtenues pour différents types des cultures cellulaires : colonne 1 – synoviocytes sains ; colonne 2 – synoviocytes arthrosiques, colonne 3 – synoviocytes arthritiques et à différents niveaux : ligne 1 – vue d'ensemble de la culture objectif x 5 ; ligne 2 – détails des cellules objectifs x 63 ; ligne 3 – visualisation du surnageant

Dans un environnement inflammatoire, nous avons analysé si la synthèse des vésicules lipidiques était modifiée par l'ajout des cytokines pro-inflammatoires (IL17 + TNF). Les résultats, synthétisés dans la figure C15 montrent de manière générale que les cellules contenant des cytokines pro-inflammatoires (deuxième ligne de la figure C15) sont plus petites et d'aspect plus étoilées que les cellules de la même culture cellulaire sans cytokines pro-inflammatoires (première ligne de la figure C15). D'autre part, on observe une intensité de fluorescence plus importante pour les cellules inflammatoires. Au niveau de leurs surnageant, on remarque la coexistence des amas des vésicules (agrégation) avec des vésicules nanométriques dispersées dans l'espace inter amas.

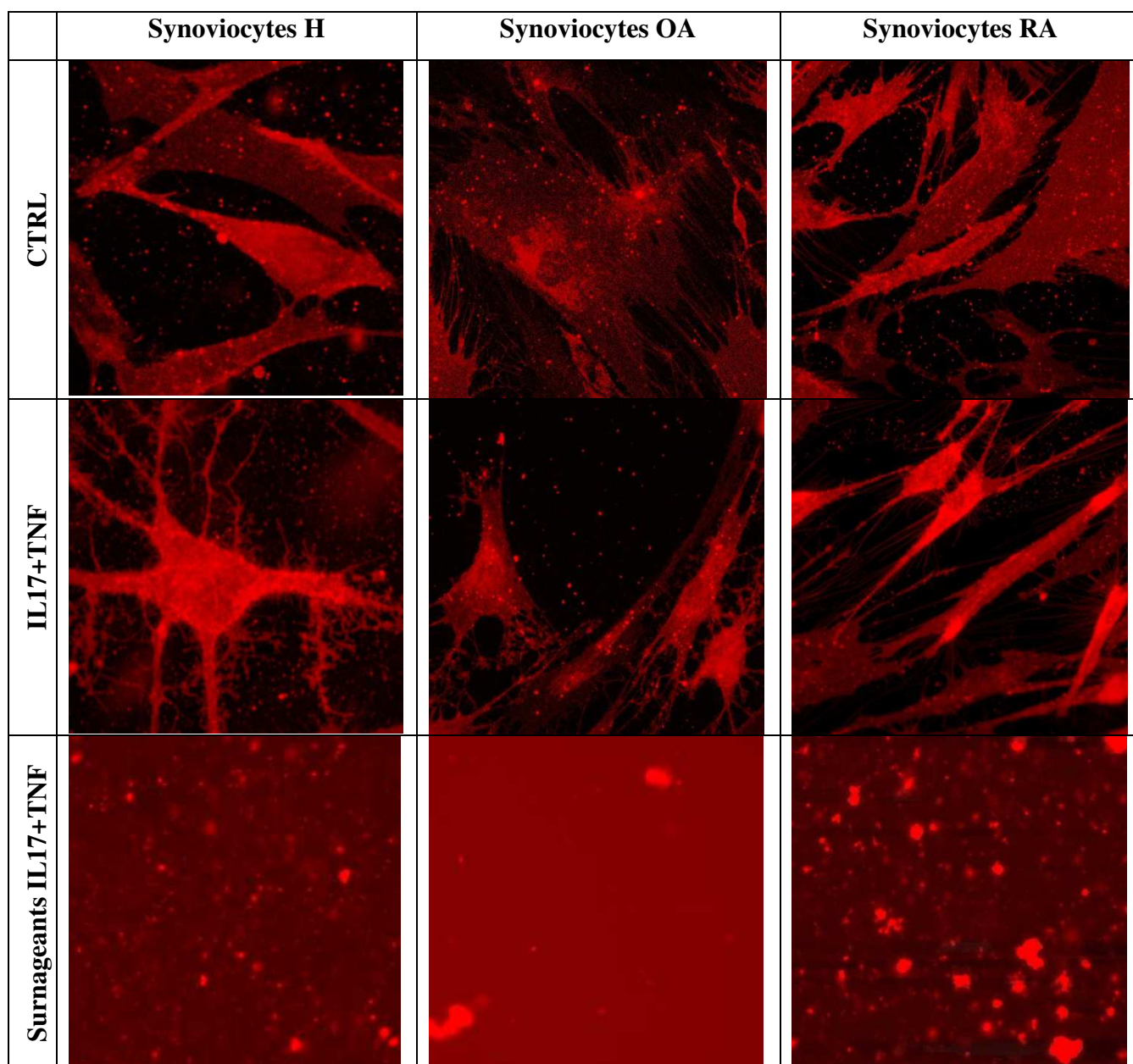


Fig. C15. Tableau présentant les images de microscopie confocale à fluorescence (marquage lipidique DiI) obtenues comparativement sur : première ligne - des cellules contrôles (sans ajout de cytokines pro-inflammatoires) ; deuxième et troisième ligne – cellules et surnageants obtenus en présence de cytokines pro-inflammatoires, respectivement. Colonne 1 – synoviocytes sains ; colonne 2 – synoviocytes arthrosiques, colonne 3 – synoviocytes arthritiques

En ce qui concerne les résultats mécaniques et tribologiques (figure C16) nous observons :

- une très grande rigidité des vésicules synthétisées par les synoviocytes sains par rapport à celles arthrosiques ou arthritiques (figure C16 A)
- une augmentation significative du coefficient de frottement et d'usure des interfaces lipidiques en présence des surnageants inflammatoires de type H et OA par rapport aux conditions non inflammatoires,
- un coefficient de frottement et une usure assez importante pour les interfaces lipidiques en présence des surnageants arthritiques. Pour ce cas, nous n'avons pas obtenu de différences significatives entre les surnageant des conditions inflammatoires (ajout d' IL17 et TNF) et non-inflammatoires (CTRL).

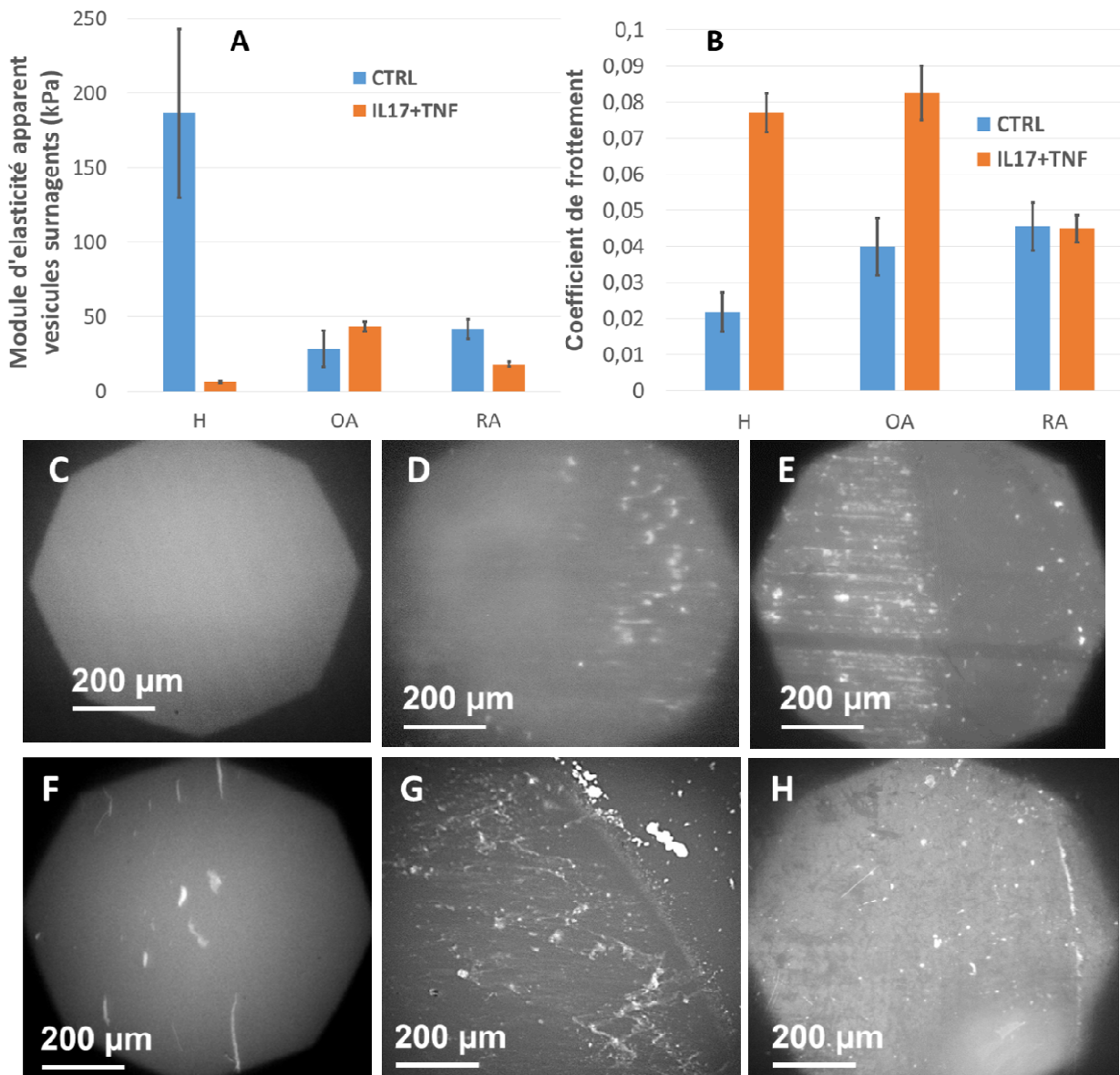


Fig. C16. Images de microscopie de fluorescence montrant l'usure des interfaces lipidiques (interface non usé = image claire et uniforme dans l'octogone de focalisation du microscope ; dégradations de l'interface = amas plus claires dans l'octogone de visualisation du microscope)

Par conséquent, tous ces résultats montrent que les vésicules lipidiques pourront être un biomarqueur d'une part pour identifier le type de pathologie (H, OA ou RA) et d'autre part déterminer l'impact d'un environnement inflammatoire sur le comportement tribologique et

donc en déduire les conséquences fonctionnelles sur l'articulation (incluant la qualité de l'effet de roulement des vésicules). Le but final étant de mieux cerner les paramètres nécessaires pour le développement d'un nouveau traitement intra-auriculaire similaire aux liquides synoviaux intégrant à la fois la viscosité optimale et l'effet de roulement par les vésicules. (Plus de détails sur l'aspect thérapeutique dans la thèse Samira Filali 2018)

C.4. Evaluer les conséquences sur l'usure des implants en utilisant des lubrifiants biomimétiques à base de vésicules lipidiques. (Travaux de thèse de Mirela Maria SAVA 2019, PFE Haifa HAKKOUNA, M2 Valentin Massardier 2016, M2 Ines Essefi 2017)

Cette étude a commencé par l'expertise des implants du genou (thèse Mirela Maria SAVA 2019) qui montrent deux types principaux de « mécanismes d'usure » in vivo. Ainsi, la figure C16 montre comparativement ces deux mécanismes d'usure détectés sur deux patients ayant une même type de prothèse (PUC – prothèse unicompartmentale du genou seulement sur le condyle interne du fémur) dans des conditions de fonctionnement semblables (patients de sexe féminin avec le même indice de poids corporel et ayant une pathologie de type dégénérative - arthrosiques prévu pour remplacement de l'implant à cause d'extension de l'arthrose sur le condyle fémoral non prothésé). Contexte présenté dans la figure C17 – en 2013 en France ont été implantées environ 90 000 prothèses du genou ce qui a représenté environ 1,2 milliards d'euros de dépenses pour la sécurité sociale.



Fig. C16. Schema du contexte des pathologies du genou (these Mirela Maria SAVA – prix de la meilleure these de la comision des materiaux pour la santé 2018)

Ainsi, ont été mise en évidence :

- 1) un mécanisme montrant un fort taux d'usure avec des petites particules d'usure et stries d'arrachement de matière et très peu de transfert du polyéthylène sur CrCo ; ce qui laisse penser à de l'usure abrasive,
- 2) un mécanisme montrant un taux d'usure dix fois plus faible que le cas précédent avec des grosses particules d'usure de polyéthylène (centaines de micromètres) et une couche de transfert du polyéthylène sur CrCo : ; ce qui laisse penser a de l'usure adhésive.

Ces deux types d'usure sont liés à un milieu biologique (liquide synovial) inflammatoire dans le premier cas et non inflammatoire dans le deuxième cas. Par la suite on a reproduit ces deux

types de mécanismes d'usure sur des simulateurs tribologiques afin de valider cette hypothèse.

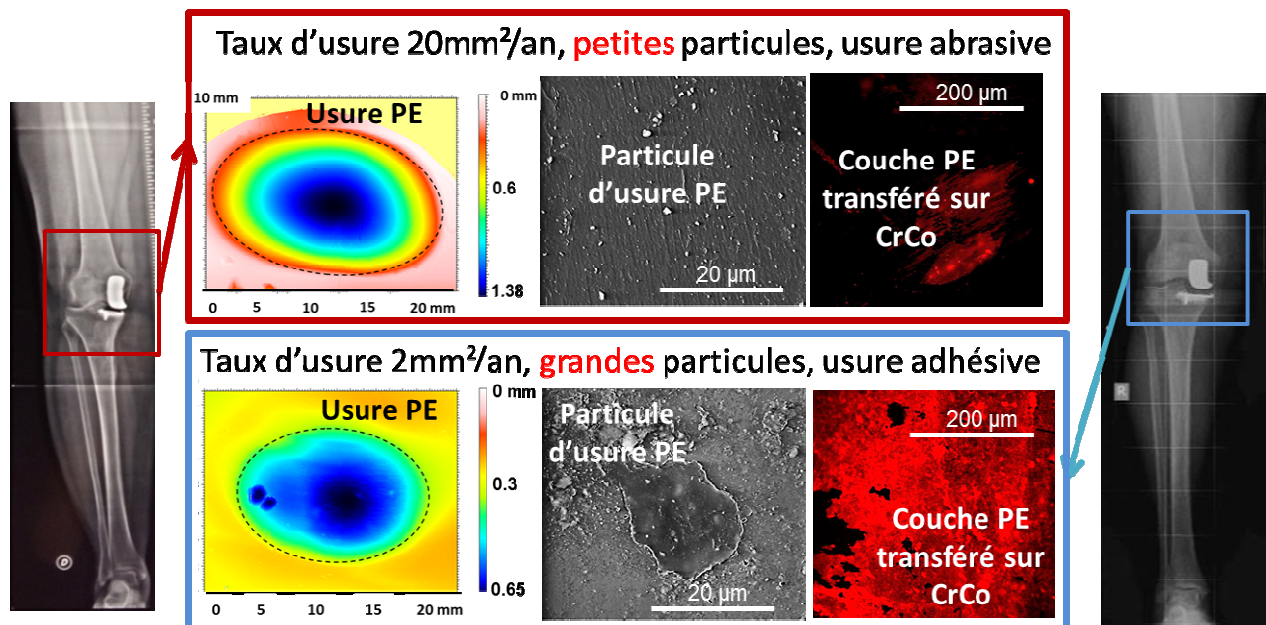


Fig. C16. Résultats des expertises des implants ayant fonctionné in vivo montrant deux mécanismes d'usure différentes (these Mirela Maria SAVA)

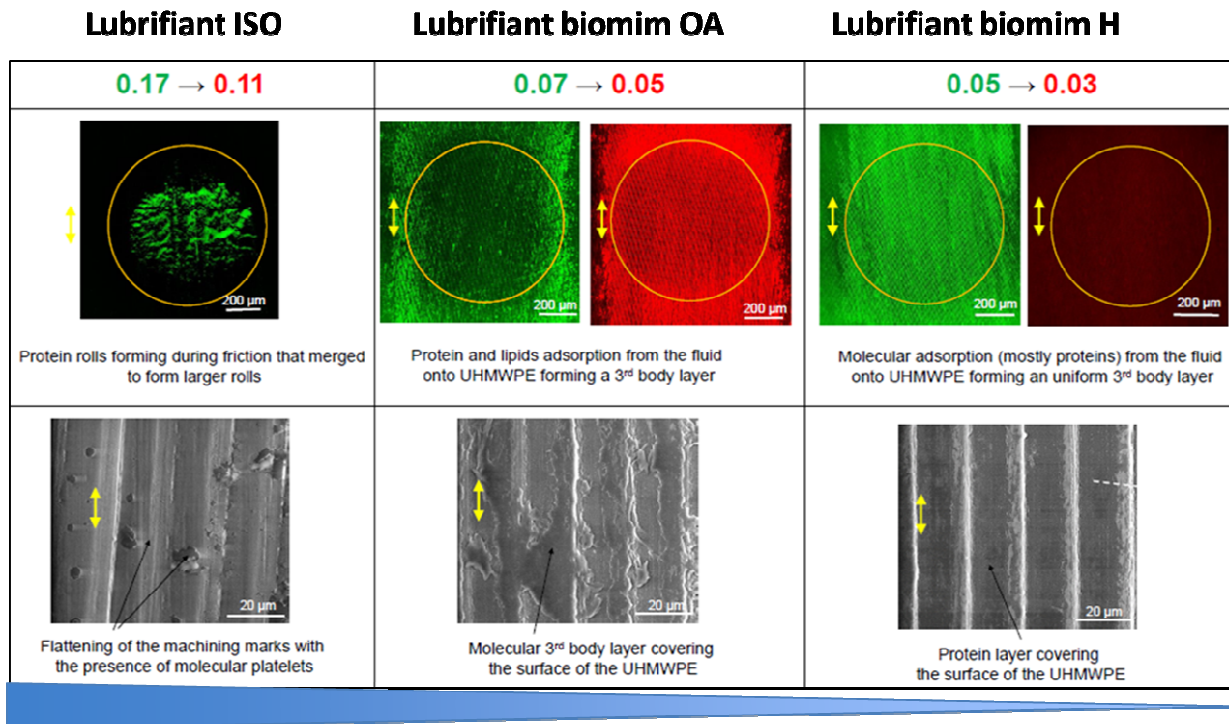
Ainsi, grâce au projet Carnonot TROPISME (pour les implants du genou) et à deux projets industriels INSAVALOR-TORNIER (un sur la prothèse d'hache double mobilité et l'autre sur la prothèse d'épaule) nous avons commencé à mettre au point des lubrifiants biomimétiques en accord avec la norme ISO des implants articulaires.

Pour cela, nous avons utilisé, dans une première étape, le lubrifiant ISO des implants qui est le sérum bovin et notre lubrifiant biomimétique du liquide synovial sain « gel in » utilisant des lipides de type DPPC (lubrifiant biomimétique H). Afin de respecter la norme ISO nous avons ensuite synthétisé un lubrifiant dérivé du sérum bovin mais en rajoutant les éléments manquants : acide hyaluronique et phospholipides afin de reproduire une structure et une composition semblable à un liquide synovial arthrosique (lubrifiant biomimétique OA).

Les résultats ont montré des différences de frottement et d'usure significatives entre ce lubrifiant biomimétique et le lubrifiant standard (sérum bovin). Ainsi, la figure C17 extraite de la référence [Sava, B. Munteanu, E. Renault, Y. Berthier, A.M. Trunfio-Sfarghiu, *Tribological Analysis of UHMWPE Tibial Implants in Unicompartamental Knee Replacements: From Retrieved to In Vitro Studies, Biotribology 13 (2018) 1–15*] montre que :

- l'absence des phospholipides et de l'acide hyaluronique qui sont les deux composants lubrifiants du liquide synovial génère une forte usure des surfaces en polyéthylène des implants PUC avec de petites particules semblables au cas d'usure abrasive observé in vivo (première colonne de la figure C17),
- l'adsorption d'une fine couche lipoprotéique sur les surfaces en polyéthylène des implants PUC permet le piégeage des vésicules lipidiques dans les stries des rugosités des implants PUC ce qui diminue significativement leur usure (troisième colonne figure C17),
- dans le cas du lubrifiant biomimétique OA on constate une usure modérée avec une couche mixte polyéthylène-molécules biologiques. Cette couche semble à pouvoir se détacher sur certaines contraintes tribologiques et former la couche de transfert

observé dans le cas de l'usure adhésive observée *in vivo* (deuxième colonne figure C17)



Diminution de l'usure / augmentation de l'adsorption des molécules biologiques

Fig. C16. Résultats montrant l'importance du lubrifiant sur le mécanisme d'usure des surfaces polymères d'implants articulaires (extraite de la référence [SAVA2018])

Pour vérifier si en utilisant le lubrifiant biomimétique OA et les bonnes conditions de sollicitations tribologiques nous obtenons l'usure adhésive observée *in vivo*, nous avons utilisé le simulateur PeDeBa du LaMCoS que nous avons adapté afin de pouvoir accueillir l'implant PUC et reproduire les sollicitations d'une articulation du genou. Les résultats montrent l'obtention d'une couche de transfert mixte polyéthylène / lipides + protéines ce qui confirme le même type de mécanisme d'usure adhésive que celui obtenu *in vivo* (figure C18 extraite du poster qui a été primé comme le meilleur poster étudiant de la conférence de biotribology ICoB 2018 Canada)

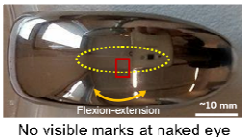
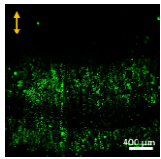
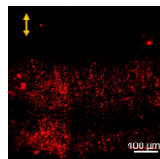
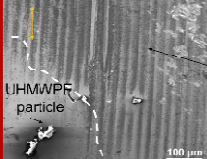
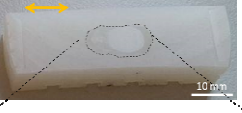
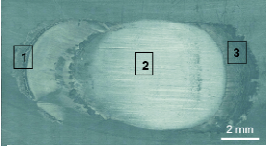
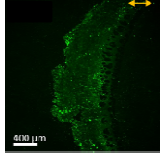
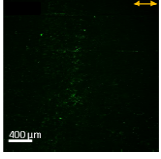
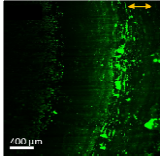
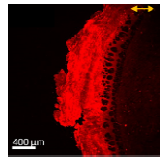
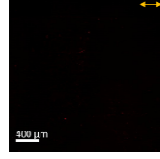
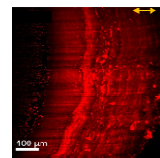
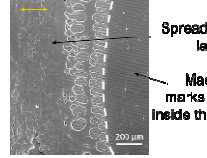
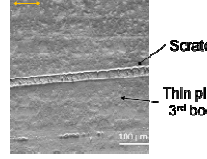
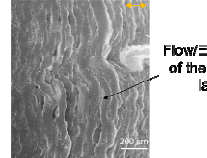
Implant	Proteins visualization	Phospholipids visualization	Surface characterization by SEM
CoCr femoral implant 			
UHMWPE tibial implant Friction direction   Worn area shape of symbol '∞' Three areas of interest: (1) Edge of worn area I (2) Center of worn area (3) Edge of worn area II μ from 0.09 to 0.06 Volumetric wear rate: 2.96 mm³/10⁴ cycles	1   	  	  

Fig. C17. Résultats montrant reproduction du mécanisme d'usure adhésive observé sur les implants PUC in vivo de manière ex vivo en présence du lubrifiant biomimétique OA (extraite de la référence [SAVA2018])

Afin de étudier si ce lubrifiant biomimétique OA peut expliquer des différences entre l'usure estimée ex vivo et l'usure mesurée *in vivo* sur certains implants nous avons effectué deux projets industriels en étroite collaboration avec l'industriel TORNIER. Le but a été de comprendre les différences significatives observées in vivo par rapport aux estimations ex vivo des usures des différents couples des matériaux des implants :

- 1) un premier projet industriel visait à comprendre l'usure des implants double mobilité de hanche afin de répondre à la question : la cupule le polyéthylène réticulé ou enrichi en vitamine E présent-t-elle une plus faible usure que le polyéthylène standard des implants articulaires ? (PFE Haifa HAKKOUNA et M2 Ines Essefi),
- 2) un deuxième projet industriel visait à comprendre l'usure des implants d'épaule afin de répondre à la question : le pyrocarbone est mieux que le CrCo en termes d'usure de la contre face en polyéthylène standard ? (M2 Valentin Massardier 2016).

Ainsi, nous avons, au cours de ces deux projets (2015-2017), utilisé des lubrifiants biomimétiques OA synthétisés pour des tests l'usure des implants sur les simulateurs de marche Tornier. Ainsi on a montré qu'en présence du lubrifiant biomimétique OA :

- 1) l'usure du polyéthylène dopé à la vitamine E était négligeable par rapport à l'usure du polyéthylène standard. Ces données présentées à la conférence d'orthopédie SOO 2016 [Hulet2016] sont en accord avec l'observation clinique *in vivo* et en désaccord avec des résultats obtenues sur le simulateur de marche en présence du lubrifiant standard ISO implant (sérum bovin) (usure 5 fois plus importante pour le polyéthylène standard).
- 2) l'usure du polyéthylène en contact avec une tête de prothèse d'épaule en PyC est inférieure à celles obtenue en contact avec une tête de prothèse d'épaule en PyC. La différence d'usure massique (figure C19A) obtenue pour 5 millions de cycles n'est pas encore significative du fait du faible nombre d'échantillons analysés et de la faible durée des tests, mais, les résultats en mécanisme de frottement permettent de montrer des différences

significatives et notamment sur l'adsorption importante des vésicules lipidiques sur la surface du PyC (figure 2B) ce qui pourra diminuer significativement l'usure à plus long terme.

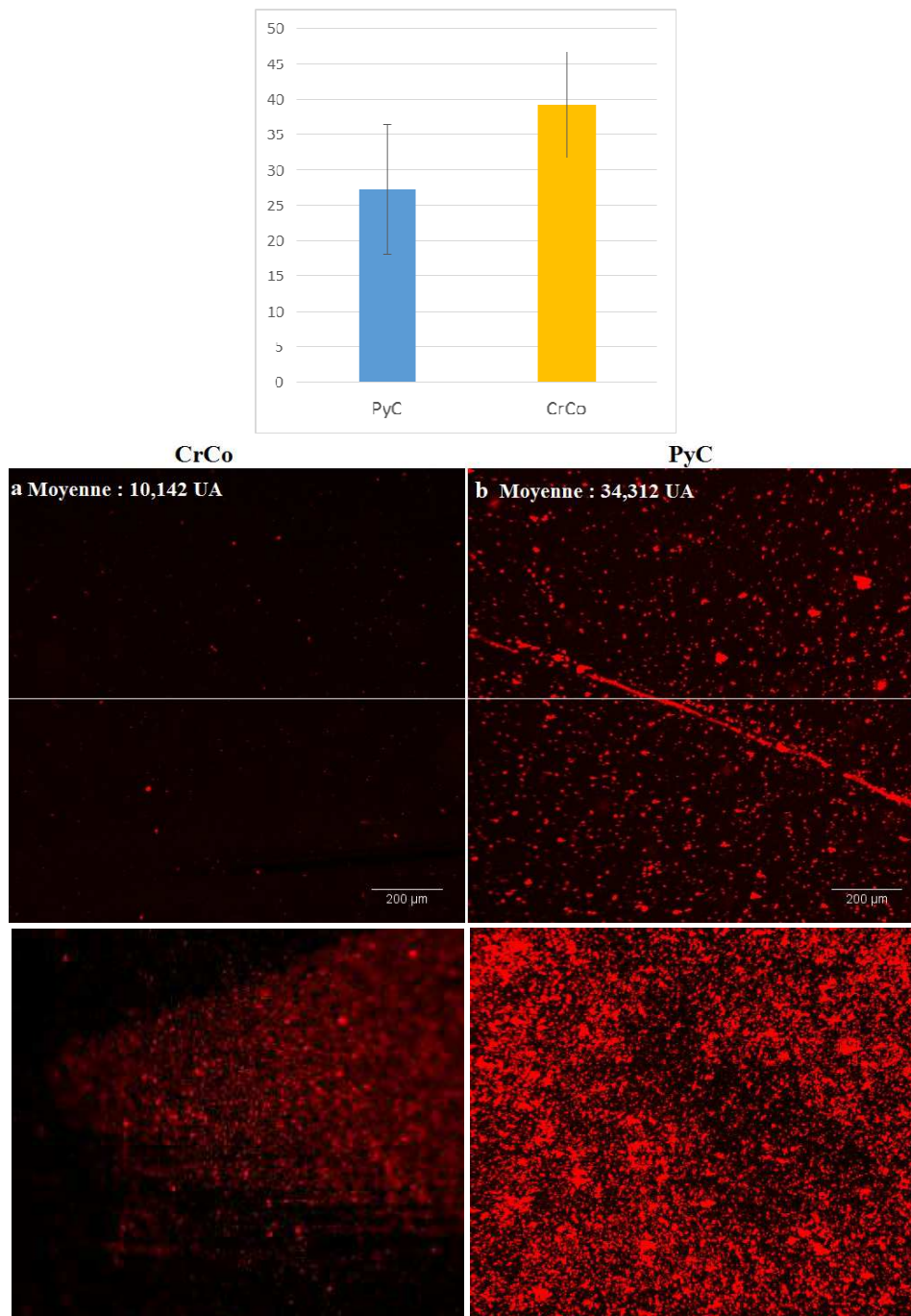


Fig. C19. Résultats tribologiques après 5 millions de cycles de marche : première ligne - usure du polyéthylène (mg) ; deuxième ligne : dépôts lipidiques (rouge) sur la surface des prothèses dans les zones non frottées ; troisième ligne : dépôts lipidiques (rouge) sur la surface des prothèses dans les zones non frottées

Ces résultats confirment l'importance du lubrifiant biomimétique OA dans l'obtention des résultats d'usure des implants articulaires comparables avec les résultats *in vivo*.

Dans ce sens, nos études actuelles (projet Région Bio-tribo-Mineralogie 2018-2021) vise à agir sur les normes de réalisation des essais de qualification des implants en les rendant plus représentatives de la réalité en utilisant des lubrifiants biomimétiques OA ou RA. Ceci aura des conséquences socio-économiques très importantes en :

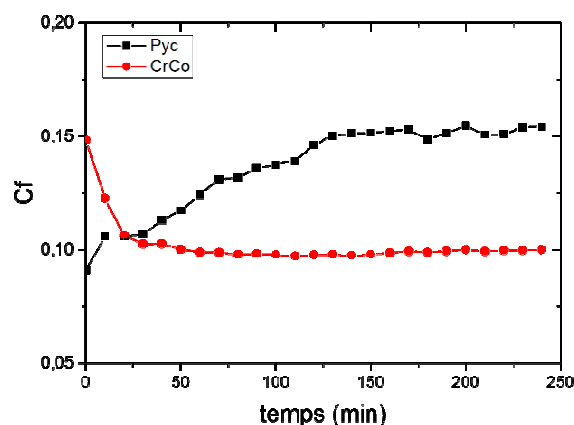
- réduisant les temps de conception et de mise sur le marché de nouveaux implants,
- permettant une optimisation, mécanique et biologique, raisonnée de la réalisation des surfaces frottantes afin de favoriser la biolubrification *in vivo*,
- réduisant significativement les arthroplasties de remplacement, toujours très handicapantes et coûteuses,
- apportant des conseils sur le choix des implants aux chirurgiens par une approche de médecine personnalisée.

C.5. Evaluer les conséquences sur le frottement et l'usure du cartilage en utilisant des lubrifiants biomimétiques à base de vésicules lipidiques. (Travaux de thèse de Ghassene Ouenzerfi 2019, stage Gregoire Aldebert 2016, collaboration l'industriel Tornier et Rush University Medical Center)

Dans un premier temps, en poursuivant nos recherches avec l'industriel Tornier (thèse CIFRE Ghassene Ouenzerfi 2019) nous nous sommes intéressé à développer une expérimentation nous permettant de comprendre pourquoi le cartilage articulaire, en présence des implants en PyC, s'use moins *in vivo* que le cartilage frottant contre des implants en CrCo [Cook SD 1989]. Ainsi, dans une première étape, nous avons voulu comprendre quel est le mécanisme de frottement des deux matériaux en contact avec notre modèle du cartilage articulaire (hydrogel HEMA) et en présence du lubrifiant biomimétique OA déjà utilisé sur le simulateur de marche en configuration épaule.

Ainsi deux séries d'essais de frottement ont été faites sur notre bio-tribomètre en configuration « contact modèle articulaire » en remplaçant le verre par les deux matériaux des implants (CrCo et PyC) et en visualisant le contact à travers l'échantillon de HEMA qui est transparent. Les résultats (figure C20 montrent) :

- un coefficient de frottement qui diminue pour le contact HEMA / CrCo pour se stabiliser après environ 1h de frottement à une valeur de 0.08 (figure C20 A). En visualisant le contact on comprend que la diminution du coefficient de frottement est due à l'éclatement des vésicules lipidiques sur la surface CrCo et à la formation d'une couche lipoprotéique qui accommode la différence des vitesses en localisant le glissement à l'intérieur de cette couche (figure C20 B et C),
- un coefficient de frottement qui augmente pour le contact HEMA / PyC pour se stabiliser après environ 4h de frottement à une valeur de 0.15 (figure C20 A). En visualisant le contact on comprend que l'augmentation du coefficient de frottement est due à l'adsorption des vésicules lipidiques sur la surface PyC et la formation d'une couche vésiculaire qui accommode la différence des vitesses par roulement dans cette couche (figure C20 D et E).



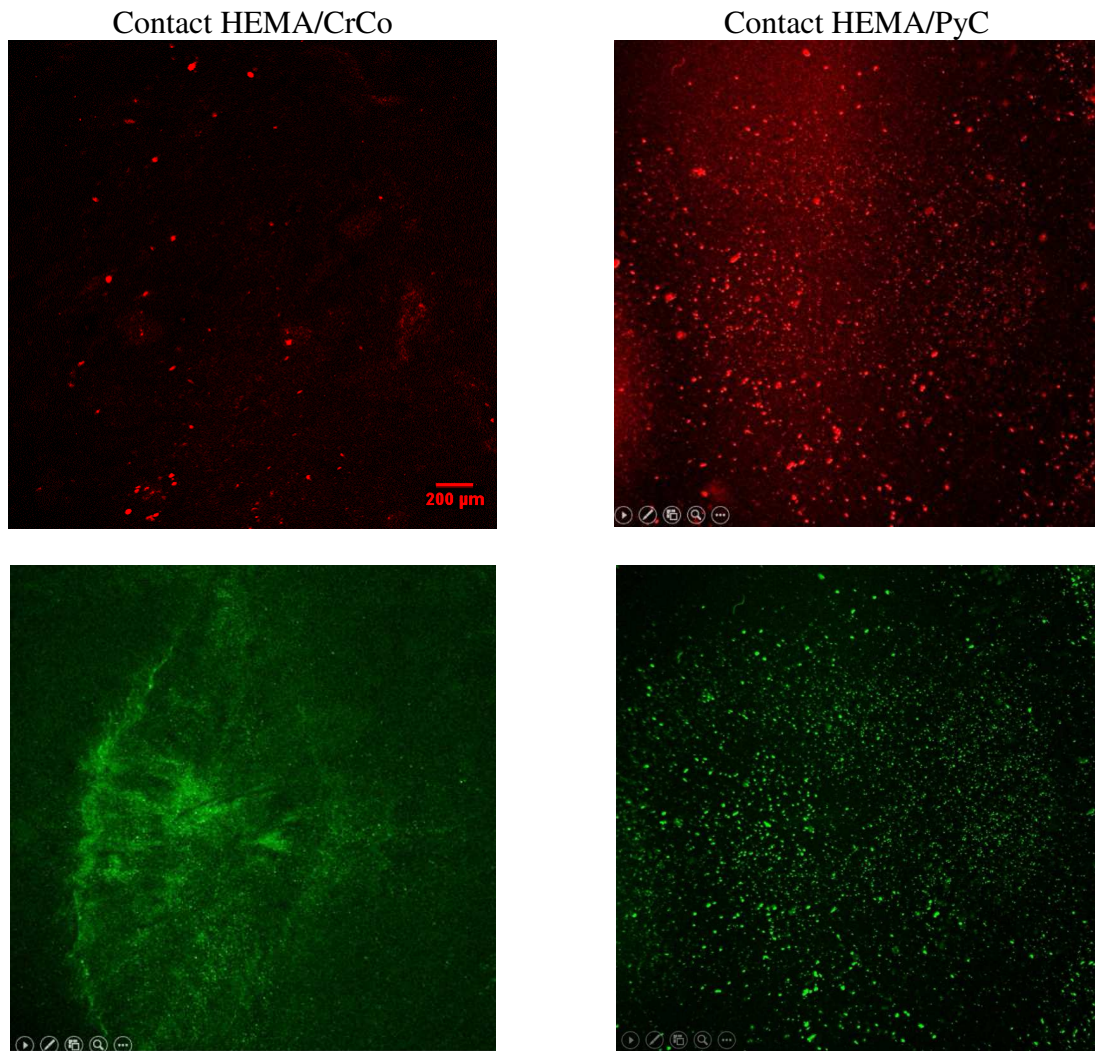


Fig. C20. Résultats tribologiques après 4h de frottement : première ligne – évolution des coefficients de frottement ; deuxième ligne : visualisation in situ du contact avec marquage fluorescent sur les lipides (rouge); troisième ligne : visualisation in situ du contact avec marquage fluorescent sur les protéines (vert)

Ces résultats montrent une structure des complexes de surface très différentes entre ceux du CrCo et du PyC avec une transmission de contraintes par roulement du côté PyC et par glissement du côté CrCo. Malgré un plus fort coefficient de frottement enregistré pour les surfaces PyC on constate que la structure du lubrifiant reste intacte après 4h de frottement dans le cas du PyC. Par contre dans le cas du CrCo les vésicules lipidiques du lubrifiant sont éclatées et une couche principalement protéique est formée par frottement ce qui s'approche plus d'un mécanisme de frottement classique obtenu avec le lubrifiant ISO des implants. Cela peut expliquer les résultats *in vivo* qui montrent une plus faible usure des cartilages articulaires en présence de PyC.

Pour valider ces résultats nous collaborons depuis 2016 avec Rush University Medical Center qui disposent d'un bioréacteur qui permet d'étudier l'usure du cartilage maintenu vivant et en contact avec différents matériaux d'arthroplastie. Un premier travail commun a été d'adapter notre lubrifiant biomimétique afin de garantir le maintien en vie du cartilage tout en se rapprochant le plus possible du lubrifiant biomimétique des articulations synoviales.

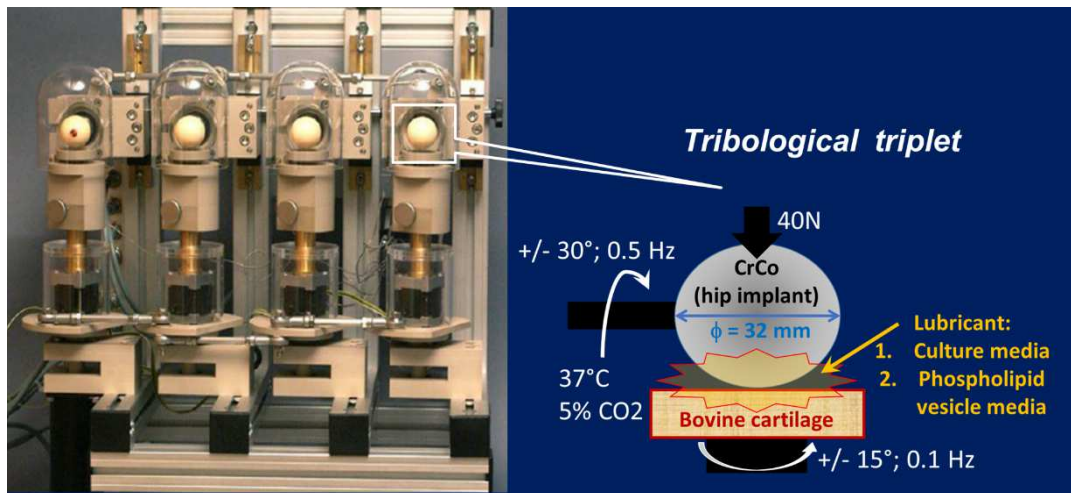


Fig. C20. Photo et schéma de la configuration expérimentale du bioréacteur de Rush University

Pour cela, nous sommes partis du milieu de culture – le lubrifiant classique utilisé à Rush University Medical Center auquel nous avons rajouté les composants lubrifiants : l'acide hyaluronique et les vésicules lipidiques lubrifiantes dans une configuration de « gel in » (figure C21)

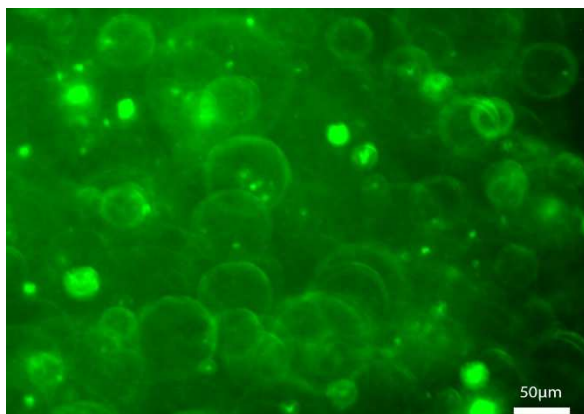


Fig. C21. Visualisation en microscopie à fluorescence des vésicules lipidiques utilisées comme lubrifiant sur le bioréacteur de Rush et obtenues d'après la recette de synthèse « gel in » du LaMCoS

Les premiers résultats montrent que la viabilité des cellules du cartilage est augmentée en présence de ce nouveau lubrifiant à base des vésicules lipidiques, on passe du $49.5\% \pm 5\%$ viabilité enregistré avec le milieu de culture classique à $62\% \pm 8\%$ viabilité enregistré avec le nouveau lubrifiant. (ref . Lubricants 2018, 6, 19; doi:10.3390/lubricants6010019)

Des études en cours (thèse d'Amira Hannoun) en collaboration avec Tornier et Rush University Medical Center visent à comprendre les mécanismes d'usure des cartilages *in vitro* (bioréacteur Rush et LaMCoS) et *in vivo* (expertises des complexes de surface lipidiques des implants d'épaule hemi-artroplastie de l'épaule en CrCo et PyC ainsi que de l'usure des cartilages de la glène)

Chapitre D.

Cartilage : l'équilibre biologique garant des performances tribologiques

Le cartilage articulaire est un tissu mou qui recouvre les surfaces des os s'articulant entre eux. Son épaisseur varie de 0,5 à 5 mm [Mow V. C. 1992]. La loi de Sappey et de Rouvière considère que l'épaisseur du cartilage articulaire est proportionnelle à la pression normale subie et pour une même pression, elle est inversement proportionnelle à l'aire de contact [Mansat. M. 2009]. Donc, les articulations soumises à des pressions mécaniques élevées sur une aire de contact petite ont le plus d'épaisseur du cartilage. Ainsi, dans les articulations du corps humain, le cartilage articulaire le plus épais (7mm) est situé au niveau de la rotule (contact fémoro-patellaire).

Macroscopiquement, à l'ouverture d'une articulation, le cartilage articulaire apparaît blanc nacré, avec la transparence du verre d'où son nom de cartilage hyalin (figure D1a)

Cet aspect macroscopique est donné par sa grande hygrophilie, on pourra le considérer comme un hydrogel translucide composé à 80% volumique (70% massique) d'eau. Ce caractère fortement hydrophile est dû à des assemblages moléculaires de type glycoprotéiques appelés aggrécane qui représente environ 20% de la masse séchée du cartilage. Un autre composant important du cartilage sont les protéines de type collagénique qui représentent environ 50% de la masse séchée du cartilage. Ces molécules collagéniques sont principalement constituées de collagène du type II, molécules capables de se rassembler pour former des arceaux de renforcement – fibres ancrées perpendiculairement dans les tissus osseux et parallèles à la surface flottante. Pendant le vieillissement, la quantité des fibres du cartilage devient plus importante et prend la place des aggrécane ce qui fait que l'aspect macroscopique du cartilage devient blanc jaunâtre (figure D1b).



A. Surface du cartilage articulaire sain : hyalin – visualisation du liquide qui sort à une légère compression à travers une lame de verre sur un cartilage de genou sain (largeur image = 2 cm)



B. Surface du cartilage articulaire en début d'arthrose : perte du caractère hyalin, visualisation des fibres sur un cartilage de genou arthrosique (largeur image = 2 cm)

Figure D1 Image d'un cartilage hyalin (A) par rapport à un cartilage fibreux (B)

L'équilibre entre la quantité des fibres et d'aggrécane est imposé par la synthèse cellulaire. En effet, les cellules du cartilage (les chondrocytes) sont en très faible quantité (seulement 1% du volume du cartilage adulte). Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuse, c'est-à-dire, des cellules souches présentes en grande quantité dans le mésenchyme de l'embryon et en faible quantité chez l'adulte, dans la moelle osseuse. *In vivo*, les chondrocytes ont une morphologie typiquement ronde et régulière, un diamètre de 10 à 40µm, englobés dans la matrice cartilagineuse.

Les cellules sont isolées les unes des autres de sorte que les contacts cellule/cellule sont absents, au profit de nombreux contacts cellule/matrice. Par conséquent, le chondrocyte est sensible aux modifications de la matrice extracellulaire qui lui sont transmises via des récepteurs, molécules transmembranaires, eux-mêmes en contact avec les molécules

matricielles. Leur taille, forme et densité dépendent de la profondeur ainsi que de la contrainte mécanique qu'elles subissent. Dans la zone superficielle, ils sont allongés selon l'orientation des fibres collagènes et dans la direction des contraintes de cisaillement, ils sont métaboliquement peu actifs. Dans la zone de transition les chondrocytes sont sphériques et distribués de manière aléatoire, subissant une contrainte mécanique distribuée de manière isotrope sur leur surface. Dans la zone profonde, ils forment des colonnes perpendiculaires à la surface de l'os sous-chondral, colonnes parallèles aux travées osseuses et aux contraintes normales transmises par l'os.

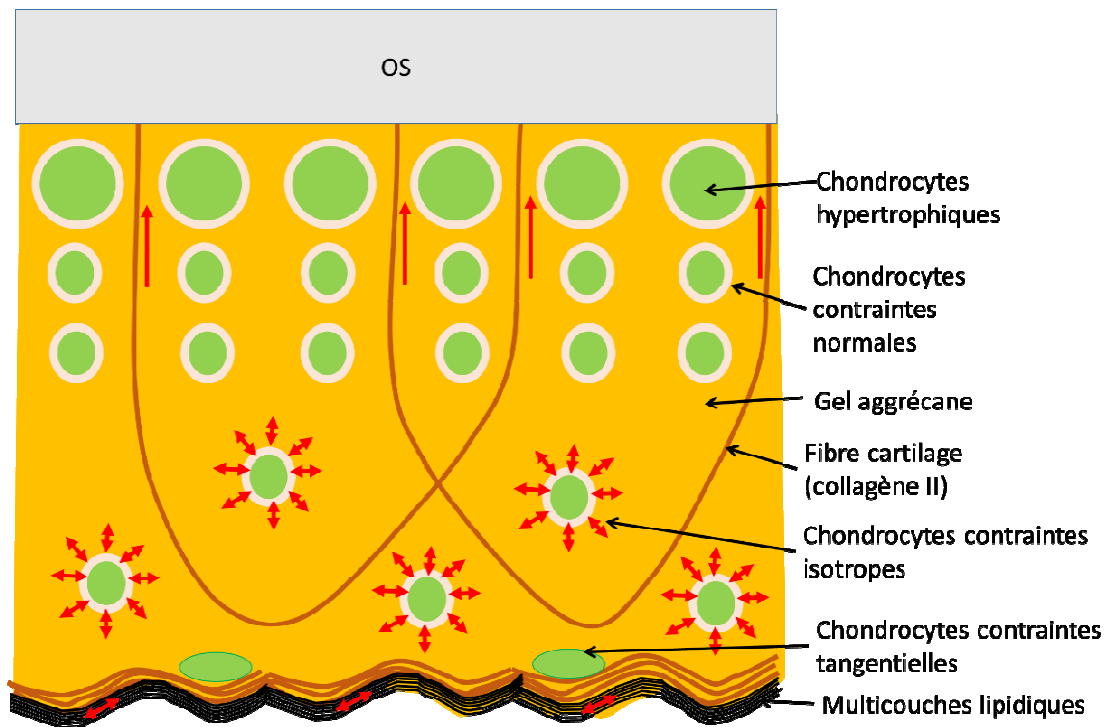


Figure D2 Schéma de la structure du cartilage articulaire. Les flèches rouges indiquent les directions de transmission des contraintes mécaniques

Les chondrocytes sont à la fois les cellules qui sécrètent les macromolécules matricielles (et les enzymes nécessaires à leur maturation) et les cellules qui sécrètent les enzymes responsables de leur dégradation, comme les métalloprotéines. Les chondrocytes régulent donc l'équilibre entre anabolisme et catabolisme en fonction des informations du milieu extérieur qu'ils intègrent. Ces informations peuvent être sous la forme de

- 1) facteurs biochimiques qui diffusent dans la matrice extracellulaire (facteurs de croissance et cytokines ...) qui contrôlent la différenciation des chondrocytes dans différentes zones (cartilage de croissance par exemple)
- 2) de contraintes mécaniques et de déformations subies au niveau cellulaire qui contrôlent la synthèse et notamment la fraction aggrécane / fibre. Ainsi si la contrainte est perçue de manière isotrope sur la surface de la cellule elle va synthétiser plus d'aggrécane, tandis que si la contrainte est perçue de manière unidirectionnelle la cellule va synthétiser plus des fibres selon la direction de la contrainte.

Les chondrocytes ne répondent pas directement aux variations des signaux mécaniques imposés directement à la cellule, ils répondent plutôt aux changements de leur environnement. Ainsi, il est connu que les charges cycliques transmises via un environnement 3D (type hydrogel) augmentent la pression interne du chondrocytes rapidement et causent des pics courts de flux liquide cellule / matrice extracellulaire sans perte de liquide intracellulaire

ce qui, en général, stimulent la biosynthèse cellulaire. Par contre, les charges statiques de plus longue durée, chassent du liquide de la cellule, provoquant une augmentation de l'osmolarité ainsi qu'une chute de pH ce qui provoque une diminution de la synthèse cellulaire pouvant aller jusqu'à produire la mort cellulaire. D'autre part, si la cellule est sortie de son environnement 3D et si elle est obligée de se développer sur une surface (par exemple dans une culture cellulaire 2D), elle produira de plus en plus de fibres et générera du cartilage fibreux.

Par conséquent dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à comprendre comment :

- 1) les changements biologiques (suppressions des récepteurs transmembranaires) modifient la mécanotransduction du chondrocyte et les propriétés mécaniques et physicochimiques du cartilage synthétisé (réponses mécaniques aux contraintes biologiques),
- 2) la transmission des contraintes mécaniques à travers différents biomatériaux de cultures cellulaires influence la synthèse des chondrocytes (réponses biologiques aux contraintes mécaniques),
- 3) développer des matériaux d'implant capable de rééquilibrer la mécanotransduction des chondrocytes *in vivo* et favoriser l'autoréparation du cartilage.

D.1. Réponses mécaniques aux contraintes biologiques

Ces recherches ont été réalisées en étroite collaboration avec l'équipe d'ingénierie tissulaire du cartilage de LBTI Lyon (master Jonathan Bariller 2009, thèse Carole Bougault 2009).

Ainsi l'objectif de cette étude est de détecter des modifications des propriétés mécaniques et/ou physicochimiques du cartilage de côtes d'embryons de souris génétiquement modifiées. La mutation que l'on a étudiée entraîne la suppression de l'intégrine $\beta 1$, molécule considérée comme une molécule essentielle dans la mécanotransduction du chondrocyte.

Ainsi des cartilages sont prélevés sur des côtes d'embryons de souris (17,5 jours de gestation) qui ont été soumis à une mutation génétique d'ablation du gène qui synthétise l'intégrine $\beta 1$. Des tests biologiques ont été faits sur un même porteur des embryons afin de détecter les mutants (absence du gène de la synthèse de l'intégrine $\beta 1$) et ceux qui sont sains (avec le gène intégrine $\beta 1$). Des analyses biologiques structurales (immuno-histologique) ont aussi été effectuées afin de détecter des changements dans la synthèse du collagène II et aggrécane. Ces analyses ne mettent pas en évidence de défauts de la matrice cartilagineuse dus à la suppression de l'intégrine $\beta 1$, on a juste observé une légère différence au niveau cellulaire : la densité cellulaire semble plus faible chez les mutants ainsi et les cellules mutantes sont plus rondes (fig. D2)

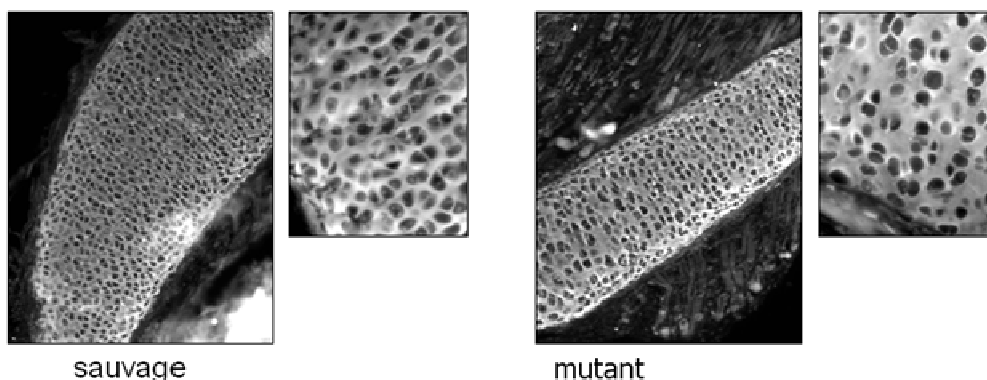


Fig. D2. Coupe transversale de côtes : visualisation en blanc du collagène de type II (de la matrice extracellulaire). En négatif, en noir, on voit les cellules : il y en a moins dans les côtes mutantes et elles sont plus rondes (figure extraite de la publication [Bougault C. 2013])

Notre but a donc été de voir si malgré ces différences biologiques non-significatives de la structure on pouvait détecter des variations des propriétés mécaniques et physicochimiques. Ainsi en développant des analyses mécaniques et physicochimiques à grande résolution (rhéologiques couplées à la diffusion de fluorescence) nous a permis de caractériser le tissu cartilagineux qui a subi des altérations biologiques (absence de la molécule « intégrine $\beta 1$ »). Les résultats de ces analyses montrent que malgré des dosages biochimiques similaires on observe des différences significatives des propriétés mécaniques et physicochimiques du tissu sain par rapport au tissu ayant subi des altérations biologiques. Ces différences tissulaires globales ont été reliées aux conditions locales du contact cellule / matrice extracellulaire grâce aux analyses multi échelle (en spectroscopie de force atomique, micropipette) et à des modélisations (numériques de type élément finit et analytiques de type viscoélastiques). Ces moyens pourront être utilisés dans le futur pour la détection précoce des altérations de la transmission mécanique tissu / cellule (détection précoce des causes des pathologies).

Ainsi, on a enregistré des différences significatives entre les propriétés mécaniques et physicochimiques globales des deux types de cartilages :

- les cartilages mutantes sont ~ 1.6 fois plus rigides que les cartilages sauvages (figure D3),
- le coefficient de diffusion d'un marqueur fluorescent (fluorescéine-dextran 70kDa) solubilisé dans l'eau de la matrice extracellulaire des cartilages mutantes est ~ 0.8 fois la diffusion du même marqueur dans la matrice extracellulaire des cartilages sains (figure D4).

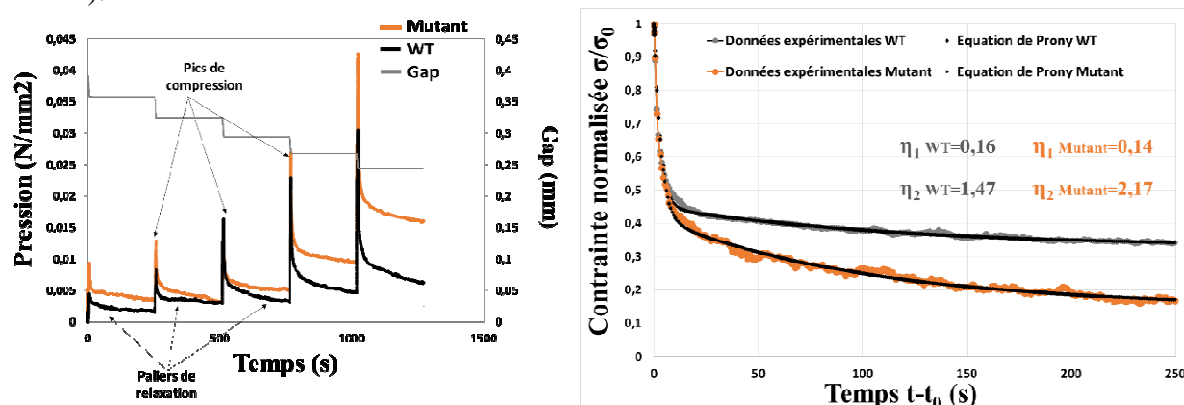


Fig. D3. Synthèse des résultats mécaniques montrant une différence significative entre le comportement mécanique et physicochimiques des cartilages sains (WT) et pathologiques (mutant : ayant subi l'ablation de la molécule « intégrine $\beta 1$ »)

Ces différences globales nous amènent à proposer deux hypothèses :

1) les différences globales sont dues principalement à des différences locales entre les propriétés mécaniques des cellules mutantes par rapport aux sauvages. En effet, aucune différence structurale n'a pu être enregistrée dans la composition biomoléculaire de la matrice extracellulaire. La différence de diffusion globale de la matrice extracellulaire pourra être expliquée par les cellules qui font plus obstacle à la diffusion dans le cas mutant que dans le cas sauvage. Pour valider ou non cette hypothèse nous avons mesuré les propriétés mécaniques des cellules en utilisant la méthode d'aspiration en micropipette. La figure D5 montre les images comparatives entre d'un essai d'aspiration en micropipette (collaboration Jean-Paul Rieu de ILM) et la simulation numérique ABAQUS de la partie expérimentale (images du milieu). Les résultats montrent que les différences mesurées entre les modules d'élasticités des cellules saines (WT) et pathologiques (mutant: absence de la molécule « intégrine $\beta 1$ ») peuvent être expliquées juste par un coefficient de frottement qui diffère entre la cellule et la micropipette dans les deux cas (image droite –fig D5)

2) les différences globales sont dues principalement aux propriétés de l'interface cellule / matrice extracellulaire différentes dans le cas mutant par rapport au cas sauvage. En effet, sachant que la molécule intégrine $\beta 2$ est une molécule d'accroche entre le cytosquelette cellulaire et les fibres de la matrice extracellulaire, on peut imaginer que la suppression de cette molécule fait que le tissu cartilagineux mutant se comporte comme un matériau composite à deux phases : cellules qui sont des bille incluses dans une matrice sans liaisons fortes avec cela ce qui fait que la déformée globale du tissu est reprise plus par des mouvements relatifs des deux phases que par des déformées d'ensemble des deux phases (cas du cartilage sauvage) (figure D7). Pour valider cette hypothèse nous avons mesuré les propriétés mécaniques d'adhésion locale des cellules par spectroscopie de force atomiques en utilisant un nano-indenteur micrométrique (bille de verre) qui permet de mimer aussi l'interface micropipette / cellule (figure D6).

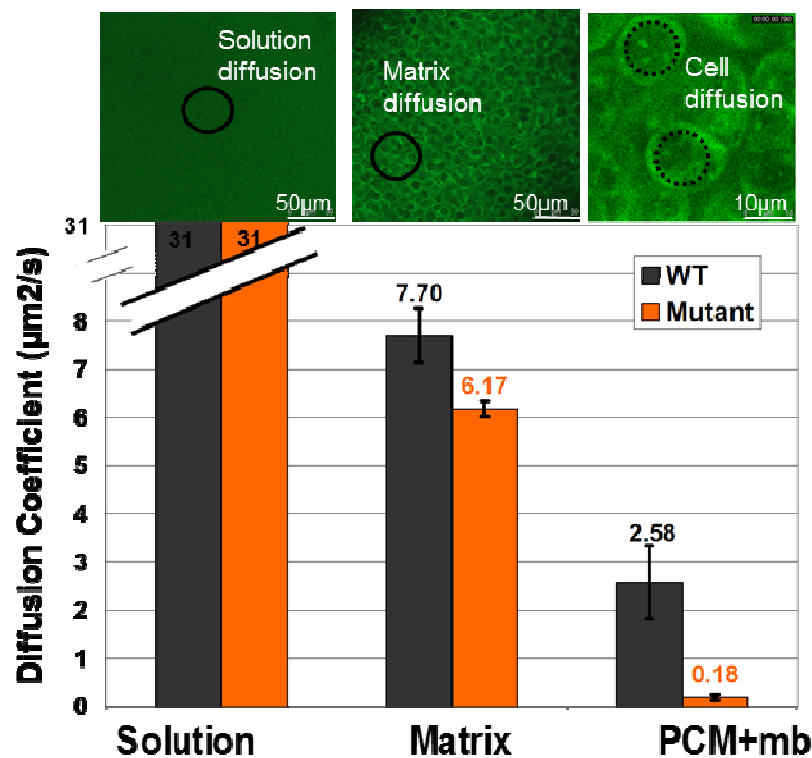


Fig. D4.. Synthèse des résultats physicochimiques montrant une différence significative entre le comportement mécanique et physicochimiques des cartilages saines (WT) et pathologiques (mutant : ayant subis l'ablation de la molécule « intégrine $\beta 1$ »), surtout au niveau cellulaire

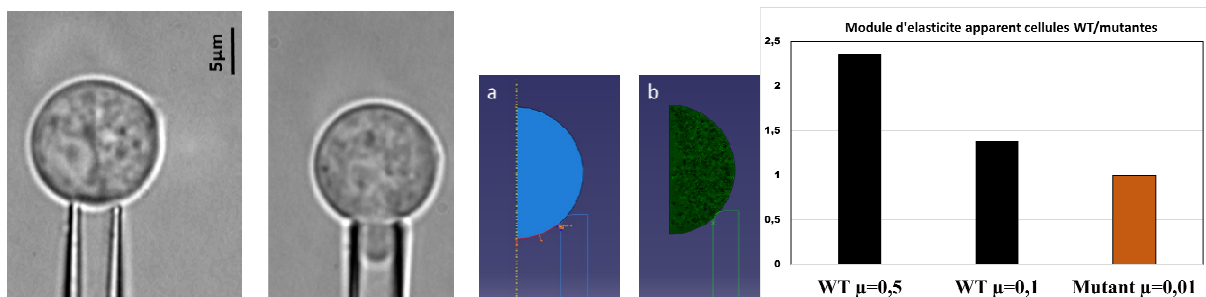


Fig. D5. Visualisation d'un essai d'aspiration en micropipette des cellules afin de déterminer leurs propriétés mécaniques (les deux images à gauche), simulation numérique ABAQUS de la partie expérimentale (images du milieu). Les différences mesurées entre les modules d'élasticités des cellules saines (WT) et pathologiques (mutant: ayant subis l'ablation de la molécule « intégrine $\beta 1$ »), s'explique juste par le coefficient de frottement qui diffère entre la cellule et celui de la micropipette dans les deux cas (image de droite)

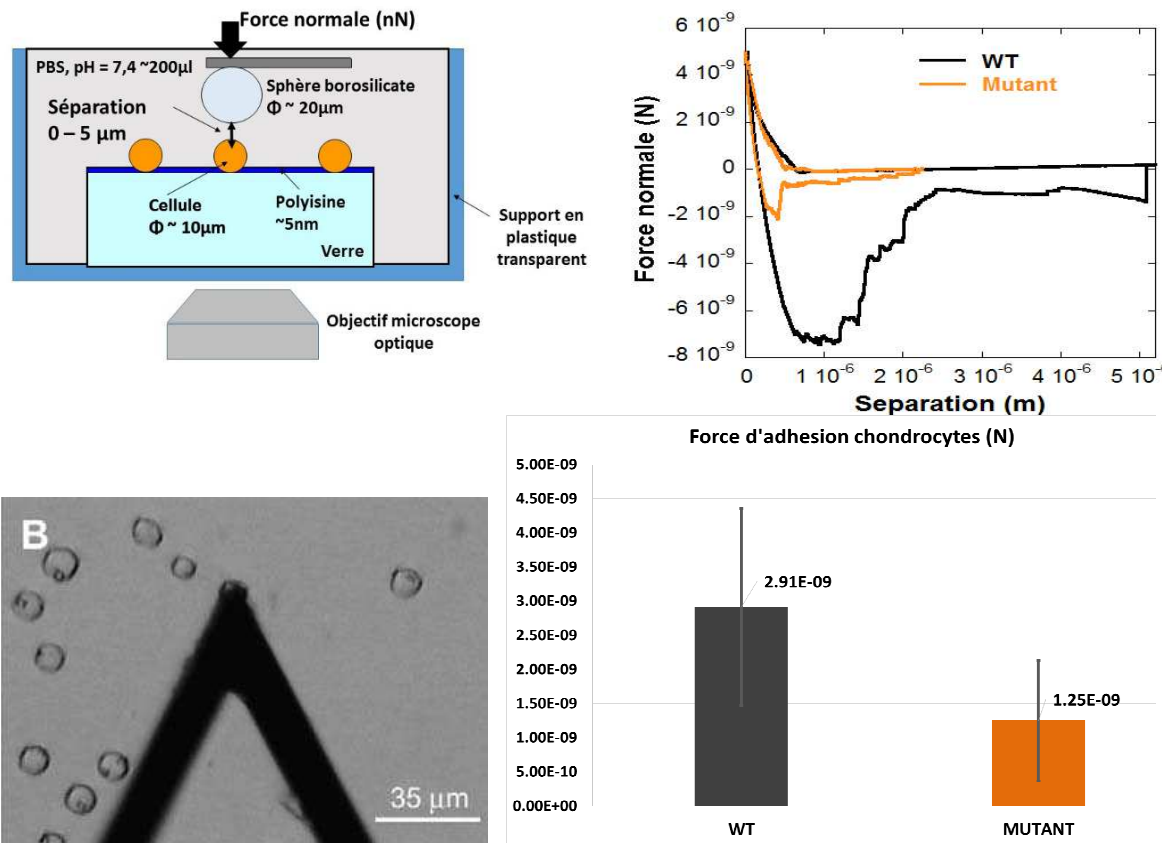


Fig. D6. Schéma de principe et photo des expériences en microscopie de force atomique (A, B gauche), résultats : différences significatives des forces d'adhésion cellule / microsphère en verre entre les cellules saines (WT) et pathologiques (sans « intégrine β1 »)

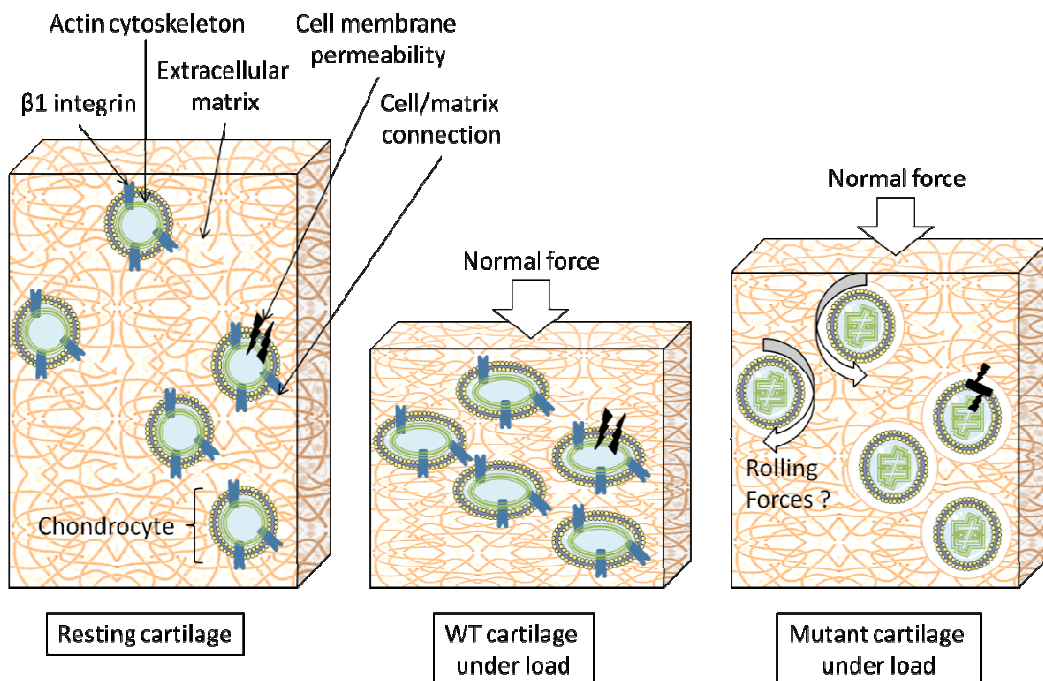


Fig. D7. Schéma de différences d'adhésion cellule / matrice entre les cartilages saines (WT) et pathologiques (mutant: ayant subi l'ablation de la molécule « intégrine β1 ») ce qui explique les différences mécaniques et physicochimiques mesurées

D.2. Réponses biologiques aux contraintes mécaniques

Le cartilage articulaire est un tissu hautement spécialisé qui présente une grande résistance mécanique aux forces de frottement et de compression. La figure D2 montre que les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire sont dues à l'organisation des macromolécules dans la matrice extracellulaire qui assurent dans le cas sain une transmission uniforme des contraintes mécaniques aux cellules.

Dans ce contexte, en collaboration avec LBTI - IBCP (Frederic MALLEIN-GERIN) et la Société Poietis on a obtenu un financement **CNRS DefiMecanoBio - projet BIOCART 3D (2016-2017)** afin d'étudier comment la structure de la matrice extracellulaire et les contraintes mécaniques modifient la synthèse des cellules afin de favoriser l'ingénierie tissulaire du cartilage. Ainsi l'organigramme du projet (fig. D8) montre le rôle de chaque partenaire afin de soulever le défi d'obtenir du cartilage *in vivo* :

- **Axe Innovation en Biologie Cellulaire**

L'équipe Biologie et Ingénierie du Cartilage (UMR CNRS 5305) a développé et validé l'utilisation d'une combinaison de cocktails de facteurs solubles (sous forme médicamenteuse) qui permet d'amplifier des chondrocytes articulaires humains après leur extraction d'une biopsie et de les redifférencier ensuite en présence d'un biomatériau (Claus et al., 2012). Pour ce projet exploratoire l'équipe bio a choisi d'utiliser de l'agarose, un hydrogel phare dans les études fondamentales sur la mécanotransduction des chondrocytes (Bougault et al., 2009, 2012 ; Perrier-Groult et al., 2013), et propice au bioprinting. Par la suite, un hydrogel de type Dispositif Médical pourrait être utilisé pour une application clinique.

- **Axe Innovation en Bioimpression 3D**

La Société Poietis (Bordeaux) développe la technologie de bioimpression 3D assistée par laser. Les premières applications développées par Poietis portent sur des modèles physiologiques de peau pour des laboratoires de recherche cosmétiques ou précliniques. Ce projet est sa première expérience en reconstruction de cartilage par bioimpression. A notre connaissance, il s'agit aussi d'un projet original d'une utilisation d'une bio-encre de chondrocytes pour récapituler l'organisation en colonnes des chondrocytes présents dans le cartilage articulaire.

- **Axe Innovation en Bioréacteur Mécanique**

Cet axe a été développé au LaMCoS et se base sur la conception et la mise en service d'un bioréacteur sous contraintes tribologiques. Ce bio-tribo-réacteur, présenté dans le chapitre A, permet en plus du contrôle des sollicitations normales et tangentielles appliquées à des cultures cellulaires (actuateurs piézoélectriques), la mesure des contraintes mécaniques normales et tangentielles vues par l'ensemble de la culture cellulaire (capteur piézoélectrique) ainsi que la mesure des champs de déplacement (des cellules ou des marqueurs fluorescents intégrés dans les biomatériaux support pour les cellules) et de vitesses (des marqueurs fluorescents intégrés dans le milieu liquide circulant pour nourrir les cellules) grâce aux visualisations *in situ* par microscopie confocale à fluorescence.

Pendant le **projet M2 de MII. Amira Hannoun 2016** on a réalisé le calibrage du bioréacteur afin de choisir les bonnes valeurs des sollicitations mécaniques qui permettront ensuite d'activer la synthèse cellulaire d'un cartilage hyalin dans le bioréacteur.

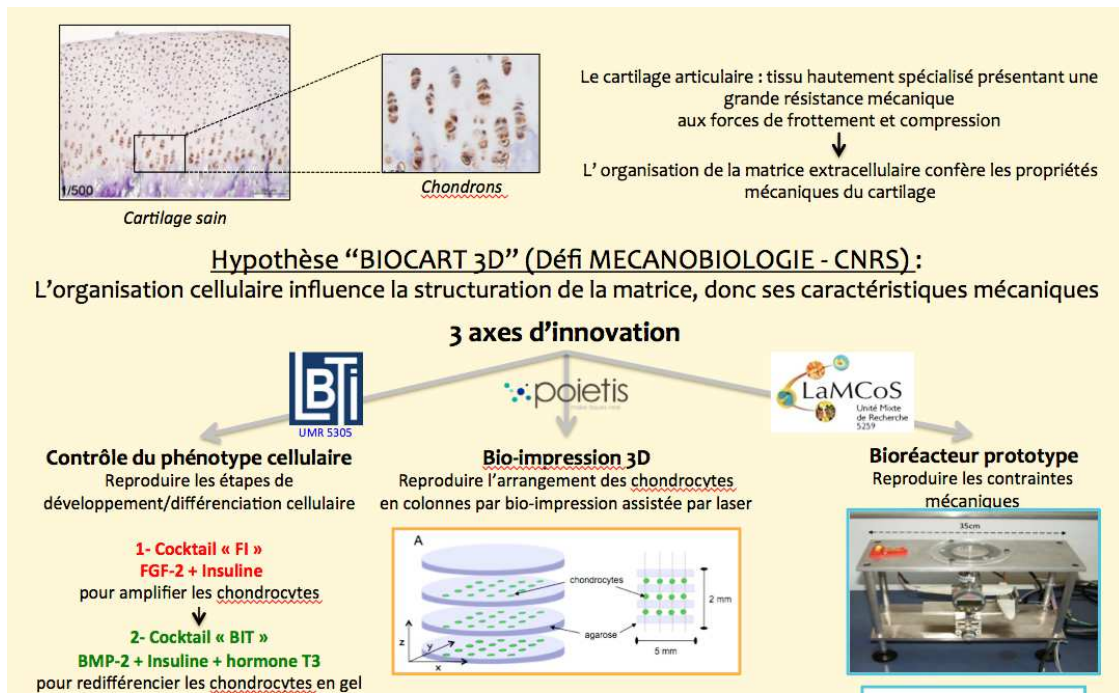


Fig. D8. Organigramme du projet CNRS DefiMecanoBio - projet BIOCART 3D 2016-2017

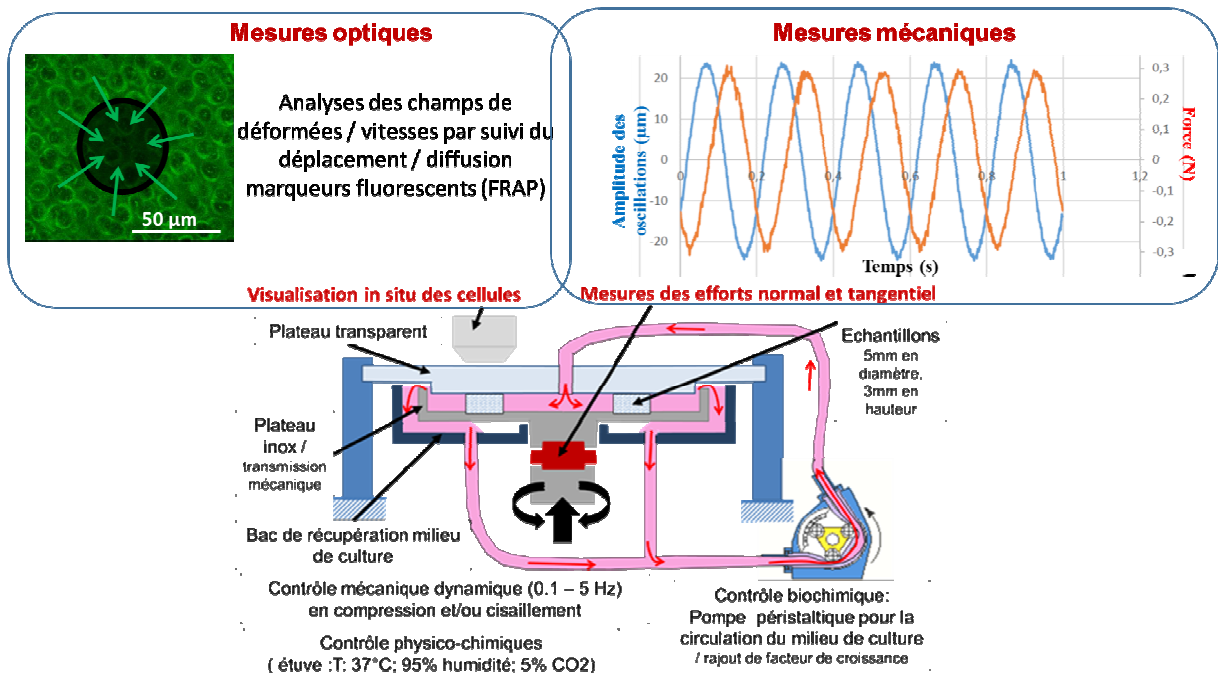


Fig. D9. Schéma de principe du fonctionnement du bioréacteur LaMCoS mis au point au LaMCoS

La bibliographie montre qu'une combinaison des sollicitations normales avec des sollicitations tangentielles en dynamique favorise la synthèse du cartilage hyalin [I. Martin 2009, Waldman S. D. 2007]. Les résultats présentent beaucoup de dispersions car la variabilité biologique et la manière de transmettre l'effort mécanique influencent significativement les résultats. En règle générale, les meilleurs résultats sont obtenus en :

- 1) utilisant des biomatériaux de type polymère comme support de la culture cellulaire ; matériaux avec des modules d'élasticité d'environ quelques centaines de Pa,

- 2) appliquant des sollicitations dynamiques entre 0.1 et quelques Hz pour des amplitudes de compression de 2 à 10% de l'épaisseur du biomatériau,
- 3) en appliquant des débits de perfusion du milieu de culture dans les biomatériaux de quelques ml/min

Comme cette gamme de sollicitations est assez large, afin de mieux cibler les paramètres mécaniques dans notre projet on a effectué un calibrage mécanique du bioréacteur afin d'estimer les sollicitations vues par les cellules en fonction des sollicitations mécaniques appliquées au bioréacteur. Ainsi, afin d'éviter les contraintes de stérilisation on a choisi de travailler dans cette étape avec des bille fluorescentes en polystyrène de quelques micromètres de diamètre pour simuler l'implantation des cellules dans le gel d'agarose. Trois lots de 6 échantillons ont ainsi été synthétisés en respectant la même technique de fabrication déjà utilisé pour les cellules en culture. Des mesures rhéologiques ont été effectuées sur le bioréacteur en variant les amplitudes de compression de 2 à 10% de l'épaisseur du biomatériau, les fréquences de sollicitations entre 0.1 et 2 Hz et le débit de perfusion de milieu de culture dans les biomatériaux entre 1 et 10 ml/min. Des mesures dynamiques globales nous ont permis de remonter aux caractéristiques des matériaux (module d'élasticité, viscosité). Des mesures locales effectuées grâce aux visualisations *in situ* par microscopie confocale de fluorescence permettront de remonter aux : champs de déplacement des billes fluorescentes mimant les cellules, champs de vitesse d'écoulement du milieu de culture dans le biomatériau support de la culture cellulaire.

Ainsi, on a caractérisé nos gels d'agarose sans cellules, synthétisés par les deux techniques : impression 3D et mélange classique. On a observé que nos gels synthétisés par la méthode classique sont bien plus résistants que les gels obtenus par impression 3D. En effet les gels classiques résistent à une compression maximale de 6% de leur épaisseur avant que des fissurations soient visibles sous microscope tandis que les gels obtenus par impression 3D ne peut subir que 1% de compression car on enregistre une décohésion entre les différentes couche de l'impression bien avant la fissuration. L'optimisation du processus d'impression 3D est en cours chez l'industriel Poietis.

D'autre part, en suivant les billes fluorescentes dans les gels on a constaté que seulement 67% du déplacement imposé par le tribo-bioréacteur était transmis aux billes tandis que dans le cas des cellules incluse dans le gel seulement 45% du déplacement imposé était transmis aux cellules.

La corrélation entre les mesures globales et celles locales nous ont permis de définir les paramètres optimaux à imposer par le bioréacteur afin que les cellules perçoivent un bon niveau de contraintes mécaniques à savoir:

- 1) compression dynamique à 1% de l'épaisseur totale des gels
- 2) débit de circulation du liquide d'environ 2ml/min
- 3) fréquence de sollicitations 0.5 Hz

Malgré cela, toutes les essais incluant des gels obtenus par impression 3D ont du être arrêtés car problèmes de décohésion des plaques d'agarose obtenues pour aligner les cellules.

Le temps que la technique d'impression 3D soit optimisée par l'industriel Poietis, nous nous sommes intéressés à valider le bioréacteur pendant une série d'expériences avec un substrat non aligné.

Ainsi, une série de cultures cellulaires ont été réalisées avec des **biomatériaux support de type éponges de collagène** et des **chondrocytes humains adultes** provenant de cartilages articulaires sains récupérées pendant des arthroplasties de la hanche (remplacement total de l'articulation) (thèse Nathalie Mayer 2014). Les éponges de collagènes sont préparées à partir de peau de veau par Symatèse Biomateriaux (Chaponost, France). La taille des pores des éponges est d'environ 100 µm et les fibres sont réticulées afin d'augmenter la résistance des éponges et éviter la décohésion des fibres. Les éponges ont été découpées en disque de 5 mm

de diamètre et de 3 mm d'épaisseur à l'aide d'un poinçon pour biopsie cutanée (Laboratoires Stiefel France). Le protocole de la culture est schématisé dans la figure D10. Il comporte :

- 1) une phase de récupération des chondrocytes et de multiplication (3 semaines) dans des plaques de culture standard en utilisant la méthode mise au point à LBTI,
- 2) une phase d'insémination des éponges avec les chondrocytes. Cette phase est nécessaire afin que les chondrocytes se fixent sur les éponges de manière stable (3 semaines)
- 3) une phase de sollicitation des éponges dans le bioréacteur (4 semaines). Dans cette phase des éponges « référence » sont gardées en culture statique – sans bioréacteur
- 4) une phase finale de traitement des analyses mécaniques, physico-chimiques et biologiques afin d'analyser la synthèse du cartilage comparativement dans les éponges statiques et celles dynamiques (bioréacteur).

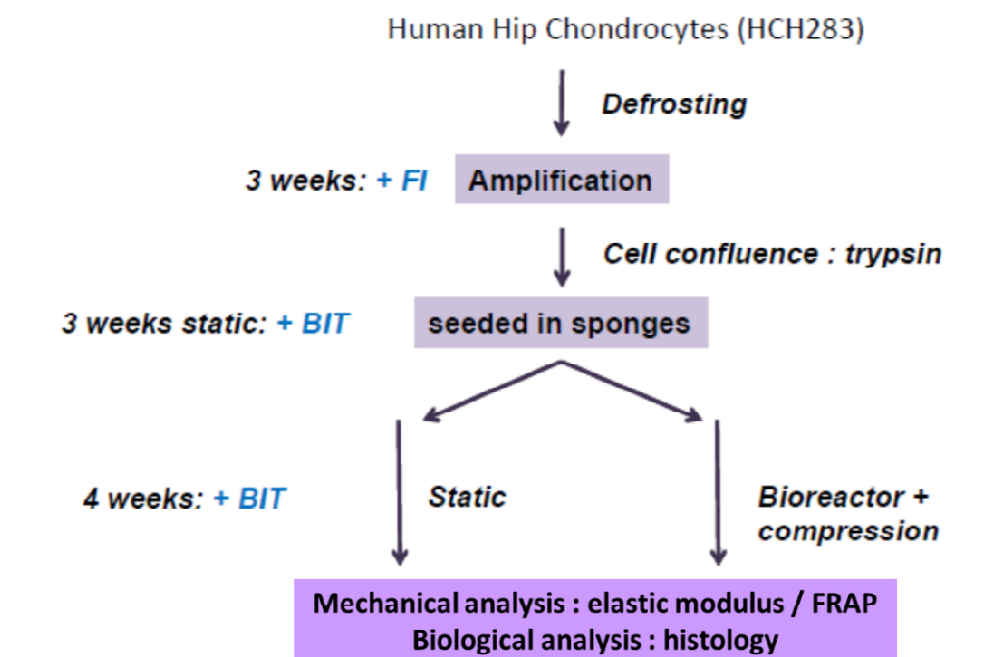


Fig. D10. Schéma de la méthodologie mise en place pour les cultures des chondrocytes dans les éponges de collagène

La figure D11 montre la visualisation des éponges in situ sur le bioréacteur en utilisant un marqueur fluorescent qui a été incubé 1h dans le milieu de culture des éponges et ensuite bien rincé. La figure D11.A montrée un éponge sans cellules - on remarque que la fluorescence est concentrée seulement dans les fibres de collagène de l'éponge, le reste de fluorescence a été rincé. Les figures D11.B et C présentent l'éponge avec des cellules : image B après 4 semaines de culture statique et image C après 4 semaines de culture dynamique. On remarque que les éponges avec cellules gardent le fond fluorescent ce qui semble être en accord avec les images d'histologie qui montrent la création d'une coque du cartilage à la périphérie de l'éponge (figure D11 A). Donc, la fluorescence une fois diffusée dans l'éponge reste plus longtemps. A l'intérieur de l'éponge on observe des cellules bien séparées des fibres dans le cas des éponges bioréacteur (figure D11 C), tandis que dans le cas statique les cellules semblent plus collées aux fibres des éponges figure D11 B). Par contre les amas cellulaires restent bien séparés et on ne remarque qu'une légère augmentation du module d'élasticité de l'éponge ainsi que une diminution du coefficient de diffusion (figure D12). Ces premiers résultats semblent confirmer le rôle des sollicitations mécaniques dans la synthèse du cartilage. Par contre, la raideur des éponges n'est pas assez importante pour transmettre la bonne contrainte mécanique (nous avons estimé que pour un déformé totale de l'éponge de 300µm, seulement 3µm sont vu par les cellules) ce qui fait que la majorité de la synthèse du

cartilage est fait dans la coque périphérique de l'éponge. Ainsi, nous envisagerons de renforcer les propriétés mécaniques des éponges avec du gel d'agarose afin que la contrainte mécanique est bien transmise à l'intérieur de l'éponge et que la synthèse de cartilage se fait de manière homogène.

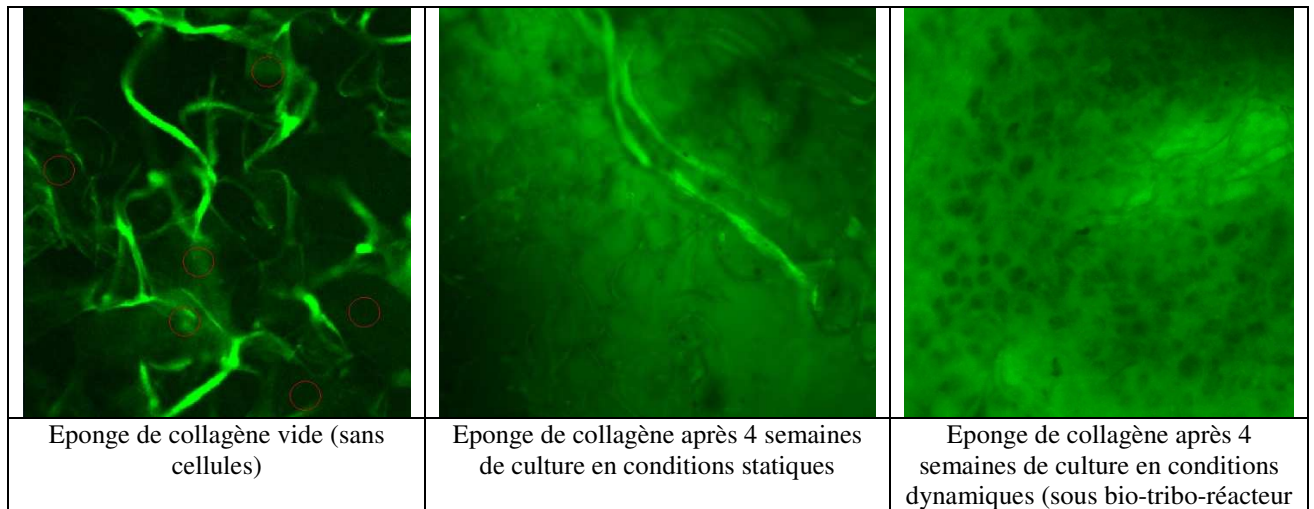


Fig. D11. Visualisation des éponges de collagène avec ou sans cellules sur le bio-tribo-réacteur avec marquage fluorescéine – dextrane 70kDa qui a été incubé pendant 1 heure et ensuite rincé (largeur totale de l'image = 250 μm)

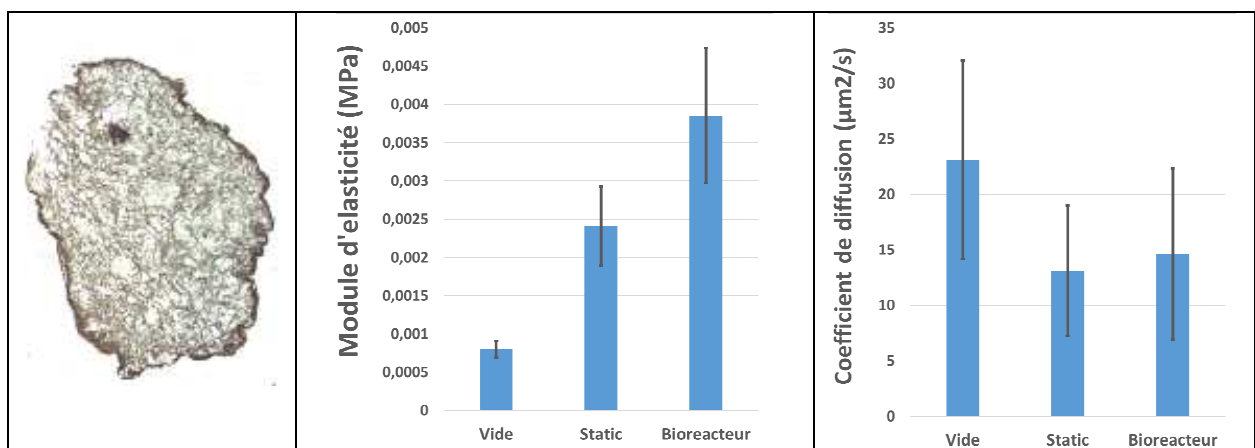


Fig. D12. Résultats des cultures cellulaires des chondrocytes humaines inséminé dans des éponges de collagène et sollicitées ou non mécaniquement. (A) coupe histologique avec marquage collagène II d'une éponge (diamètre maximal = 5mm) après 4 semaine de culture – visualisation d'une zone plus foncé à la périphérie de l'éponge = coque du cartilage synthétisé en culture. (B) variation du module d'élasticité apparent mesuré sur bio-tribo-réacteur montrant une différence significative entre les éponges sans cellules (vide) et les éponges avec cellules ($p < 0.001$) et différence significative ($p < 0.019$) entre les éponges obtenues après culture dans le bio-tribo-réacteur et les éponges obtenues après culture sans bio-tribo-réacteur (statiques). (C) variations du coefficient de diffusion de la molécule de fluoresceine-dextrane 70kDa dans différents éponges de culture cellulaire : différence significative entre les éponges vides et ceux avec cellules, mais non significative entre les éponges avec cellules obtenues avec ou sans bio-tribo-réacteur

D.3. Développement de matériaux d'implants capable d'activer la mécanotransduction des chondrocytes in vivo et favoriser l'autoréparation du cartilage

Ces recherches ont commencé avec le travail de la thèse de Luciana Bostan (2011, réalisé en co-tutelle avec les chimistes de l'Université Technique de Iasi Roumanie) et été poursuivi avec une collaboration avec l'entreprise Acrylian (Strasbourg) (projet Carnot TROPISME 2015-2018)

Comme on a vu dans les paragraphes précédents la recherche médicale développe des techniques d'ingénierie tissulaire, avec lesquelles est possible de reconstruire la structure vivante du cartilage articulaire. Ces techniques utilisent des substrats polymériques et des cellules, qui sont contraintes de manière biochimique et aussi mécaniquement à se développer dans un tissu cartilagineux. Mais, malgré leur avancement, ces techniques ne peuvent pas être utilisées à l'échelle d'une articulation complète. Il est en effet actuellement impossible de reproduire *ex vivo* à grande échelle la structure d'un cartilage articulaire : celle-ci est générée *in vivo* sous l'action de contraintes mécaniques, mal connues, et qui ne sont donc pas actuellement reproductibles *ex vivo* dans des cultures cellulaires.

Dans ce contexte, les travaux de la thèse de Luciana Bostan (2011) visent à développer des matériaux polymères capables d'être implantés à l'échelle macroscopique dans les articulations pathologiques afin de combler l'usure des cartilages articulaires.

Actuellement, les matériaux polymères jouent un rôle important dans toutes les sphères de l'activité humaine, en prenant part de plus en plus à la vie quotidienne. Parmi ceux-ci, les biomatériaux polymères sont de grande actualité étant donné la diversité des besoins médicaux et pharmaceutiques. La principale préoccupation concernant ces biomatériaux est d'améliorer leurs qualités pour arriver à avoir (1) le minimum d'intervention chirurgicale, (2) une grande biocompatibilité, (3) une résistance mécanique comparable aux tissus destinés à être substitués, et (4) d'éviter les réactions inflammatoires à l'implantation par des systèmes de libération contrôlée des principes actifs anti-inflammatoires.

Notre choix s'est porté sur la classe des matériaux polymériques (hydrogel p(HEMA)) car sont des polymères qui peuvent être modifiés afin d'avoir plus ou moins d'hydrophilie.

Ainsi, dans une première étape le caractère hydrophile des hydrogels p(HEMA) a été modifié avec des monomères à fort caractère hydrophile (acide acrylique - AA, l'acrylamide - AAM) ou hydrophobe (acrylate d'éthyle - AE, acrylate de butyle - AB) en présence d'un monomère bi-fonctionnel avec le rôle de réticulation : tétraéthylène glycol diacrylate (TEGDA).

Dans une deuxième étape des techniques de caractérisations structurales, nano-mécaniques et tribologiques ont été développées afin de caractériser ces matériaux par rapport au cartilage articulaire. Nous avons pu montrer (Bostan 2011) que les hydrogels HEMA 5%AA sont de bons candidats pour se substituer aux cartilages articulaires. (figure D13).

D'autre part, nous avons pu montrer qu'en calibrant bien les mesures de forces par spectroscopie de force atomique on pouvait obtenir des résultats semblables aux expérimentations mécaniques à plus grande échelle. Cela est un point important car nombre des publications actuelles interprètent des mesures de forces utilisant l'AFM comme mesures d'élasticité, mais, des dérivés de glissement de la pointe AFM sur la surface et des torsions du levier peuvent influencer ces mesures. Nous avons choisi de toujours utiliser des raideurs de leviers adaptés à notre élasticité de substrat afin qu'on n'enregistre pas des déformations excessives des leviers et que la mesure d'indentation permet une compression modérée de l'échantillon qui reste dans la limite d'élasticité du matériau (éviter la plastification ou la rupture).

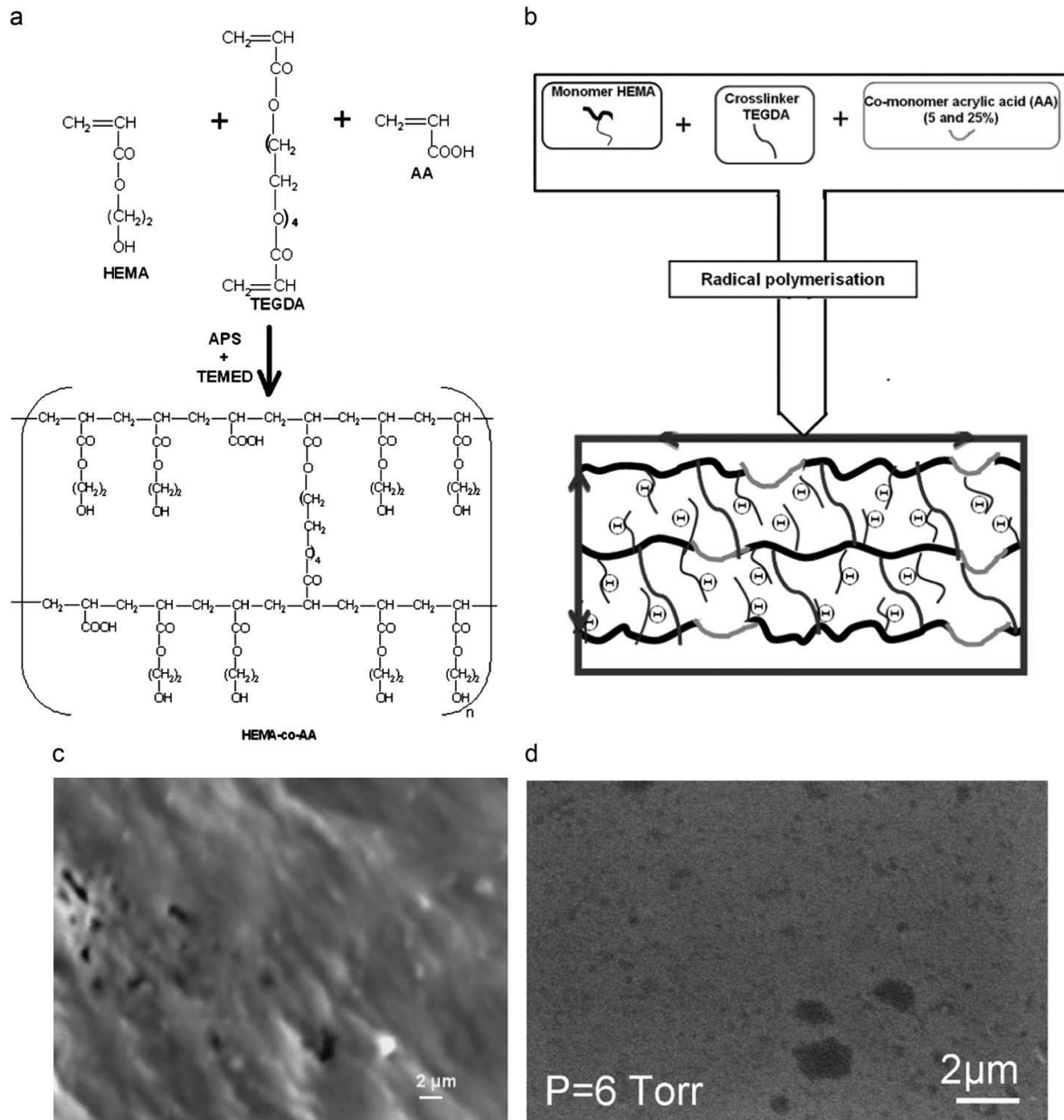


Fig. D13. Synthesis of hydrogels p(HEMA-coAA) through the radical crosslinking polymerization reaction: a) chemical reaction; b) simplified diagram of the reaction; c) the porosity of the rubbing surface estimated by ESEM c) articular cartilage; d) HEMA 5%AA hydrogel. (Figure extraite de la publication L. Bostan et al. / Tribology International)

Ainsi, pour valider nos choix expérimentaux, en collaboration avec mon collègue Guilhem MOLLON nous avons pu modéliser les essais AFM en utilisant le logiciel d'éléments finis ABAQUS (stage PFE de Yannick Causse 2014) – figure D14. Ainsi, actuellement nous développons des modèles numériques afin de pouvoir prédire les caractéristiques d'indenter à choisir pour les différentes configurations expérimentales et développer de traitements de données automatisé en prenant en compte la mécanique du contact de manière plus précise.

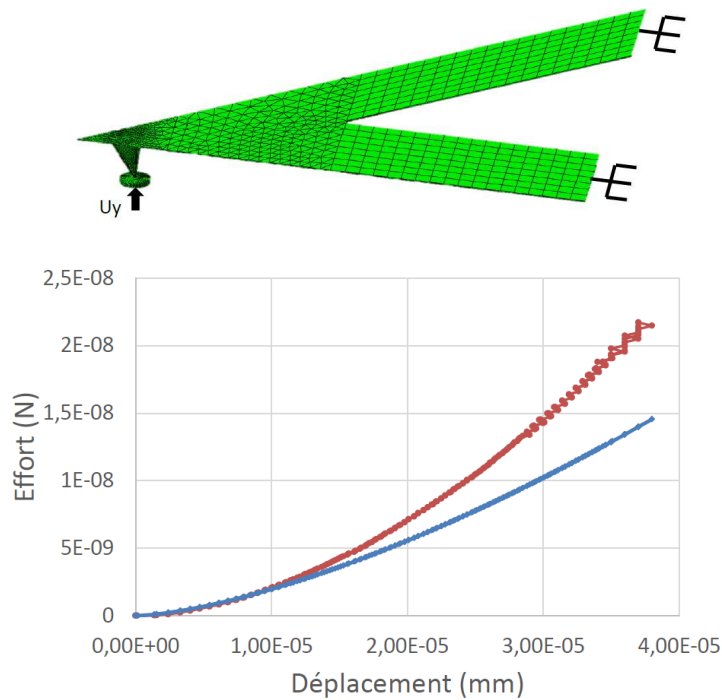


Fig. D14. Résultats du modèle numérique ABAQUS développé au cours du PFE de Yannick Causse 2014 pour simuler l'expérience de nano-indentation AFM pour les hydrogels HEMA. Nous constatons que les modèles analytiques du contact (courbe bleue) qu'on a utilisé pendant la thèse de Luciana BOSTAN se superpose avec les résultats du modèle numérique (courbe rouge) jusqu'à une valeur de déplacement d'échantillon de $10\mu\text{m}$, à partir de cette valeur nous avons des influence importantes de la trajectoire et la raideur de l'indenter. Nous avons utilisé pendant les manips AFM un même type d'indenter avec une course de déplacement maximal de $3\mu\text{m}$ ce qui nous a permis d'avoir des résultats réalistes en utilisant les modèles analytiques du contact

En collaboration avec la société Acrylian et l'institut Charles Chadron de Strasbourg (projet Carnot TROPISME 2015-2018 – la figure D15 présente les objectifs du projet) nous sommes entrain de développer des matériaux polymères de type acryliques à propriétés mécaniques contrôlées (smarts) afin de pouvoir :

- 1) d'un part imposer les bonnes contraintes mécaniques pour substituer les ménisques et éviter ainsi l'arthrose
- 2) d'autres parts favoriser la lubrification à travers les vésicules lipidiques de rigidité contrôlée et essayer ainsi de traiter des fissures superficielles du cartilage articulaire

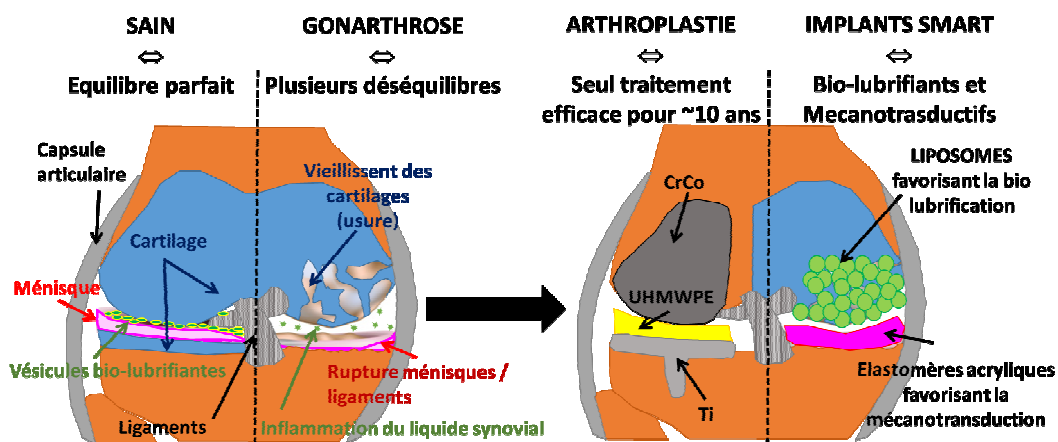


Fig. D15. Schéma de l'objectif du projet Carnot TROPISME (2016-2018)

Chapitre E.

Remodelage osseux : genèse et autoréparation du cartilage articulaire par transformations tribologiques superficielles de l'os

E1. Contexte

L'os est un matériau vivant complexe, il représente environ 15% de la masse corporelle humaine. Il assure diverses fonctions telles que protéger les organes, fournir un support d'attachement des muscles, générer les cellules sanguines pour une immunoprotection et fournir une réserve d'ions (calcium, phosphate,...).

Le développement embryonnaire de l'os est la base de ses propriétés de cicatrisation et ses réponses aux contraintes mécaniques.

En effet le tissu osseux se forme comme réponse biologique à des contraintes mécaniques. Ainsi, au premier stade embryonnaire l'articulation ainsi que les deux os adjacents forme une unité structurale, appelé en embryologie « modèle cartilagineux des futurs os » (figure E1).

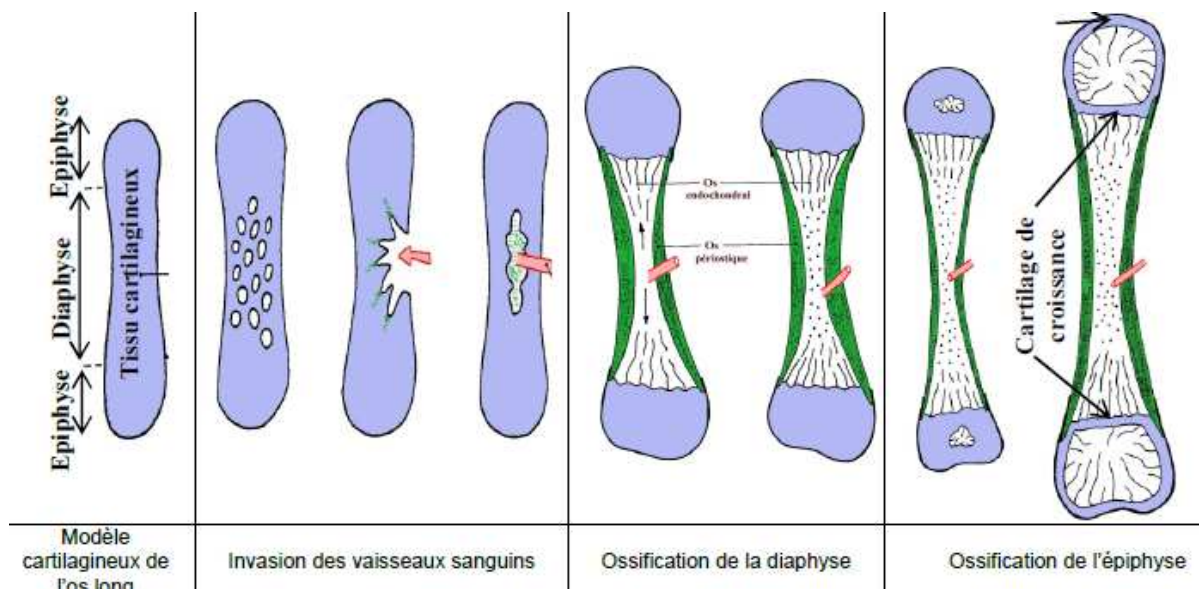


Fig.E1 Schémas des étapes de l'ossification enchondrale adapté du cours d'embryologie de UMF Iasi Roumanie

En même temps que l'embryon grandit il commence à bouger, donc l'articulation se forme en même temps que l'os. Ainsi, l'articulation se génère lors des premiers mouvements embryonnaires par fissuration du tissu cartilagineux embryonnaire [Osborne A.C.,2003]. La dépressurisation créée par cette fissuration apporte du liquide interstitiel (milieu nutritif dans lequel le tissu cartilagineux est hydraté) vers la cavité articulaire; les contraintes de circulation de ce liquide et la pression intra-articulaire vont générer le tissu bordant la cavité articulaire (synoviale). D'autre part, en même temps que le tissu cartilagineux se fragmente pour générer la cavité articulaire, des vaisseaux sanguins « envahissent » le tissu cartilagineux embryonnaire en amorçant le processus de minéralisation et de formation de l'os [Mikic B.,2000]. Cet envahissement est dû notamment à un équilibre des pressions sanguines entre la circulation fœtale et celle de la mère. Ainsi, la cellule cartilagineuse subit en même temps les contraintes tribologiques transmises côté cavité articulaire et les contraintes mécaniques de la circulation sanguine coté os, ce qui lui fait synthétiser un milieu extracellulaire, adapté à chaque niveau de contraintes. Ainsi, le tissu cartilagineux se structure en formant plus de fibres résistantes au cisaillement du côté de la surface frottante, plus de gel résistant aux

pressions hydrostatiques au centre de l'épaisseur du cartilage articulaire et plus de minéraux en contact avec l'os. De plus, le contact cartilage / os est soumis à un processus continu de croissance (synthèse os) et de remodelage (synthèse/destruction os) afin d'équilibrer les contraintes mécaniques tout au long de la vie.

En rappel de cette unité embryonnaire entre articulation et les deux os adjacents – on garde au toute notre vie le périoste qui est une gaine osseuse formé de deux couches : une couche externe qui sert à connecter les os à l'articulation et une couche interne contenant des cellules capables de synthétiser de l'os [Cummings B. 2000]. Ce périoste est considéré actuellement comme un élément essentiel pour l'accélération de la cicatrisation osseuse au cours des fractures car il garde une grande quantité de cellules mésenchymateuses. C'est pour cela que par la suite on détaille le procès de cicatrisation osseuse.

Cicatrisation de l'os long

Après une fracture de l'os long la cicatrisation osseuse reprend les phases de l'embryogenèse osseuse. Ainsi la fracture se consolide en quatre stades: (1) l'hématome qui aboutit au tissu de granulation, (2) la cal mou ou primaire, (3) la cal dur puis le (4) remodelage (figure E2, reprise de livre de Benjamin Cummings *Essentials of Human Anatomy and Physiology*)

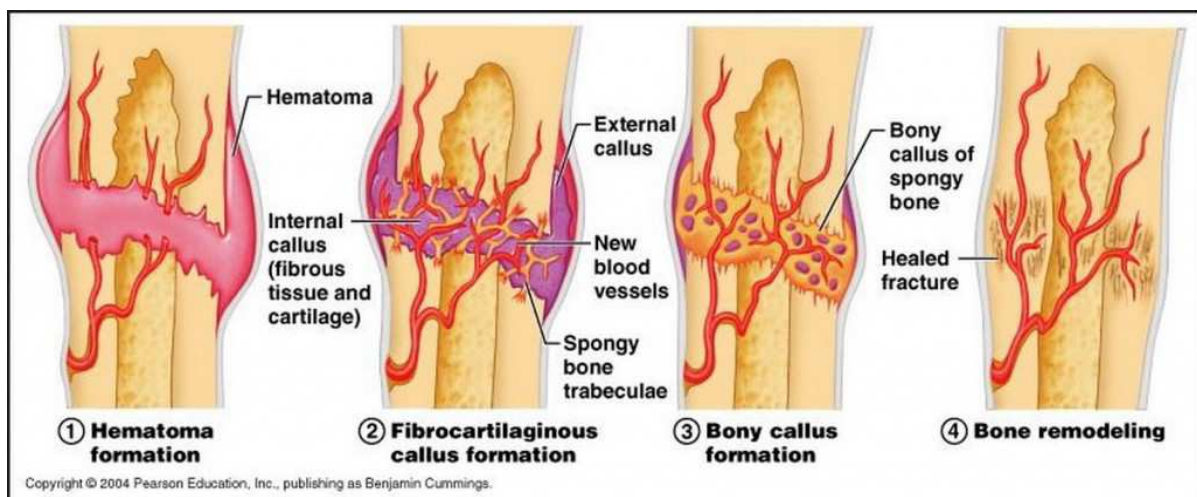


Fig.E2 Schémas des stades de la consolidation d'une fracture reprise du livre de Benjamin Cummings *Essentials of Human Anatomy and Physiology*

(1) Lors du premier stade, la fracture produit la section des vaisseaux sanguins qui déversent leur contenu dans la cavité de la fracture. Un processus inflammatoire commence avec l'arrivée des macrophages qui vont détruire les fragments osseux rompus. En même temps des cellules précurseur de l'os arrivent et l'hématome se transforme dans un tissu de granulation. Il s'agit d'un tissu fibro-vasculaire (différenciation en fibroblaste et formation de nouveaux vaisseaux) riche en collagène de type III. A la fin de cette phase, qui dure 2 à 3 semaines, il est important que la circulation sanguine soit rétablie. Dans cette phase l'os a besoin d'être immobilisé pour que le tissu fibro-vasculaire se forme et que la circulation du sang reprenne.

(2) Lors du deuxième stade, l'organisme cherche à stabiliser la fracture (garder la bonne position), c'est pour cela qu'un tissu cartilagineux est généré à partir des cellules mésenchymateuses du périoste. Vu qu'il y a des fragments osseux qui peuvent se trouver dans la zone de fracture, ces fragments contribuent à déclencher la minéralisation du tissu

cartilagineux situé en périphérie des fragments osseux. Cette phase dure jusqu'à environ la sixième semaine

(3) Lors du troisième stade la minéralisation avance et gagne toute la zone de fracture. Ainsi, le cal dur est formé par la création des points osseux entre les fragments du cal mou et assure une solidarité mécanique entre les fragments. A ce stade la fracture est consolidée mais les travées osseuses ne sont pas bien orientées : présence des travées multidirectionnelles qui sont les « lignes de fusion » du « cal mou ». Pour cela, une fois que le « cal dur » se forme l'os doit être sollicité mécaniquement avec les bonnes contraintes afin qu'il devienne un os bien fonctionnel. Cette phase dure jusqu'au environ 3^{ème} mois

(4) Lors du quatrième stade le remodelage est activé. Cela implique la résorption du cal externe et la restauration des travées osseuses orientées parallèlement aux lignes de contraintes mécaniques. Ainsi, à ce stade l'os doit être sollicité mécaniquement pour que les travées se forment dans la direction de la contrainte mécanique. Cette phase dure jusqu'à environ le 18^{ème} mois, elle est incomplète chez l'adulte et complète chez l'enfant.

Ainsi, on peut considérer que les zones de remodelages osseux, sont des zones où les contraintes mécaniques changent de direction : d'une direction plutôt tangentielle physiologique (imposée par le mouvement articulaire) ou non physiologique (fracture) passent à une direction normale (suivant le poids du corps). Si on regarde plus attentivement ces zones on remarque une activité biologique intense de destruction / reconstruction de l'os. En effet, comme cela est montré dans la figure E3 :

- 1) les cellules de type macrophagiques venues du sang et transformées en ostéoclastes (cellules mangeuses d'os) détruisent continuellement l'os synthétisé dans la mauvaise direction,
- 2) les cellules de type mésenchymateuses (ostoblastiques) synthétisent de l'os dans la direction de la contrainte mécanique et des capillaires sanguins.

Tous ces changements de la direction de la contrainte mécanique s'accompagnent d'une zone de transition dans laquelle on trouve des chondrocytes hypertrophiés qui :

- 3) disparaissent pour laisser la place à l'os si la contrainte dominante est la contrainte normale (cas de la consolidation d'une fracture)
- 4) restent et s'équilibrent mécaniquement (contraintes isotopes dans le cartilage) par la synthèse d'aggrécans afin de favoriser le changement des contraintes vers des contraintes transversales (mouvement articulaire).

Donc, on peut considérer que la zone d'usure dans une articulation est déportée à la zone de remodelage osseux par l'intermédiaire du cartilage articulaire qui a le rôle d'équilibrer les contraintes et amortir les chocs grâce à sa grande hydrophilie (voir le chapitre D). Ainsi les cartilages articulaires agissent comme une chambre pneumatique pour protéger l'os, son épaisseur va être imposée par la zone de remodelage osseux : si la contrainte normale est plus présente que la contrainte tangentielle (personnes sédentaires) l'épaisseur de cartilage diminue.

D'autre part la zone de remodelage osseux a un rôle actif dans la compensation de l'usure en synthétisant l'os dans la direction de la contrainte principale et en détruisant l'os synthétisé dans les autres directions. Ainsi, le sang sert à apporter des éléments nécessaires qui servent à la synthèse osseuse (débit source) mais, il sert aussi à évacuer les déchets osseux d'usure (débit d'usure). Des capteurs de douleur sont situés dans l'os ; ce sont les nerfs qui accompagnent les capillaires sanguins. Ils ont pour but d'agir sur le système nerveux central pour rééquilibrer des contraintes excessives dans la zone de remodelage osseux en agissant sur le système musculo-ligamentaire.

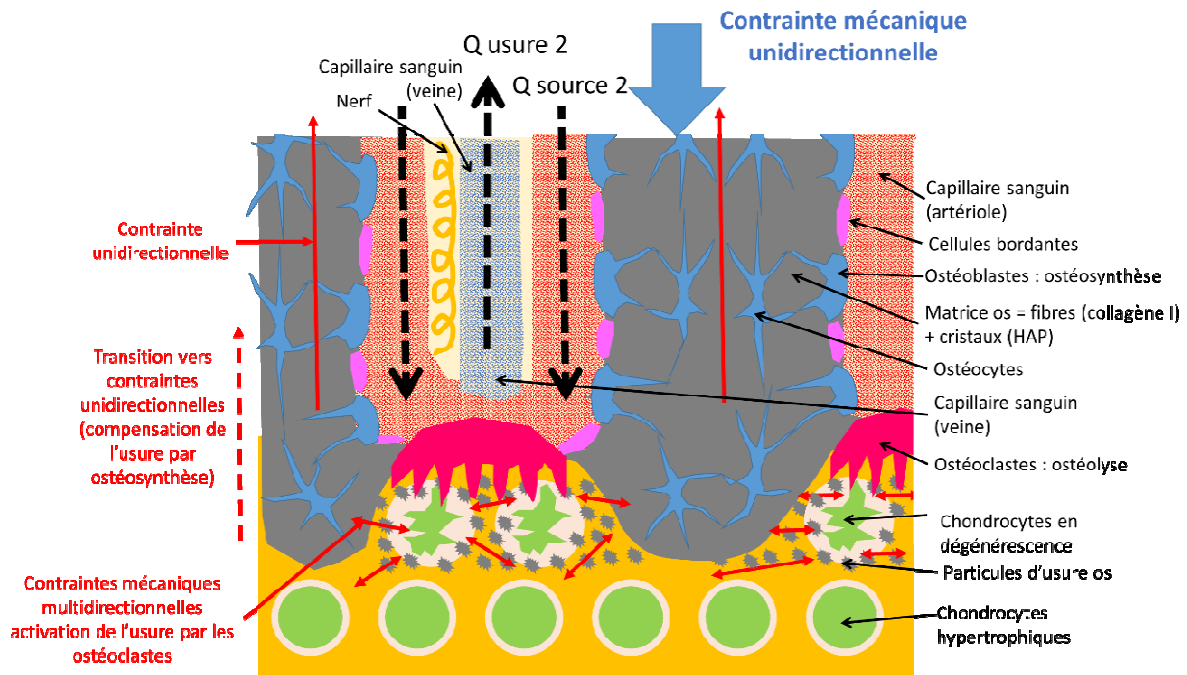


Fig.E3 Schéma du remodelage osseux

Vu les propriétés remarquables d'adaptation du tissu osseux aux contraintes mécaniques tout en minimisant l'usure dans la zone de remodelage osseux, ce chapitre s'intéresse à comprendre comment on pourra utiliser le remodelage osseux pour rééquilibrer des contraintes dans le cas des pathologies articulaires.

Ainsi, grâce à deux contrats industriels avec TORNIER nous avons étudié deux solutions :

- activation du remodelage osseux pour la création d'une nouvelle articulation dans les prothèses d'interposition (thèse Ghassen Ouenzerfi 2019),
- activation de l'autoréparation du cartilage par un équilibre des contraintes mécaniques sur les cellules cartilagineuses (chondrocytes) (thèse Amira Hannoun)

E.2. Création d'une néo-articulation par activation du remodelage osseux dans les prothèses d'interposition

On peut considérer Ollier [Ollier 1889] comme le père de l'arthroplastie par interposition. Dans son *Traité des résections du poignet* 1889, il envisage déjà les résections sous-périostées du poignet essentiellement dans le cadre du traitement de la tuberculose ostéoarticulaire. Cependant, en dehors de l'éradication d'une ostéoarthrite tuberculeuse, Ollier rapporte deux cas de résection de poignet à titre purement arthroplastique pour traiter une ankylose osseuse. Par ailleurs après trois autopsies d'anciens réséqués, Ollier décrit le remplacement de l'os du carpe par une masse ostéofibreuse mobile. Cette néoformation irrégulière en partie due au périoste, quoique rare au niveau du carpe, est « précieuse pour le maintien de la forme et le rétablissement des fonctions de l'organe ».

Plus d'un siècle après, l'utilisation en chirurgie orthopédique du pyrocarbone ouvre la voie à un nouveau type d'arthroplastie : l'arthroplastie par interposition avec implant libre.

Les propriétés du pyrocarbone sont actuellement bien connues: parfaite biocompatibilité prouvée par son utilisation depuis plus de 30 ans pour les valves cardiaques, résistance à l'usure prouvée in vivo, module d'élasticité proche de celui de l'os permettant une bonne transmission des contraintes entre l'implant et l'os. Hassler [Hassler 1994].

Les propriétés mécaniques du pyrocarbone par rapport aux autres propriétés des matériaux utilisés dans l'arthroplastie, comparativement aux propriétés de l'os sont données dans le tableau ci-dessous.

	Young Module Gpa	Breaking Stress Mps	Elongation Stress
Cortical bone	20	150	1-3
Pyrocarbon	25	500	1.6 - 2.1
Silicone	0.004	10 - 12	700 - 800
HD polyethylene	1.05	22 - 31	450
PE UHMW	0.94 - 1.05	39	420 - 525
CoCr	200 - 240	600 - 1500	8 - 50
Stainless steel	193 - 210	480 - 1300	40
TA6V	102 - 114	860	8

Le concept d'arthroplastie par interposition avec implant libre en pyrocarbone est basé sur les principes suivants :

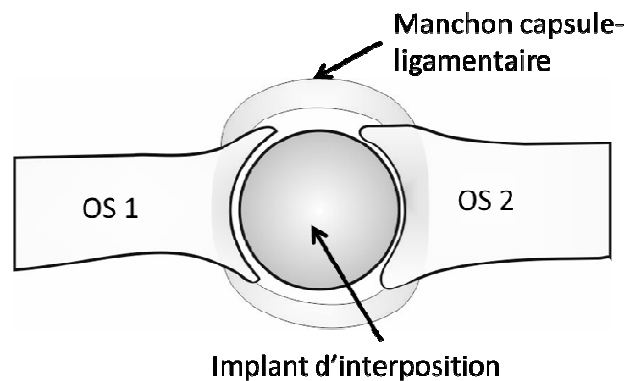


Fig.E4 Schéma d'une arthroplastie par interposition

- l'implant ne nécessite aucun encastrement osseux,
- l'implant est mobile. Il « s'adapte » aux mouvements articulaires,
- n'étant pas scellé, le caractère rétentif capsulo-ligamentaire de l'articulation est nécessaire pour stabiliser l'implant,
- l'implant rétablit le volume articulaire permettant l'efficacité des bras de levier musculaires,
- l'implant crée des surfaces articulaires avec les pièces osseuses de la néo-articulation. Ces surfaces articulaires ne sont pas inertes contrairement à la surface articulaire des prothèses totales. Les interfaces os-pyrocarbone gardent des capacités biologiques adaptatives. L'os se modèle en fonction de la cinématique de l'implant créé par les mouvements de l'articulation encerclant d'un liseré de condensation osseuse (formation de l'os cortical –visible sur les radiographies – figure E6A) la chambre de mobilité de l'implant.

Dans ce contexte, la thèse de Ghassene Ouenzerfi (CIFRE avec l'industriel TORNIER) vise à comprendre le remodelage osseux dans le cas des prothèses d'interposition en pyrocarbone. Plus précisément, comprendre comment la néo-articulation devient indolore et voir dans quelles conditions on pourra envisager ce type d'implant pour des plus grosses articulations comme celles de l'épaule.

Dans ce contexte, une nouvelle génération d'implants d'épaule a été développée pour éviter les complications dans l'arthrite glénohumérale primaire : arthroplastie d'interposition basée sur un implant sphérique libre (Garret et al., 2013). L'implant est conçu pour être inséré sans fixation entre le cartilage glénoïdien et la cavité métaphysaire humérale créée chirurgicalement. Ainsi, l'implant sphérique remplace la tête humérale anatomique (Allieu, 2012). Contrairement aux procédures classiques TSA (arthroplastie totale de l'épaule) et RSA (arthroplastie totale de l'épaule inversée) (Wiater et Fabing, 2009) (Lévigne et al., 2010), la conception de cet implant sphérique repose sur: (1) l'absence d'encastrement dans le squelette, (2) la mobilité de l'implant et (3) l'intégrité des tendons assurant la stabilisation. Les principes de l'interposition classique sont décrite auparavant (figure E4).

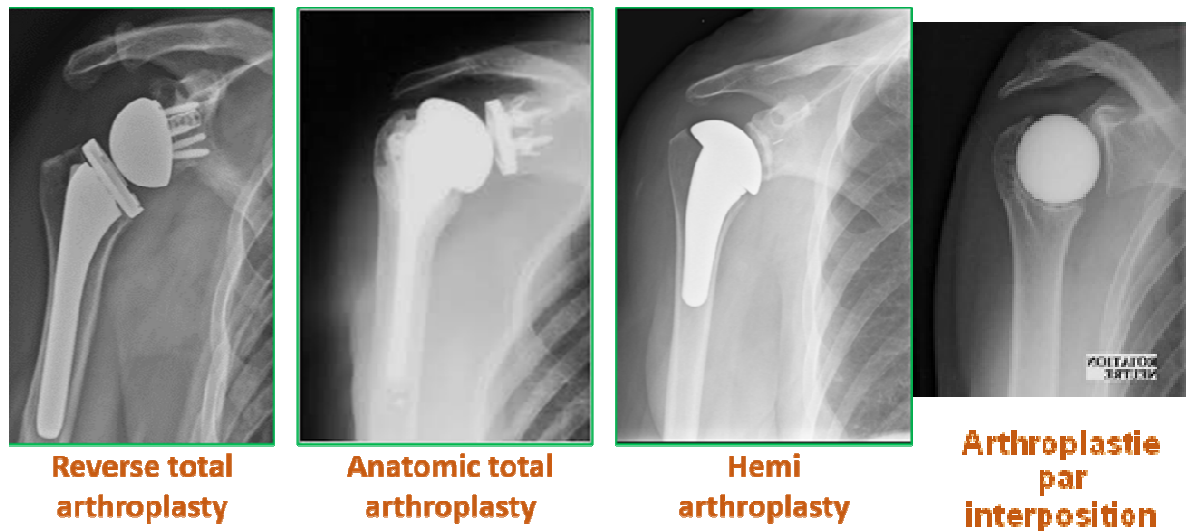
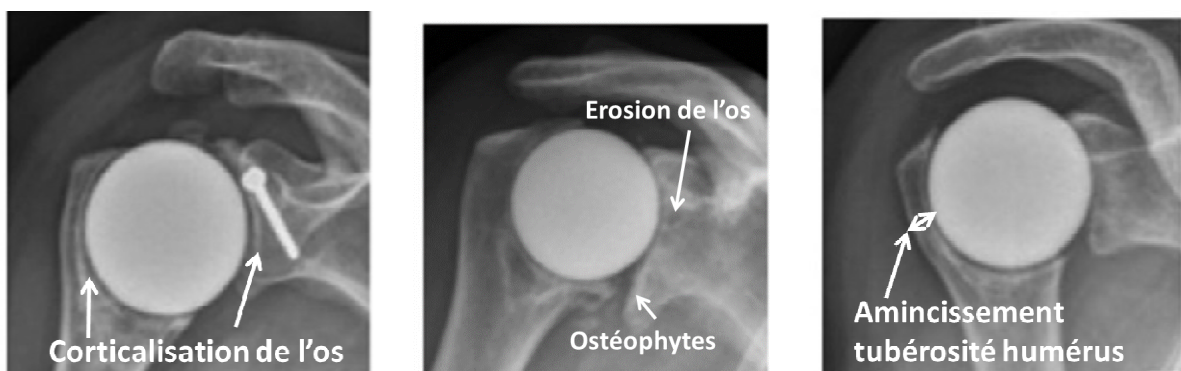


Fig.E5 Radiographies correspondantes aux différents types d'arthroplasties d'épaule issus des chirurgiens travaillant avec l'industriel TORNIER

Une étude clinique récente [Garret J Shoulder Elbow Surg (2017)] effectuée sur un lot de 67 patients ayant subi une arthroplastie d'interposition d'épaule montre des résultats controversés. Malgré des résultats encourageants concernant la corticalisation de l'humérus (figure E5A) et l'absence de douleur, l'implant reste sous surveillance car :

- dans 6 cas une érosion de la cavité glénoïde a été observée (figure E5B)
- dans 3 cas un amincissement de la tubérosité de l'humérus a été observé (figure E5C)



Implant sans problèmes.
On observe une ligne de corticalisation normale de l'os a la fois du coté glène et du coté humerus (flèches sur la figure)

Implant qui présente l'érosion de la cavité glénoïde. On observe des ostéophytes hors du contact PyC/Os et l'aspect érosif au contact glène / PyC (flèches)

Implant qui présente l'amincissement de la tubérosité de l'humérus. On observe une réduction de la quantité osseuse

Fig.E6 Radiographies reprises de la publication Garret J Shoulder Elbow Surg (2017)

Dans ce travail, deux éléments ont été cités comme possible cause de défaillance de ce type d'implant qui devront être surveillées par la suite sont :

- 1) le diamètre de l'implant,
- 2) la qualité osseuse de la glène.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à comprendre quels sont les paramètres biologiques, physico-chimiques et mécaniques qui garantissent une bonne fonctionnalité de ce type d'implant. Ainsi, nous avons :

- 1) expertisé des implants et les tissus adjacents au cours de plusieurs reprises d'implants d'interposition d'épaule en PyC,
- 2) évalué le rôle du matériau dans la réaction biologique de minéralisation et dans la chondrogenèse,
- 3) évalué le rôle de la transmission des contraintes mécaniques sur le remodelage osseux et sur la stabilité *in vivo* de ce type d'implant.

E2.1. Expertise des implants d'interposition PyC et tissus adjacents à ces implants

Nous avons expertisés 6 explants d'interposition de l'épaule (identiques à ceux de la figure E6) qui avaient fonctionné *in vivo* entre 1 et 5 ans. Les motifs d'explantation étaient ou l'érosion de la cavité glénoïde (2 des cas) des traumatismes ne mettant en cause l'implant (2 des cas) ou l'amincissement de la tubérosité de l'humérus (2 des cas).

Après l'ouverture de l'articulation et l'extraction de l'implant nous avons pu expertiser les tissus adjacents à l'implant du côté de l'os humérus (figure E7) et du côté cartilage de la glène (figure E8). Pour cela nous avons utilisé des techniques d'histologie classique et des immunomarquages afin de mettre en évidence le caractère plus fibreux des tissus (collagène type I) ou plus cartilagineux (collagène II et agréganes)

E.2.1.1. Expertise des tissus adjacents à l'implant du coté humérus

Ainsi, du côté de l'os humérus, nous avons pu mettre en évidence la formation d'un tissu couvrant l'os et ayant un aspect macroscopique de surface cartilagineuse (figure E7 A et B). Ce tissu a une apparence de membrane car on peut l'enlever plus ou moins facilement de l'os. La membrane a une épaisseur millimétrique et dans certains cas est bien accroché sur l'os (figure E7 B, D) et plus fine tandis que dans d'autres cas elle se décolle assez facilement et elle est bien épaisse (figure E7 A, C). L'analyse histologique de cette membrane (figure E7 E, F) montre que si :

- 1) la membrane est bien accrochée à l'os (figure E7 F), son épaisseur est d'environ 1 mm et elle est constituée des zones riches en protéoglycannes (coloration SO rouge intense). On observe la coexistence de cellules fibrocartilagineuses (dans la zone rouge sans alvéoles) et de cellules cartilagineuses (dans la zone rouge avec alvéoles),
- 2) la membrane se décolle facilement à l'os (figure E7 E), son épaisseur est d'environ 3-5mm et elle est constituée dans la zone centrale d'un tissu fibreux qui du côté implant PyC présente une couche d'environ 100µm riche en cellules fibrocartilagineuses (marquage SO rouge intense)

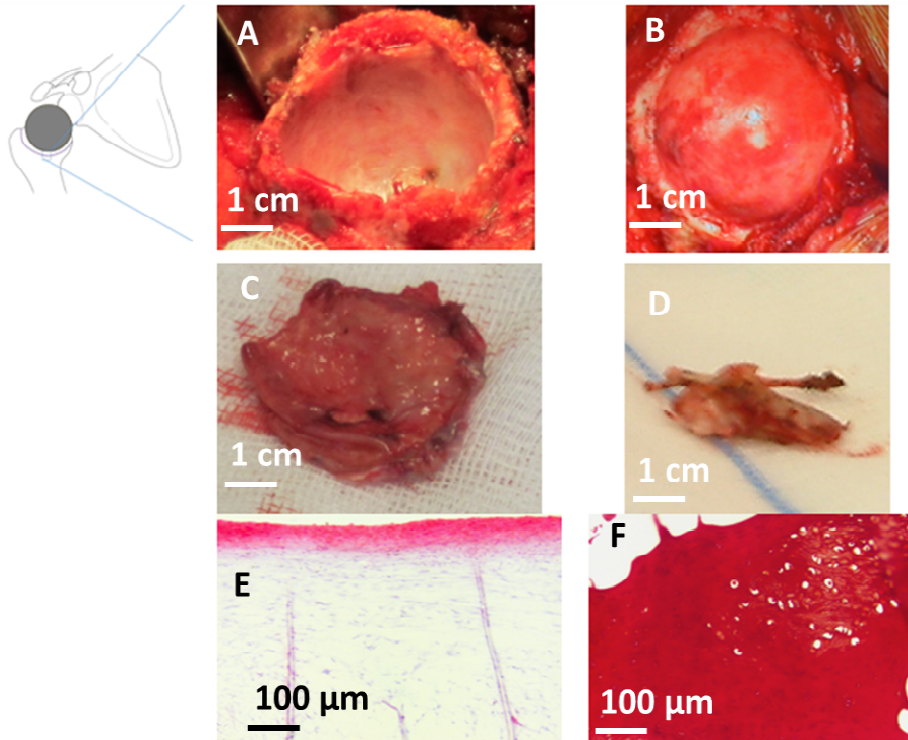


Fig.E6 Photos (A,B,C,D) et coupes histologiques (E,F) des deux membranes extraites du côté humérus après explantation d'un implant d'interposition de type PyC : membrane épaisse (A,C,E) principalement fibreuse (E – bas de l'image) avec une couche fibro-cartilagineuse (E – haut de l'image) ; membrane fine (B, D,F) ayant une forte synthèse cartilagineuse (coloration intense rouge image F) et des amas cellulaires cartilagineux (régions vacuolaires blanches de l'image F)

Nous avons pu mettre en évidence sur cette membrane, du côté PyC, les immuno-marquages (figure E8) spécifiques de la formation d'un néo-cartilage : collagène II et aggrécane, mais aussi la coexistence du marquage fibreux (collagène I), moins accentué que le marquage collagène II (qui est bien visible même à l'intérieur des cellules) ce qui veut dire que c'est un tissu en train de se différencier en cartilage.

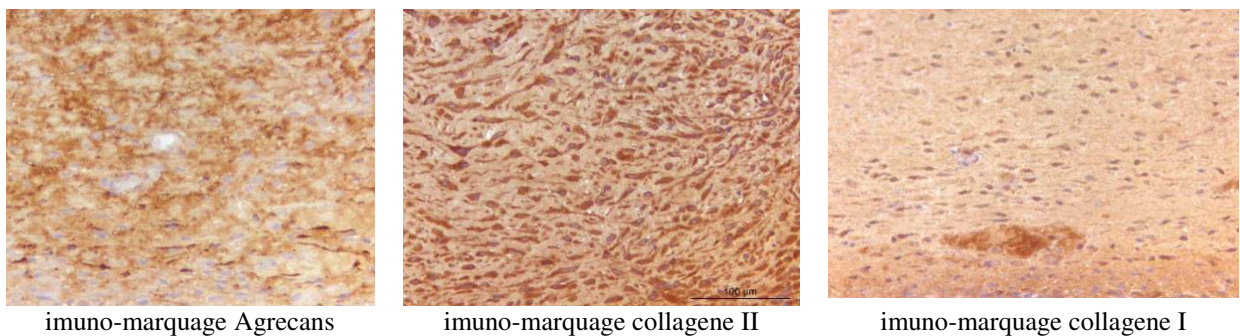


Fig.E8. Détails de la zone fibrocartilagineuse de la membrane du côté humérus avec différents immunomarquages spécifiques cartilage (collagène II et Aggrécane). On remarque que les cellules sont de type fibroblastique mais elles ont une intense activité de synthèse de collagène type II et aggrécane ce qui peut signifier que c'est un tissu qui se développe en cartilage (largeur de tous les images 400µm)

Nous avons pu mettre en évidence aussi sur cette membrane, du côté os deux aspects différents :

- 1) dans le cas où la membrane ne s'accroche pas bien à l'os nous observons des zones riches en particules noires (figure E9 A). Ces particules ne génèrent pas de réaction

inflammatoire, mais elles peuvent être à l'origine du décollement de la membrane et de la synthèse en grande quantité du tissu fibreux (il est connu que l'organisme est capable de synthétiser des tissus fibreux en grande quantité pour isoler les particules exogènes – exemple dans la fibrose pulmonaire [Cation2018]). Après expertise de la surface de l'implant PyC nous n'avons pas observé des traces visibles d'usure de cet implant, donc, actuellement on est en train d'expertiser ces particules afin de connaître la source

- 2) dans le cas où la membrane s'accroche bien à l'os nous observons des zones de croissance osseuse avec des chondrocytes hypertrophiés et sans particules d'usure.

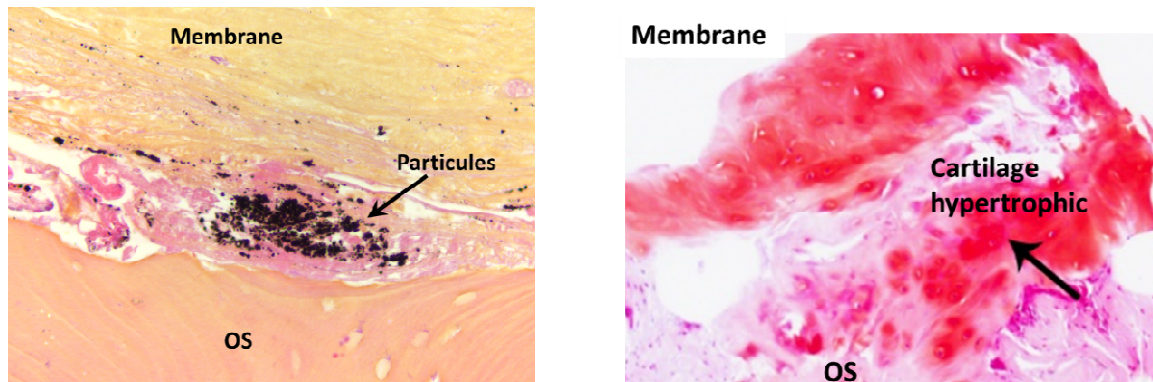


Fig.E8. Détails de l'interface membrane / os dans le cas : (A) d'une membrane qui se décolle facilement de l'os – on remarque la présence des particules noires ; (B) dans le cas d'une membrane qui colle bien sur l'os – on remarque la présence du cartilage hypertrophique signe d'une interface de remodelage osseux (largeur des images 400µm)

Nous avons aussi pu mettre en évidence la formation du même type de membrane sur un implant d'interposition d'une épaule immobilisée pendant 6 mois de traitement antiinflammatoire. Cela semble dire que hors mouvement articulaire l'implant d'interposition en PyC stimule le remodelage osseux et la formation d'un néo-cartilage.

Par conséquent, ce paragraphe montre qu'un tissu néo-cartilagineux est créé par remodelage osseux stimulé par le frottement d'un implant d'interposition PyC sur l'os spongieux de l'humérus. Dans certains cas ce tissu se décroche de l'os à cause de l'accumulation des particules exogènes à l'interface os / tissu néoformé. L'origine de ces particules reste à étudier.

E.2.1.1. Expertise des tissus adjacents à l'implant du côté glène

De côté cartilage glène (figure E9) frottant contre un implant d'interposition PyC nous avons observé deux cas :

- 1) un cas où le cartilage est en train de se fibroser car coexiste deux marquages collagène I et collagène II (figure E9, A, C, E). (pour rappel : le cartilage hyalin n'a pas de collagène I)
- 2) un autre cas où une membrane fibro-cartilagineuse, semblable à celle du côté humérus, est créée (figure E9, B,D,F)

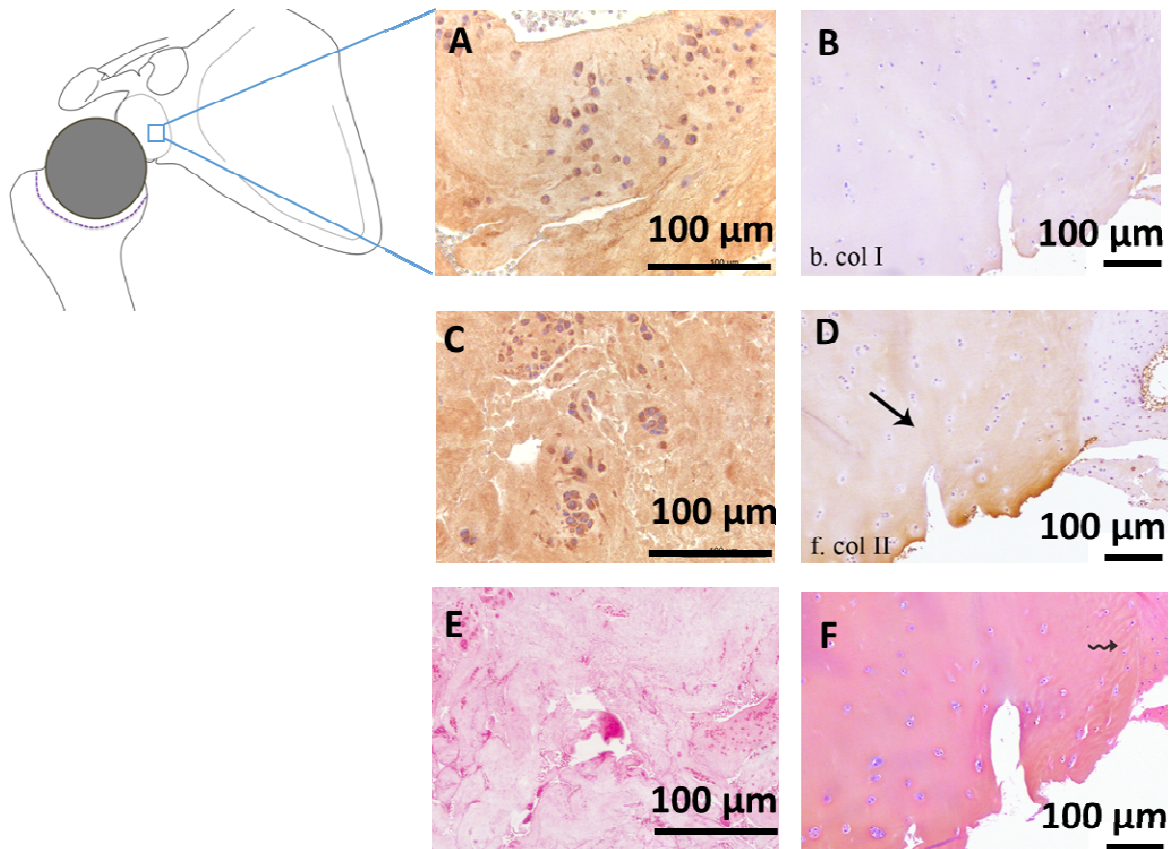


Fig.E9 Coupes histologiques de prélèvements du côté glène frottant contre un implant d'interposition PyC au niveau de l'épaule : cartilage qui est en train de friboser (A,C,E) avec coexistence de immunomarquage collagène I (A) et collagène II (B) et une coloration diffuse des proteoglycanes (E – coloration SO) ; membrane cartilagineuses formée du côté glène (B,D,F) – aspect cartilagineux avec plus de collagène II (D) que du collagène I (B) et une coloration homogène des proteoglycanes (F – coloration SO)

Ces résultats d'expertises montrent que le fonctionnement *in vivo* d'un implant d'interposition en PyC stimule le remodelage osseux par la formation d'une membrane fibro-cartilagineuses. La qualité de cette membrane semble à être meilleure sur un os non couvert de cartilage pathologique que sur un os couvert de cartilage pathologique. Cela pourrait s'expliquer par le l'apport des cellules mésenchymateuses du côté sang qui sont à l'origine de la formation de cette membrane. Il semble que si l'implant PyC est contraint de frotter contre un cartilage pathologique sans apport des cellules mésenchymateuses le cartilage va continuer à s'abimer en se fibrosant.

Dans ce contexte, notre question est quel est le rôle du matériau (PyC ou d'autre matériau ?) par rapport au rôle des contraintes mécaniques (sphère frottant librement dans l'articulation ou encastrée dans l'humérus ?) et celui des contraintes biologiques (apport de sang dans le contact frottant ou non ?)

E2.2. Evaluer le rôle du matériau dans le remodelage osseux

Afin d'évaluer le rôle du matériau dans le remodelage osseux nous avons fait des cultures cellulaires primaires de chondrocytes embryonnaires extraites des articulations du genou et de la hanche des souris. Ainsi, en collaboration avec l'équipe MEM², ICBMS Lyon :

- 1) une partie de la culture a été faite pour évaluer les capacités des chondrocytes à minéraliser en présence des deux matériaux : PyC et CrCo (matériaux de référence dans les implants articulaires). Pour cela des milieux de cultures stimulant la minéralisation ont été rajoutés pendant 21 jours de culture

- 2) et l'autre partie a été faite pour évaluer les capacités des cellules en contact avec PyC et CrCo à synthétiser du cartilage hyalin. Nous avons toujours utilisé une culture cellulaire contrôle (CTRL) faites sans présence des matériaux avec le même type des plaques de culture.

Les résultats (figure E9) montrent que :

- 1) en ce qui concerne la synthèse du cartilage (premier ligne de la figure E10 – immunomarquage collagène type II, spécifique du cartilage) le PyC favorise la synthèse du cartilage hyalin (marquage collagène II très intense image B dans la figure E10 – beaucoup plus que le CTRL – image A et le CrCo – image C)
- 2) en ce qui concerne la minéralisation (deuxième ligne de la figure E10, coloration spécifique Von Kossa en marron-noir des cristaux minéraux) le PyC diminue moins la minéralisation que le CrCo

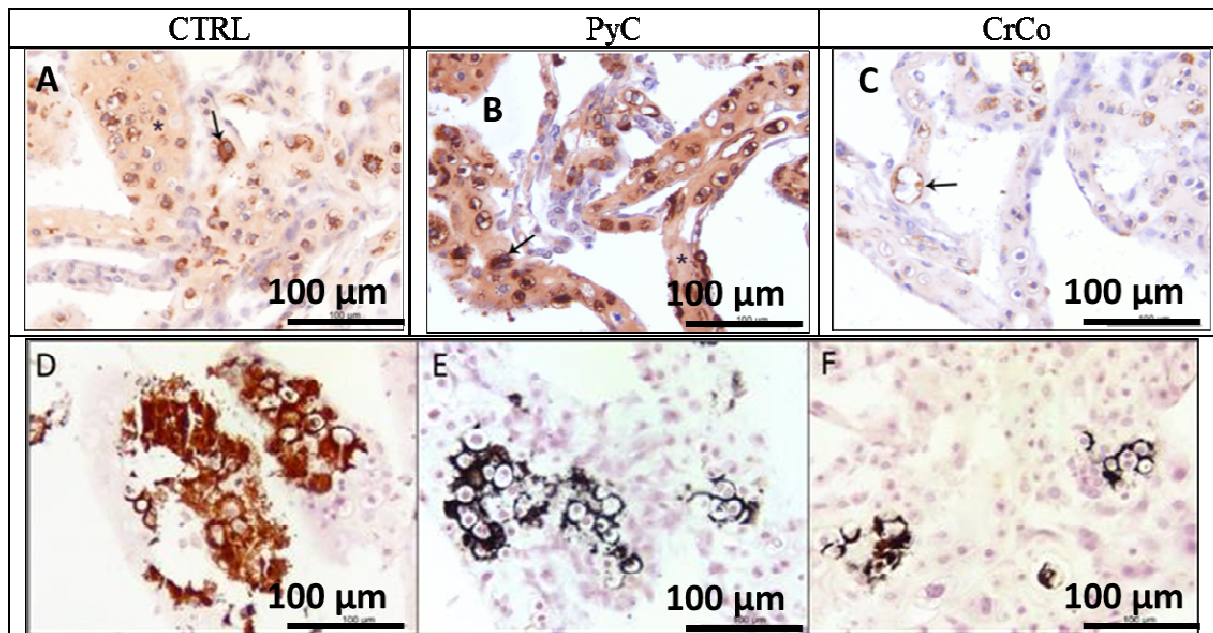


Fig.E10 Coupes histologiques faites sur les membranes cellulaires extraites après 21 jours de culture en absence (CTRL) ou présence de biomatériaux (PyC ou CrCo) : première ligne immunomarquage spécifique du cartilage (collagène II en marron) ; deuxième ligne – coloration von Kossa – spécifique pour faire ressortir en marron-noir les cristaux minéraux (figure extraite de la publication Hannoun A. 2018)

Ces résultats montrent que le PyC favorise la croissance du cartilage. Cela pourra être dû à l'absorption des couches lipidiques et des vésicules dans les microporosités de la surface du PyC ce qui empêche l'étalement du chondrocyte sur ces surfaces et favorise une culture 3D. Nous avons pu mettre cela en évidence par microscopie électronique des chondrocytes après culture. Ainsi la figure E11 montre les chondrocytes cultivées sur PyC qui se développent en multicouches 3D, tandis que les chondrocytes cultivées sur CrCo restent bien étalées sur le substrat en monocouche.

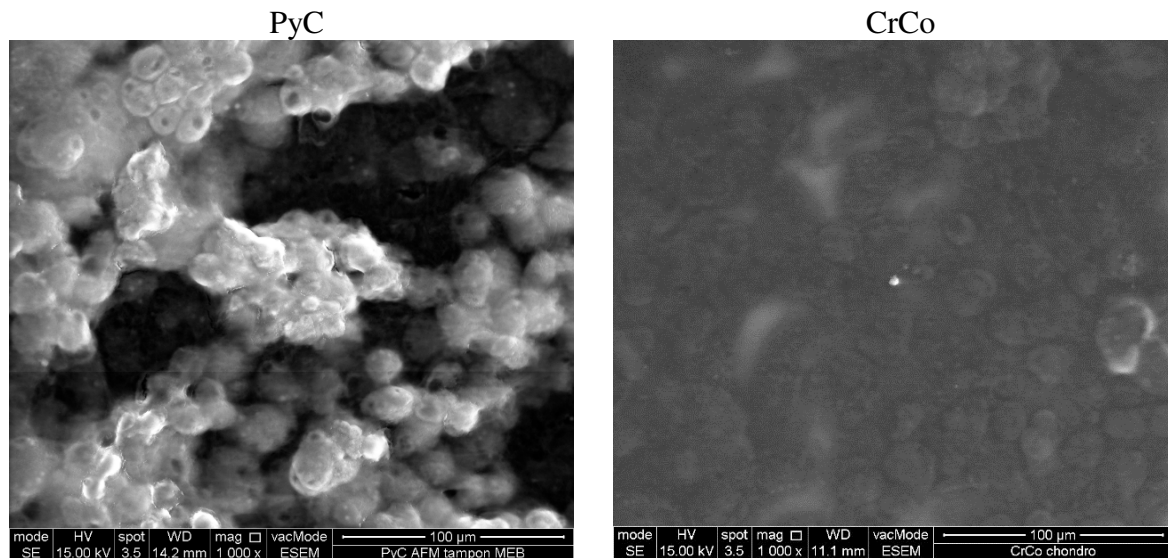


Fig.E11 Microscopie électronique a balayage des surfaces PyC (gauche) et CrCo (droite) après 21 jours de cultures cellulaires

Tous ces résultats nous montrent que le PyC est mieux par rapport au CrCo pour la synthèse du cartilage hyalin à travers une surface qui empêche l'adhésion des cellules. Comme cela a été montré dans le chapitre C – le PyC favorise l'adsorption des lipides tandis que le CrCo favorise l'adsorption des protéines, comme ce sont les protéines essentielles pour l'adhésion cellulaire cela pourrait expliquer pourquoi le CrCo favorise plus l'adhésion des cellules.

Par contre, la création d'un tissu cartilagineux épais dépend aussi des contraintes mécaniques. Ainsi, l'étude en cours (thèse Amira Hannoun) vise à utiliser le bioréacteur (présenté dans les chapitre A et D) en présence des plateaux en PyC afin de stimuler la synthèse du cartilage plus épais.

E2.3. Evaluer le rôle des contraintes mécaniques dans la synthèse du cartilage *in vivo*

Afin d'évaluer le rôle des contraintes mécaniques dans la synthèse du cartilage *in vivo* par frottement contre une surface en PyC nous avons expertisé l'état de cartilage de la glène comparativement après environ 5 ans de fonctionnement *in vivo* d'un implant mobil PyC et d'un implant fixé dans l'humérus (HAS).

Les résultats (figure E12) montrent que :

- 1) les deux implants favorisent la création d'une membrane néo-cartilagineuses marquée par une synthèse de collagène de type II (fig. E12 A et C)
- 2) du côté os adjacent à la membrane néo-synthétisé on remarque une zone vasculaire qui est marquée au collagène type II dans le cas d'implant fixé dans l'humérus (fig E12 D) et non marqué au collagène type II dans le cas d'implant mobile (fig E12 B). Cela montre un mécanisme de remodelage osseux différent dans les deux cas. Peut-être les contraintes mécaniques transmises par l'intermédiaire de l'implant mobile ne sont pas suffisantes pour activer le remodelage osseux et la synthèse du cartilage.

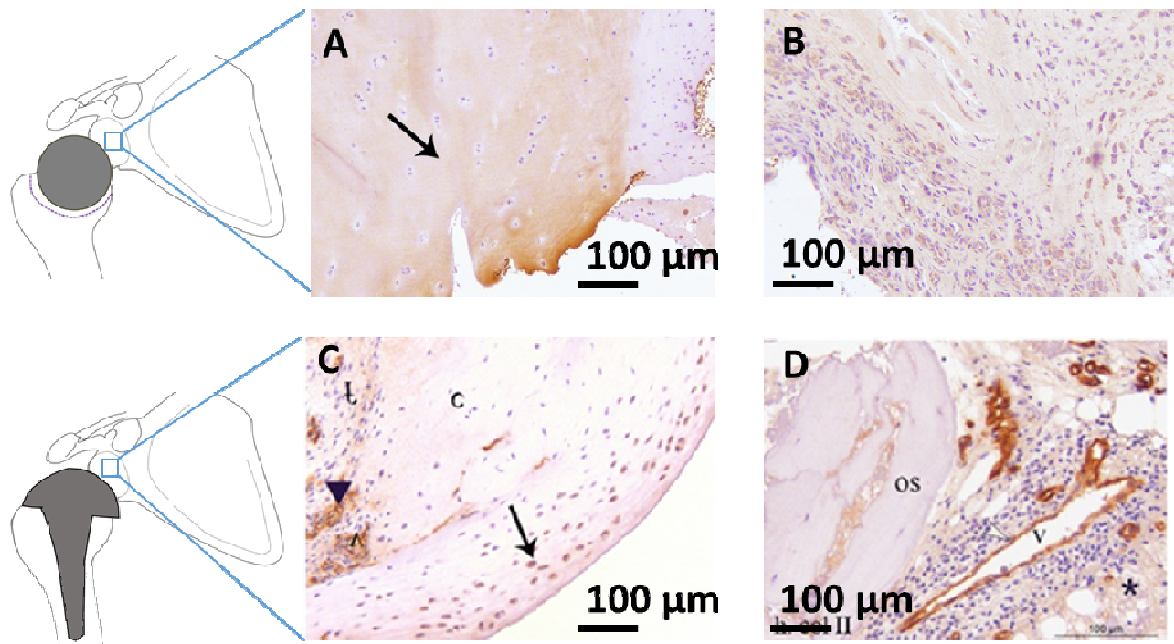


Fig.E12 Coupes histologiques faites sur les prélèvements glénoïdes après l'explantation d'un implant mobile PyC (A,B) ou d'un implant fixe HAS en PyC (C,D). On observe la présence du collagène II dans les prélèvements membranaires (A et C) avec une synthèse cellulaire plus accentuée dans le cas HAS (image C –localisation du marquage dans les cellules) tandis que dans le cas PyC mobile les cellules semblent à synthétiser moins de collagène II qui est plus présent dans la matrice (image A)

E2.3. Evaluer le rôle du matériau et des contraintes mécaniques dans la synthèse du cartilage *in vivo*

Afin d'évaluer le rôle des contraintes mécaniques et du matériau dans la synthèse du cartilage *in vivo* nous avons comparé les tissus formés par frottement dans le cas d'une hémiarthroplastie d'épaule en PyC par rapporte à une mêle hémiarthroplastie d'épaule en CrCo.

Les résultats (figure E13) montrent que les deux implants favorisent la création d'une membrane, mais cette membrane est différente du côté:

- 1) CrCo est seulement fibreuse car elle ne présente pas le marquage du collagène type II (fig. E13 C). Cette membrane a aussi beaucoup de particules visibles avec des zones inflammatoires (figure E13 A) comme réaction biologique aux particules d'usure CrCo
- 2) PyC est néo-cartilagineuse car malgré la présence des fibres de collagène I (figure E13 B) les cellules présentent une forte synthèse de collagène II (figure E13 D)

D'autre part l'analyse des tissus osseux adjacents à ces membranes montre du côté PyC (figure E13 F) un fort marquage en collagène II de vaisseaux sanguins de l'os ce qui veut dire que le remodelage osseux est très actif pour synthétiser du cartilage. Aucun marquage de ce type n'a pas été observé du côté CrCo (figure E13 E)

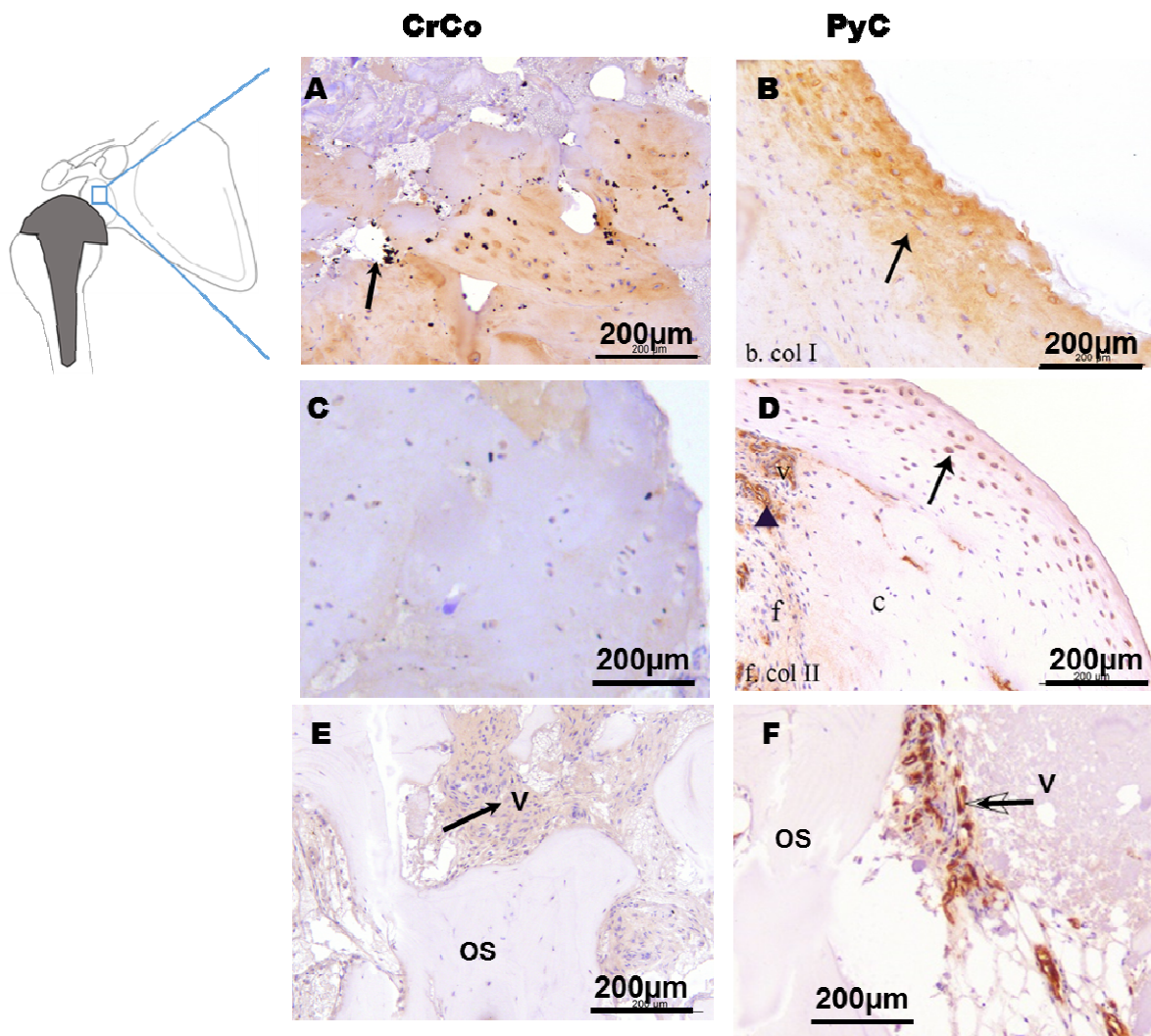


Fig.E12 Coupes histologiques faites sur les prélèvements glénoïdes après l'explantation d'un implant fixe de type hémiarthroplastie en CrCo (A,C,E) par rapport à un même implant en PyC (B, D, F). On observe la co-existence du marquage collagène I (B) et collagène II (D) dans les prélèvements membranaires du côté PyC. Un marquage intense du collagène type II est visualisé sur les capillaires sanguins de l'os adjacent à la membrane côté PyC (flèche de l'image F). La membrane néoformée du côté CrCo présente des zones fibreuses (marquage marron de la figure A) avec des zones inflammatoires présentant des particules noires (flèche de la figure A). On n'observe pas du marquage du collagène II du côté CrCo ni dans la membrane neo-synthétisé (C), ni dans les capillaires sanguins activant le remodelage osseux (flèche de l'image E)

Si on resume l'ensemble des expertises, on peut conclure que :

- 1) dans le cas d'implant mobile les contraintes de cisaillements sont plutôt localisées du côté de l'humérus ce qui explique que la membrane qui se trouve à cet endroit a une activité chondrogénique intense (figure E8) tandis que le cartilage du côté glène n'est pas beaucoup sollicité et il dégénère dans un cartilage fibreux (figure E9A – présence de collagène I marqueur de la fibrose),
- 2) dans le cas d'implant fixe en PyC les contraintes de cisaillements sont localisées du côté glène et elles sont d'une intensité modérée ce qui favorise la formation d'une membrane chondrogénique par l'activation du remodelage osseux (marquage intense du collagène II sur les capillaires sanguins de l'os adjacent à la membrane – figure E12D),

- 3) dans le cas d'implant fixe en CrCo les contraintes de cisaillements sont localisées du côté glène mais elles sont d'une intensité trop forte (module d'élasticité du CrCo dix fois supérieures à celles du PyC) ce qui favorise la formation d'une membrane fibreuse sans activation de la chondrogenèse (marquage collagène II absent sur les capillaires sanguins de l'os adjacent et dans la membrane neo-synthetisé – figure E13 C et E).

Un modèle numérique ainsi qu'un modèle animal sont en cours de mise au point afin de valider ces hypothèses et cibler des paramètres de fabrication de l'implant pour pouvoir optimiser la transmission mécanique et stimuler la synthèse du cartilage via les implants d'épaule en PyC.

A travers ces modèles, nous envisagerons d'analyser comment on pourra augmenter la qualité du cartilage du côté glène à travers le frottement d'un implant en PyC. Deux solutions sont envisagées :

- 1) dans l'arthroplastie mobile - adapter la cavité glénoïdienne à la taille de la bille pour mieux transmettre les contraintes mécaniques,
dans l'arthroplastie fixe - activer le remodelage osseux à partir de micro perforations dans l'os de la glène [Chen H 2011, Benthien2013]

Conclusions et perspectives

Ce travail tente d'apporter une vue d'ensemble sur le fonctionnement des articulations synoviales en rassemblant différents points de vues scientifiques qui, pris séparément, peuvent apparaître contradictoires. Cette vision d'ensemble permet d'identifier les réponses biologiques aux sollicitations tribologiques qui pourront être utilisées pour un diagnostic précoce des pathologies. Par ailleurs, le contrôle des sollicitations tribologiques peut moduler les réponses biologiques, ce qui pourra être la base de nouvelles techniques thérapeutiques.

Pour arriver à cette vue d'ensemble différents travaux ont été conduits en parallèle. Chacun travail visait la compréhension des mécanismes d'accommodations des vitesses dans un site biologique, impliquant 4 travaux en parallèle (complexes de surfaces / lubrifiant / cartilage / os). L'interaction entre ces 4 travaux menés en parallèle a été faite à travers le développement des méthodes capables d'analyser en même temps les paramètres mécaniques, physico-chimiques et biologiques nécessaires à une bonne compréhension des mécanismes tribologiques. Ainsi des méthodes biologiques, biochimiques, physicochimiques et mécaniques, qui prise séparément peuvent être considérés classiques ont été mise en commun et synchronisées dans le développement des moyens expérimentaux. Ces **moyens expérimentaux uniques** (bio-tribomètre et bio-tribo-réacteur), présentés dans le chapitre A, permettent d'une part la reconstitution *ex-vivo* et *in-vitro* du contact articulaire sous contraintes tribologiques réelles et d'autre part le suivi *in situ* des champs de déformés et de vitesses par microscopie confocale à fluorescence avec les techniques nano-physiques associées (FRAP, FRET ...). Ainsi, l'adaptation de ces méthodes et l'analyse couplée ou découplée des sites biologiques ont conduit à une vue d'ensemble du fonctionnement de l'articulation synoviale.

Comme cela a été décrite dans le chapitre B, pour assurer le mouvement articulaire avec un minimum de frottement on a une activation du **mécanisme du glissement dans les complexes de surfaces** composées des empilements de 3 à 7 bicouches lipidiques séparées par des couches aqueuses. Ce glissement est garanti par la composition lipidomiques de la bicouche lipidique, composition qui est en relation directe avec la nutrition et le métabolisme nutritionnel qui peut être perturbé dans certaines pathologies comme par exemple dans l'arthrose chez les obèses.

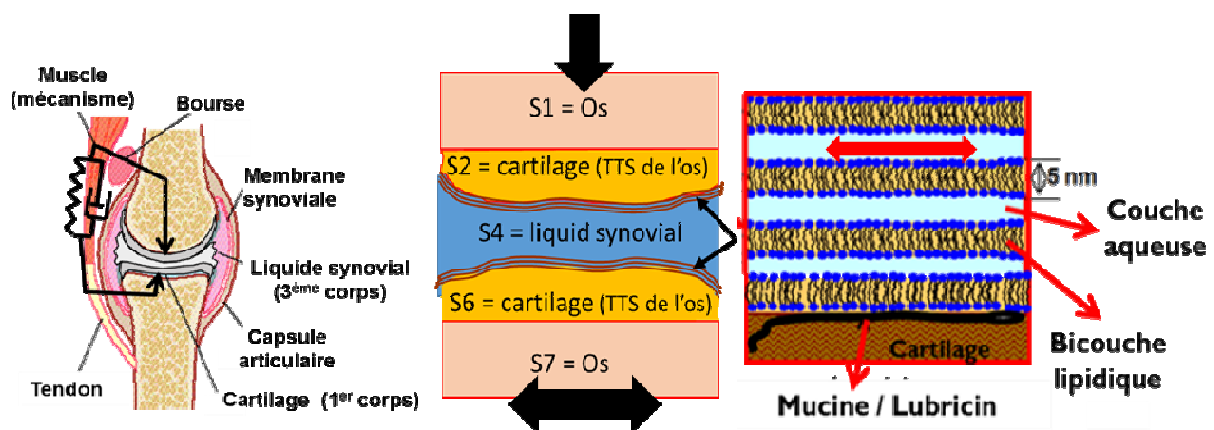


Fig.3 Schéma du mécanisme d'accommodation des vitesses dans les complexes de surfaces de type multicouches phospholipidiques

Comme a été présenté dans le chapitre C, pour assurer la portance hydrodynamique avec un maximum de film lubrifiant (protecteur contre l'usure des cartilages) on a une activation du **mécanisme de roulement dans les vésicules lipidiques micrométriques (portance hydrodynamique)** piégé entre les rugosités de surface des cartilages articulaires. La qualité mécanique de ces vésicules lipidiques est réglée par la qualité de la synthèse de ces vésicules dans les cellules bordant la cavité articulaire (les synoviocytes) mais aussi par leur métabolisation à travers les débits d'échanges nutritifs capillaires sanguins de la capsule articulaire / liquide synovial. A cet endroit il y a le premier système de contrôle de l'articulation qui est le nerf situé dans la capsule articulaire et qui va activer la sensation de douleur si une réaction inflammatoire s'installe comme réponse à des problèmes de synthèses ou de métabolisation du liquide synovial. C'est le site biologique qui est ciblé dans la thérapeutique des maladies inflammatoires comme dans les polyarthrites.

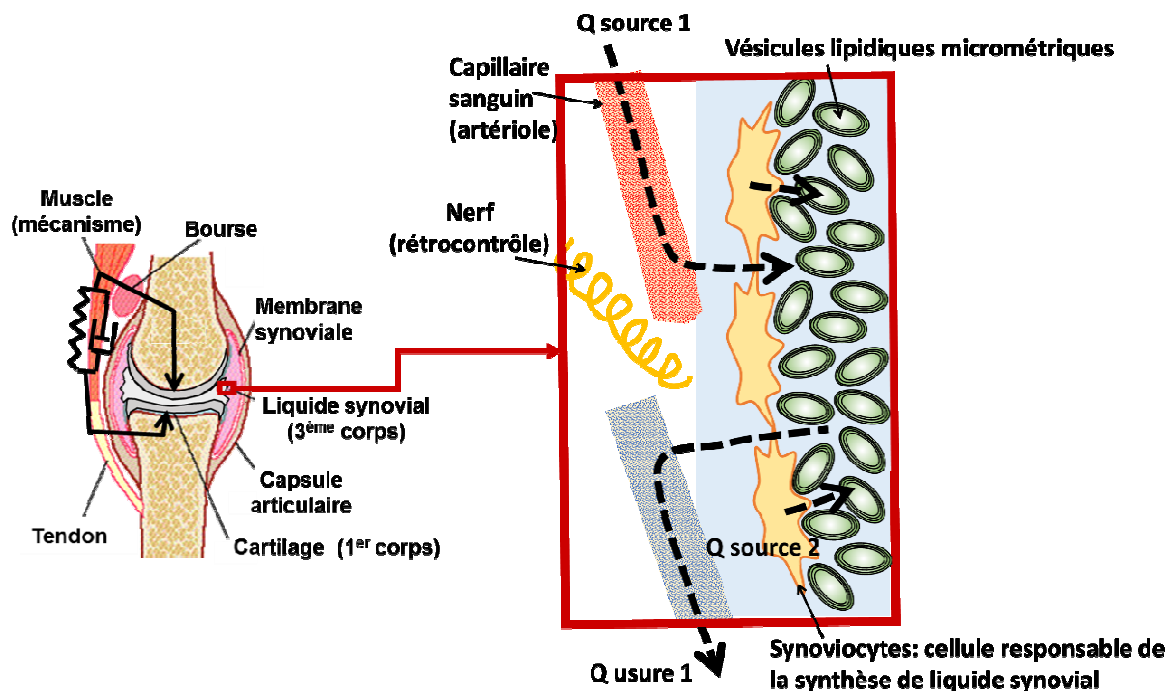


Fig.4 Schéma du mécanisme de synthèse et de métabolisation des vésicules lipidiques

Comme cela a été indiqué dans le chapitre C, pour assurer un bon amortissement articulaire et transformer une partie des contraintes tangentielle (mouvement articulaire) en contraintes normales (posture) on a une activation du **mécanisme de pression hydrostatique (portance hydrostatique)** qui permet de retenir l'eau au niveau des cartilages articulaires. La qualité de cette rétention d'eau (le maintien d'un niveau de pression hydrostatique d'environ 1 MPa, ce qui est efficace pour l'articulation) est contrôlé par la synthèse cellulaire (chondrocytes). Ainsi, les chondrocytes synthétisent des agrécans (complexe moléculaire qui retient l'eau) et du collagène II (fibres qui renforcent la chambre hydrostatique pour que l'eau ne sorte pas facilement du cartilage) seulement si elles perçoivent une contrainte isotope dynamique. Des fortes contraintes mécaniques unidirectionnelles font synthétiser aux chondrocytes des fibres de collagène type I, fibres qui sont à l'origine d'un vieillissement précoce du cartilage (arthrose des sportifs)

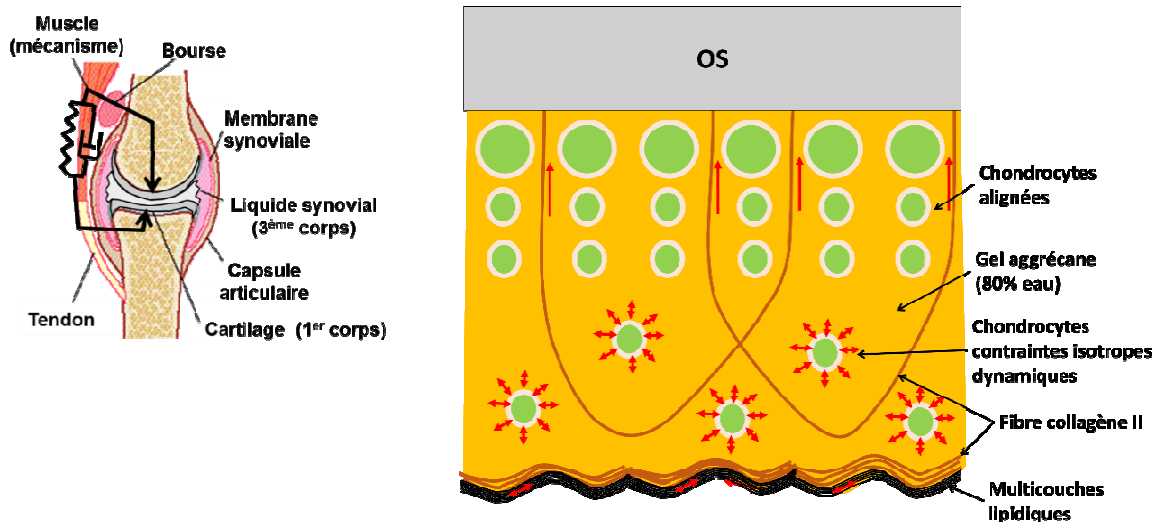


Fig.4 Schéma du mécanisme de transmission des contraintes isotopes aux cartilages

Comme cela a été indiqué dans le chapitre D, pour assurer un bon équilibre entre la transmission de la charge normale et le mouvement articulaire une activation du **mécanisme de synthèse osseuse / résorption osseuse** est activée au niveau de la zone de remodelage osseux. Ainsi des cellules osteoblastiques, dérivées des cellules sanguines de type mésenchymateuses, sont sensibles aux contraintes mécaniques unidirectionnelles et sont capable de se multiplier, de se différencier en ostéocytes et de synthétiser une matrice extracellulaire minéralisée capable de créer une résistance mécanique en réaction à la contrainte subie. En même temps des cellules osteoclastiques, dérivées des cellules sanguines de type macrophagique, sont sensibles aux particules d'usure d'os issues suite à l'équilibre des contraintes tangentielles et normales. En effet, la zone plus riche en particule d'usure d'une articulation est l'interface os/cartilage (zone du remodelage osseux). Dans ce contexte, on peut voir le cartilage articulaire comme un moyen d'accommoder les vitesses en décalant l'usure de la surface frottant à l'interface os/cartilage. Ce décalage permet une compensation efficace de l'usure grâce aux cellules osteoclastiques qui mangent les particules d'usure et les déchets du métabolisme cellulaire sont éliminés directement du côté os. A cet endroit il y a le un deuxième système de contrôle de l'articulation qui est le nerf qui accompagne les capillaires sanguins de l'os et qui est sensible a tout déséquilibre des contraintes à cet endroit. Ainsi ce site biologique (zone de remodelage osseux) est cible pour traiter des pathologies liées os/cartilage qui sont des pathologies typiques de vieillissement : arthrose + ostéoporose.

En rassemblant tous ces aspects on arrive à un vison plus global (figure 5) qui ouvre des perspectives vers des applications diagnostiques et thérapeutiques en agissant directement sur les sites biologiques sensibles aux contraintes tribologiques. Ainsi :

5) Au niveau du **site : complexes de surfaces lipidiques** on peut envisager :

- a. d'utiliser la rhéologie lipidique pour développer des diagnostics précoces. En collaboration avec Thierry Granjon d'ICBMS on est en train de développer un marqueur fluorescent lipidique capable de réagir au changement de rhéologie lipidique. Ce marqueur de rhéologie lipidique pourra être utilisé hors de l'application articulaire. Ainsi des études sont démarrées pour utiliser ce marqueur de rhéologie lipidique pour :
 - i. détecter les stades précoces des cancers (thèse Jihen Zouaoui 2018),
 - ii. détecter des pathologies pulmonaires liées aux piégeages des particules de pollution dans le surfactant pulmonaire qui est composé de mêmes

structures lipidiques que les complexes de surfaces du cartilage articulaire (thèse Bogdan Munteanu 2015)

- b. développer des molécules capables de rétablir une bonne rhéologie lipidique. Comme par exemple - le curdlane phosphorylé développé en collaboration avec ICMPP Iasi Roumanie (présenté dans le chapitre B).
 - c. agir sur les habitudes nutritionnelles de certaines personnes afin d'apporter par la nutrition les bons composants lipidiques qui rétablissent la bonne rhéologie des multicouches lipidiques (un questionnaire nutrition / pollution / santé est entrain d'être mis au point par collaboration avec l'entreprise MINAPTH et la plateforme lipidomique de INSA Lyon)
 - d. contrôler l'accrochage des couches lipidiques sur les surfaces des implants articulaire afin de rétablir une bonne lubrification
- 6) Au niveau du **site : liquide synovial** on peut envisager de contrôler :
- a. la rhéologie des vésicules lipidiques pour développer des substituts de liquide synovial (*collaboration ICMPP Roumanie et Université de Bizerte Tunisie*)
 - b. la réaction inflammatoire à travers le contrôle biologique de la synthèse des vésicules. Plus précisément développer des molécules thérapeutiques qui agissent sur le génome cellulaire afin de résynthétiser les vésicules lipidiques redonnant le bon caractère lubrifiant au liquide synovial
 - c. l'autoréparation des fissures surfaciques du cartilage à travers des lubrifiant vésiculaires à rigidité contrôlé capable de stimuler la chondrogenèse sur des cartilages arthrosiques (*collaboration TORNIER et Rush Univerity USA*)
 - d. l'usure des implants articulaires ex vivo par développement des lubrifiants biomimétiques pour les simulateurs de marche. Cela permettra ensuite d'optimiser les implants articulaires en les personnalisant au milieu biologiques dégénératifs ou inflammatoires (*collaboration CORIN et INSERM St Etienne*)
- 7) Au niveau du **site : cartilage articulaire** on peut envisager de contrôler la transmission des contraintes mécaniques aux chondrocytes à travers le développement :
- a. des biomatériaux avec des propriétés mécaniques et physicochimiques contrôlées qui sont capables de s'adapter aux défauts d'usure *in vivo* et de transmettre aux chondrocytes les contraintes mécaniques dynamiques isotopes afin de stimuler l'autoréparation du cartilage *in vivo* (collaborations ICS Strasbourg et l'entreprise Acrylian)
 - b. des cultures cellulaires à contraintes mécaniques contrôlés (sous bio-tribo-reacteur) afin de pouvoir synthétiser de cartilage hyalin *in vitro* et aider à l'ingénierie tissulaire du cartilage (collaboration LBTI Lyon)
- 8) Au niveau du **site : os** on peut envisager contrôler la transmission des contraintes mécaniques pour stimuler le remodelage osseux par développent
- a. des techniques chirurgicales,
 - b. des géométries des implants,
 - c. des surfaces flottantes des implants.

pour activer la synthèse de néo-cartilagineuse *in vivo* (collaboration TORNIER et Rush Univerity USA)

En conclusion, ce travail ouvre la voie à l'identification (diagnostic) et aux contrôles (thérapeutique) des réponses biologiques aux sollicitations tribologiques à travers les structures de type multicouches lipidiques. Partant de là, il est aussi envisageable d'identifier

et de contrôler les réponses tribologiques à travers des sollicitations biologiques induites, par exemple, par le contrôle du système nerveux.

Dans la même logique, mais à plus long terme, il sera possible de développer une médecine personnalisée en adaptant le traitement au fonctionnement biologique pathologique qui peut être de type traumatique, inflammatoire ou dégénératif. Dans ce contexte, deux types de recherches médicales sont d'actualité : (1) personnalisation à partir de l'échelle macroscopique (organe) qui se base sur un biomimétisme structural et qui est très utile dans une thérapeutique plus chirurgicale; (2) personnalisation à partir de l'échelle cellulaire qui se base sur un biomimétisme fonctionnel pour stimuler la cellule et aider à l'autoréparation du tissu.

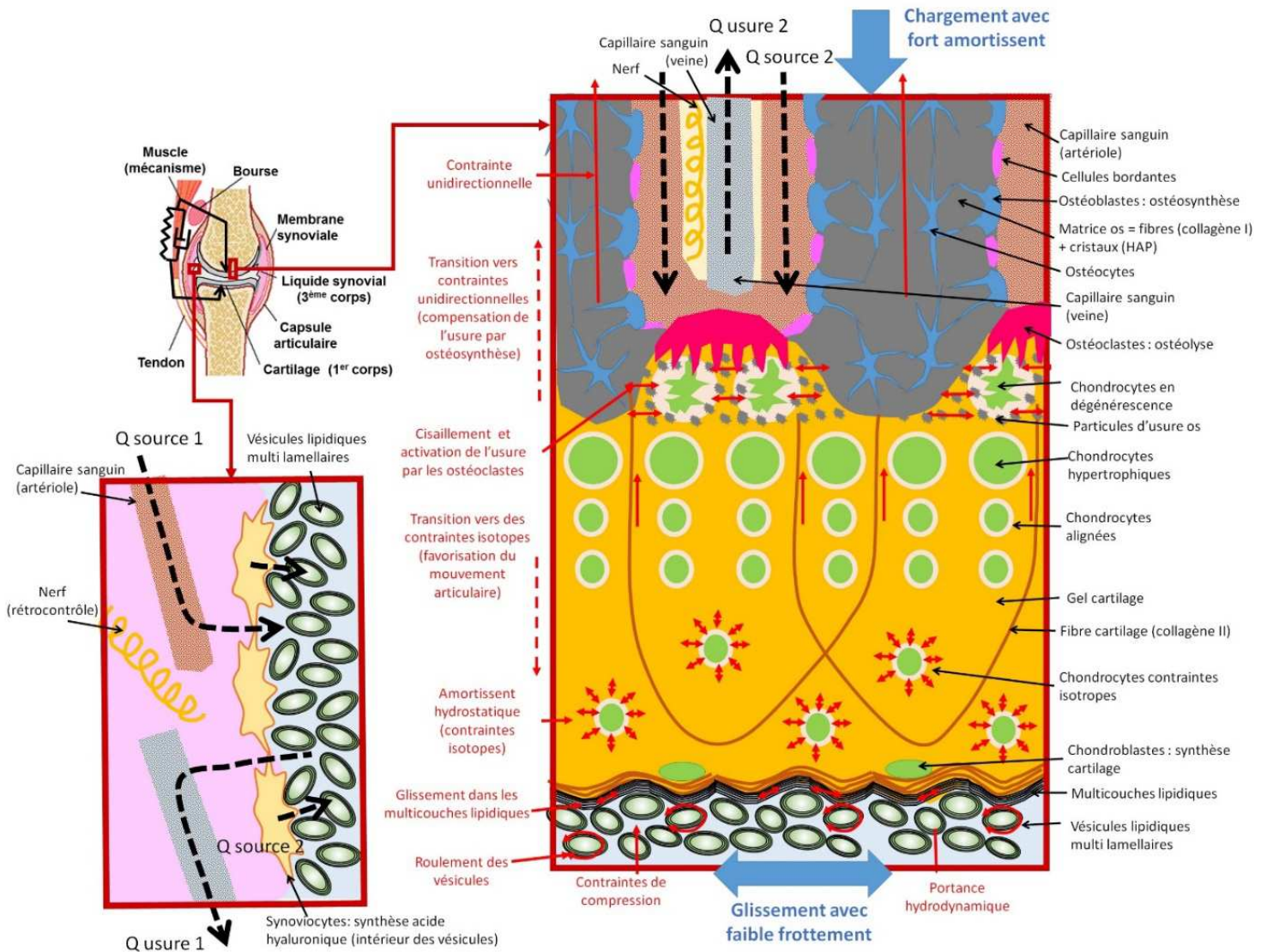


Fig.5 Schéma du vu global des mécanismes tribologiques actives pour maintenir l'homéostasie dans une articulation synoviale

Bibliographie

- Adam P, Farizon F, Fessy M-H (2014) Dual mobility retentive acetabular liners and wear: Surface analysis of 40 retrieved polyethylene implants. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 100: 85–91. doi:10.1016/J.OTSR.2013.12.011. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187705681300296X>.
- Affatato S, Spinelli M, Zavalloni M, Carmignato S, Lopomo N, Marcacci M, Viceconti M (2008a) Unicompartamental knee prostheses: in vitro wear assessment of the menisci tibial insert after two different fixation methods. *Phys. Med. Biol.* 53: 5357–5369. doi:10.1088/0031-9155/53/19/006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757998>.
- Affatato S, Leardini W, Rocchi M, Toni A, Viceconti M (2008b) Investigation on wear of knee prostheses under fixed kinematic conditions. *Artif. Organs* 32: 13–8. doi:10.1111/j.1525-1594.2007.00455.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18181798>.
- Aigner T, Stöve J (2003) Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1569–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623402>.
- Viscosupplémentation | Acide hyaluronique et arthrose - Part 2 . <http://hyaluronique-arthrose.com/category/visco-supplementation/page/2/>.
- Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physicochimique des assemblages moléculaires du fluide synovial (2006) . https://www.researchgate.net/publication/37813312_Modelo_bio-tribologico_des_articulaciones_Role_mecanico_et_physicoquimico_des_assemblajes_moleculares_del_fluido_synovial.
- Bulletin officiel de la Guyane française (2012a) . <https://solidarites-sante.gouv.fr/fichiers/bo/2012/12-11/steUne.htm>.
- Comptes nationaux de la santé 2012 - Ministère des Solidarités et de la Santé (2012b) . <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/etudes-et-statistiques/publications/documents-de-travail/serie-statistiques/article/comptes-nationaux-de-la-sante-2012>.
- Ashraf T, Newman J., Desai V., Beard D, Nevelos J. (2004) Polyethylene wear in a non-congruous unicompartamental knee replacement: a retrieval analysis. *Knee* 11: 177–181. doi:10.1016/j.knee.2004.03.004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194092>.
- Battaglia S, Taddei P, Tozzi S, Sudanese A, Affatato S (2014) Toward the interpretation of the combined effect of size and body weight on the tribological performance of total knee prostheses. *Int. Orthop.* 38: 1183–90. doi:10.1007/s00264-014-2297-y. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24570153>.
- Berthier Y, Godet M, Brendle M (1989) Velocity Accommodation in Friction. *Tribol. Trans.* 32: 490–496. doi:10.1080/10402008908981917. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10402008908981917>.
- Bitounis D, Pourchez J, Forest V, Boudard D, Cottier M, Klein J-P (2016) Detection and analysis of nanoparticles in patients: A critical review of the status quo of clinical nanotoxicology. *Biomaterials* 76: 302–312. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.10.061. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961215008716>.
- Blunn GW, Joshi AB, Lilley PA, Engelbrecht E, Ryd L, Lidgren L, Hardinge K, Nieder E, Walker PS (1992) Polyethylene wear in unicondylar knee prostheses. *Acta Orthop. Scand.* 63: 247–255. doi:10.3109/17453679209154776. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17453679209154776>.
- Bos I, Johannisson R (2004) Foreign body reactions in lymph nodes of oncology patients with joint prostheses—light-, electron microscopic and immunohistological investigations. *Pathol. - Res. Pract.* 200: 189–196. doi:10.1016/j.prp.2004.01.009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15200270>.
- Bosetti M, Lloyd AW, Santin M, Denyer SP, Cannas M (2005) Effects of phosphatidylserine

coatings on titanium on inflammatory cells and cell-induced mineralisation in vitro. *Biomaterials* 26: 7572–7578. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.033.

Bostan L, Trunfio-Sfarghiu AM, Verestiuc L, Popa MI, Munteanu F, Rieu JP, Berthier Y (2012) Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels as articular cartilage substitutes. *Tribol. Int.* 46: 215–224. doi:10.1016/j.triboint.2011.06.035. <http://dx.doi.org/10.1016/j.triboint.2011.06.035>.

Botan A, Joly L, Fillot N, Loison C, Mixed Mechanism of Lubrication by Lipid Bilayer Stacks, *Langmuir* : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 31, p. 12197-202 (2015)

Bougault C (2009) Identification de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la mécanotransduction des chondrocytes. <http://www.theses.fr>. <http://www.theses.fr/2009LYO10196>.

Brach del Prever EM, Bistolfi A, Bracco P, Costa L (2009) UHMWPE for arthroplasty: past or future? *J. Orthop. Traumatol.* 10: 1–8. doi:10.1007/s10195-008-0038-y. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19384628>.

Briscoe WH, Titmuss S, Tiberg F, Thomas RK, McGillivray DJ, Klein J (2006) Boundary lubrication under water. *Nature* 444: 191–194. doi:10.1038/nature05196. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17093447>.

Burton A, Williams S, Brockett CL, Fisher J (2012) In vitro comparison of fixed- and mobile meniscal-bearing unicondylar knee arthroplasties: effect of design, kinematics, and condylar liftoff. *J. Arthroplasty* 27: 1452–9. doi:10.1016/j.arth.2012.02.011. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883540312001210>.

Charni-Ben Tabassi N, Garnero P (2007) Monitoring cartilage turnover. *Curr. Rheumatol. Rep.* 9: 16–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437662>.

Collier JP, Mayor MB, McNamara JL, Surprenant VA, Jensen RE (1991) Analysis of the failure of 122 polyethylene inserts from uncemented tibial knee components. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 232–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1959276>.

Confalonieri N, Manzotti A, Pullen C (2007) Navigated shorter incision or smaller implant in knee arthritis? *Clin. Orthop. Relat. Res.* 463: 63–7. doi:10.1097/BLO.0b013e31811f3a30. <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003086-900000000-98814>.

Cooper JR, Dowson D, Fisher J (1993a) The effect of transfer film and surface roughness on the wear of lubricated ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin. Mater.* 14: 295–302. doi:10.1016/0267-6605(93)90016-Z. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/026766059390016Z>.

Cooper JR, Dowson D, Fisher J (1993b) Macroscopic and microscopic wear mechanisms in ultra-high molecular weight polyethylene. *Wear* 162–164: 378–384. doi:10.1016/0043-1648(93)90521-M. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004316489390521M>.

Costa L, Bracco P, del Prever EB, Luda MP, Trossarelli L (2001) Analysis of products diffused into UHMWPE prosthetic components in vivo. *Biomaterials* 22: 307–15. doi:10.1016/S0142-9612(00)00182-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205433>.

Costabel U, Du Bois RM, Egan JJ, S. Karger (Firm) (2007) Diffuse parenchymal lung disease. Karger.

Crawford MD, Kim HT (2013) New-onset synovial chondromatosis after total knee arthroplasty. *J. Arthroplasty* 28: 375.e1-4. doi:10.1016/j.arth.2012.04.015. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883540312002641>.

Crockett R (2009) Boundary Lubrication in Natural Articular Joints. *Tribol. Lett.* 35: 77–84. doi:10.1007/s11249-009-9430-x. <http://link.springer.com/10.1007/s11249-009-9430-x>.

Cummings NA, Nordby GL, Measurement of Synovial Fluid Ph in Normal and Arthritic Knees, *Arthritis & Rheumatism*, 1966, 9/1:47

D’Lima DD, Hermida JC, Chen PC, Colwell CW (2001) Polyethylene wear and variations in knee kinematics. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 124–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716373>.

Dirix Y, Gellner H, Materials HS-EC and, 2004 undefined The influence of steam sterilization on retrieved UHMW-PE parts. [ors.org](https://www.ors.org). <https://www.ors.org/Transactions/51/1689.pdf>.

Dowson D (1966) Paper 12: Modes of Lubrication in Human Joints. *Proc. Inst. Mech. Eng.*

- Conf. Proc. 181: 45–54. doi:10.1243/PIME_CONF_1966_181_206_02.
http://journals.sagepub.com/doi/10.1243/PIME_CONF_1966_181_206_02.
- Dowson D, Taheri S, Wallbridge NC (1987) The role of counterface imperfections in the wear of polyethylene. *Wear* 119: 277–293. doi:10.1016/0043-1648(87)90036-6.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043164887900366>.
- Dowson D, University of Leeds. Institute of Tribology., Institut national des sciences appliquées de Lyon. (1996) The third body concept : interpretation of tribological phenomena : proceedings of the 22nd Leeds-Lyon Symposium on Tribology, held in the Laboratoire de mécanique des contacts, Institut national des sciences appliquées de Lyon, France, 5th-8th September 1995. Elsevier.
- Dowson D, Unsworth A, Wright V (1970) Analysis of ‘Boosted Lubrication’ in Human Joints. *J. Mech. Eng. Sci.* 12: 364–369. doi:10.1243/JMES_JOUR_1970_012_060_02.
http://journals.sagepub.com/doi/10.1243/JMES_JOUR_1970_012_060_02.
- Dowson D, Jin ZM (1986) Micro-elastohydrodynamic lubrication of synovial joints. *Eng. Med.* 15: 63–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3709914>.
- Dunlop DD, Manheim LM, Yelin EH, Song J, Chang RW (2003) The costs of arthritis. *Arthritis Rheum.* 49: 101–113. doi:10.1002/art.10913. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12579600>.
- Ea H-K, Bazille C, Lioté F (2008) Histologie et physiologie de la membrane synoviale. *EMC - Appar. locomoteur* 3: 1–6. doi:10.1016/S0246-0521(08)41701-1.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0246052108417011>.
- Essefi I, Hakkouna H, Ouenzerfi G, Mollon G, Hamza S, Renault E, Berthier Y, Trunfio-Sfarghiu A-M (2016) Tribological characterisation of UHMWPE used in dual mobility total hip prosthesis. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 147: 012014. doi:10.1088/1757-899X/147/1/012014.
<http://stacks.iop.org/1757-899X/147/i=1/a=012014?key=crossref.bdd8c1ed84cbdebb4318083f77d41bf>.
- Eyre DR (2004) Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin. Orthop. Relat. Res.:* S118-22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15480053>.
- Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M (2007) Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 44: 59–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17538199>.
- Fisher J, McEwen HMJ, Barnett PI, Bell CJ, Stewart TD, Stone MH, Ingham E (2001) (i) Wear of polyethylene in artificial knee joints. *Curr. Orthop.* 15: 399–405. doi:10.1054/cuor.2001.0190.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268089001901902>.
- Flannery M, Jones E, Birkinshaw C (2008a) Analysis of wear and friction of total knee replacements part II: Friction and lubrication as a function of wear. *Wear* 265: 1009–1016. doi:10.1016/J.WEAR.2008.02.023.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043164808000793>.
- Flannery M, McGloughlin T, Jones E, Birkinshaw C (2008b) Analysis of wear and friction of total knee replacements: Part I. Wear assessment on a three station wear simulator. *Wear* 265: 999–1008. doi:10.1016/J.WEAR.2008.02.024.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043164808000781>.
- Forster H, Fisher J (1996) The Influence of Loading Time and Lubricant on the Friction of Articular Cartilage. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 210: 109–119. doi:10.1243/PIME_PROC_1996_210_399_02. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8688115>.
- Fortineau V (2010) Etude du comportement du ligament croisé antérieur du lapin en quasi-statique et en. doi:10.1016/j.ejmech.2006.11.002.
- Gale LR, Collier R, Hargreaves DJ, Hills BA, Crawford R (2007) The role of SAPL as a boundary lubricant in prosthetic joints. *Tribol. Int.* 40: 601–606. doi:10.1016/j.triboint.2005.11.006.
- Garnero P, Rousseau J-C, Delmas PD (2000) Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis Rheum.* 43: 953. doi:10.1002/1529-0131(200005)43:5<953::AID-ANR1>3.0.CO;2-Q.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817547>.
- Gatti AM (2004) Biocompatibility of micro- and nano-particles in the colon. Part II.

Biomaterials 25: 385–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585686>.

Gatti AM, Rivasi F (2002) Biocompatibility of micro- and nanoparticles. Part I: in liver and kidney. *Biomaterials* 23: 2381–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12013186>.

Geringer J, Boyer B, Farizon F (2011) Understanding the dual mobility concept for total hip arthroplasty. Investigations on a multiscale analysis-highlighting the role of arthrofibrosis. *Wear* 271: 2379–2385. doi:10.1016/J.WEAR.2011.02.027. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043164811003206>.

Gillette JM, Nielsen-Preiss SM (2004) The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization. *J. Cell Sci.* 117: 441–9. doi:10.1242/jcs.00909. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679310>.

Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A (2011) Lipid metabolism and osteoarthritis: Lessons from atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* 50: 133–140. doi:10.1016/j.plipres.2010.11.001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115041>.

Godet M (1984) The third-body approach: A mechanical view of wear. *Wear* 100: 437–452. doi:10.1016/0043-1648(84)90025-5. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043164884900255>.

Goodman SB (2007) Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials* 28: 5044–8. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.035. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207005315>.

Gunston FH (1971) Polycentric knee arthroplasty. Prosthetic simulation of normal knee movement. *J. Bone Joint Surg. Br.* 53: 272–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5578223>.

Hailey JL, Fisher J, Dowson D, Sampath SA, Johnson R, Elloy M (1994) A tribological study of a series of retrieved Accord knee explants. *Med. Eng. Phys.* 16: 223–228. doi:10.1016/1350-4533(94)90041-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1350453394900418>.

Hernigou P, Poignard A, Filippini P, Zilber S (2008) Retrieved Unicompartmental Implants with Full PE Tibial Components: The Effects of Knee Alignment and Polyethylene Thickness on Creep and Wear. *Open Orthop. J.* 2: 51–6. doi:10.2174/1874325000802010051. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590591>.

Hills BA (1989) Oligolamellar lubrication of joints by surface active phospholipid. *J. Rheumatol.* 16: 82–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2716011>.

Hills BA (2000) Boundary lubrication in vivo. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 214: 83–94. doi:10.1243/0954411001535264. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1243/0954411001535264>.

Hood RW, Wright TM, Burstein AH (1983) Retrieval analysis of total knee prostheses: A method and its application to 48 total condylar prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 17: 829–842. doi:10.1002/jbm.820170510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6619179>.

Jay GD, Harris DA, Cha CJ (2001) Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3)Gal-GalNAc oligosaccharides. *Glycoconj. J.* 18: 807–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441670>.

Keegan GM, Learmonth ID, Case CP (2007) Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient. *J. Bone Joint Surg. Br.* 89–B: 567–573. doi:10.1302/0301-620X.89B5.18903. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540737>.

Kendrick BJL, Longino D, Pandit H, Svard U, Gill HS, Dodd CAF, Murray DW, Price AJ (2010) Polyethylene wear in Oxford unicompartmental knee replacement. *J. Bone Joint Surg. Br.* 92–B: 367–373. doi:10.1302/0301-620X.92B3.22491. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190307>.

Kendrick BJL, Simpson DJ, Kaptein BL, Valstar ER, Gill HS, Murray DW, Price AJ (2011) Polyethylene wear of mobile-bearing unicompartmental knee replacement at 20 years. *J. Bone Joint Surg. Br.* 93–B: 470–475. doi:10.1302/0301-620X.93B4.25605. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464484>.

KIANI C, CHEN L, WU YJ, YEE AJ, YANG BB (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* 12: 19–32. doi:10.1038/sj.cr.7290106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942407>.

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

Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Kendoff D, Baumhoer D, Krukemeyer MG, Natu S, Boettner F, Zustin J, Kölbl B, Rütter W, Kretzer JP, Tiemann A, Trampuz A, Frommelt L, Tichilow R, Söder S, Müller S, Parvizi J, Illgner U, Gehrke T (2014) Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol. - Res. Pract.* 210: 779–786. doi:10.1016/j.prp.2014.09.017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25454771>.

Kurtz SM, Kurtz SM (2009) *UHMWPE biomaterials handbook : ultra high molecular weight polyethylene in total joint replacement and medical devices*. Elsevier/Academic Press.

Landy MM, Walker PS (1988) Wear of ultra-high-molecular-weight polyethylene components of 90 retrieved knee prostheses. *J. Arthroplasty* 3 Suppl: S73-85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3199143>.

Lappas CM (2015) The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.* 85: 78–83. doi:10.1016/j.fct.2015.05.015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26051351>.

Lequesne M, Menkès C-J (1995) *Atlas de l'arthrose*. NEGMA laboratoires.

Liu L, Bhatia R, Webster T (2017) Atomic layer deposition of nano-TiO₂ thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants. *Int. J. Nanomedicine* Volume 12: 8711–8723. doi:10.2147/IJN.S148065. <https://www.dovepress.com/atomic-layer-deposition-of-nano-tio2-thin-films-with-enhanced-biocompa-peer-reviewed-article-IJN>.

Manson TT, Kelly NH, Lipman JD, Wright TM, Westrich GH (2010) Unicompartmental knee retrieval analysis. *J. Arthroplasty* 25: 108–111. doi:10.1016/j.arth.2010.05.004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541358>.

Marcondes AR, Ueda M, Kostov KG, Beloto AF, Leite NF, Gomes GF, Lepienski CM (2004) Improvements of ultra-high molecular weight polyethylene mechanical properties by nitrogen plasma immersion ion implantation. *Brazilian J. Phys.* 34: 1667–1672. doi:10.1590/S0103-97332004000800029. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-97332004000800029&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

Mazzucco D, Spector M (2004) The John Charnley Award Paper. The role of joint fluid in the tribology of total joint arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.*: 17–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577461>.

Mirea DA, Trunfio-Sfarghiu A-M, Matei CI, Munteanu B, Piednoir A, Rieu JP, Blanchin MG, Berthier Y (2013) Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of synovial fluid. *Tribol. Int.* 59: 302–311. doi:10.1016/J.TRIBOINT.2012.06.015. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301679X12002071?via%3Dihub>.

Mitchelson AJ, Wilson CJ, Mihalko WM, Grupp TM, Manning BT, Dennis DA, Goodman SB, Tzeng TH, Vasdev S, Saleh KJ (2015) Biomaterial hypersensitivity: is it real? Supportive evidence and approach considerations for metal allergic patients following total knee arthroplasty. *Biomed Res. Int.* 2015: 137287. doi:10.1155/2015/137287. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883940>.

Mori S, Naito M, Moriyama S (2002) Highly viscous sodium hyaluronate and joint lubrication. *Int. Orthop.* 26: 116–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12078873>.

I. Martin, T. Smith, and D. Wendt, “Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products,” *Trends Biotechnol.*, vol. 27, no. 9, pp. 495–502, 2009

Neu CP, Komvopoulos K, Reddi AH (2008) The Interface of Functional Biotribology and Regenerative Medicine in Synovial Joints. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14: 235–247. doi:10.1089/ten.teb.2008.0047. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18601586>.

Newman J, Pydisetty R V, Ackroyd C (2009) Unicompartmental or total knee replacement: the 15-year results of a prospective randomised controlled trial. *J. Bone Joint Surg. Br.* 91: 52–7. doi:10.1302/0301-620X.91B1.20899. <http://online.boneandjoint.org.uk/doi/10.1302/0301-620X.91B1.20899>.

Ng L, Grodzinsky AJ, Patwari P, Sandy J, Plaas A, Ortiz C (2003) Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy. *J.*

- Struct. Biol. 143: 242–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572479>.
- Nine MJ, Choudhury D, Hee AC, Mootanah R, Osman NAA (2014) Wear Debris Characterization and Corresponding Biological Response: Artificial Hip and Knee Joints. *Mater. (Basel, Switzerland)* 7: 980–1016. doi:10.3390/ma7020980. <http://www.mdpi.com/1996-1944/7/2/980>.
- Oates KMN, Krause WE, Jones RL, Colby RH (2006) Rheopexy of synovial fluid and protein aggregation. *J. R. Soc. Interface* 3: 167–74. doi:10.1098/rsif.2005.0086. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849228>.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* 113: 823–839. doi:10.1289/ehp.7339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002369>.
- Oliviero F, Lo Nigro A, Bernardi D, Giunco S, Baldo G, Scanu A, Sfriso P, Ramonda R, Plebani M, Punzi L (2012) A comparative study of serum and synovial fluid lipoprotein levels in patients with various arthritides. *Clin. Chim. Acta.* 413: 303–7. doi:10.1016/j.cca.2011.10.019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037510>.
- Ouenzerfi G, Hannoun A, Hassler M, Brizuela L, Youjil S, Bougault C, Trunfio-Sfarghiu A-M (2016) Characterization of cell cultures in contact with different orthopedic implants biomaterials. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 147: 012015. doi:10.1088/1757-899X/147/1/012015. <http://stacks.iop.org/1757-899X/147/i=1/a=012015?key=crossref.6e510efe62ecbb16dd7210e77ef932c0>.
- Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D, Mori G, Bacchelli B, Ghosh P (1997) Hyaluronan–Phospholipid Interactions. *J. Struct. Biol.* 120: 1–10. doi:10.1006/JSBI.1997.3908. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847797939083>.
- Perkins TR, Gunckle W (2002) Unicompartamental knee arthroplasty: 3- to 10-year results in a community hospital setting. *J. Arthroplasty* 17: 293–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11938504>.
- Popa M, Wang N, Descartes S, Trunfio-Sfarghiu AM (2014) Role of Surface Industrial Finishing Process of Joint Implant UHMWPE on their Tribological Behaviour. *Appl. Mech. Mater.* 658: 465–470. doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.658.465. <https://www.scientific.net/AMM.658.465>.
- Price AJ, Oppold PT, Murray DW, Zavatsky AB (2006) Simultaneous in vitro measurement of patellofemoral kinematics and forces following Oxford medial unicompartamental knee replacement. *J. Bone Joint Surg. Br.* 88–B: 1591–1595. doi:10.1302/0301-620X.88B12.18306. <http://online.boneandjoint.org.uk/doi/10.1302/0301-620X.88B12.18306>.
- Pruzanski W, Vadas P, Stefanski E, Urowitz MB (1985) Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme. *J. Rheumatol.* 12: 211–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4032400>.
- Psychoyios V, Crawford RW, O'Connor JJ, Murray DW (1998) Wear of congruent meniscal bearings in unicompartamental knee arthroplasty: a retrieval study of 16 specimens. *J. Bone Joint Surg. Br.* 80: 976–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853488>.
- Rhee DK, Marcelino J, Al-Mayouf S, Schelling DK, Bartels CF, Cui Y, Laxer R, Goldbach-Mansky R, Warman ML (2005) Consequences of Disease-causing Mutations on Lubricin Protein Synthesis, Secretion, and Post-translational Processing. *J. Biol. Chem.* 280: 31325–31332. doi:10.1074/jbc.M505401200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000300>.
- Saikko V, Calonius O, Keränen J (2001) Effect of counterface roughness on the wear of conventional and crosslinked ultrahigh molecular weight polyethylene studied with a multi-directional motion pin-on-disk device. *J. Biomed. Mater. Res.* 57: 506–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553880>.
- Saikko V (2003) Effect of Lubricant Protein Concentration on the Wear of Ultra-High Molecular Weight Polyethylene Sliding Against a CoCr Counterface. *J. Tribol.* 125: 638. doi:10.1115/1.1537751. <http://tribology.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?articleid=1466939>.
- Saikko V, Shen M (2010) Wear comparison between a dual mobility total hip prosthesis and a typical modular design using a hip joint simulator. *Wear* 268: 617–621.

doi:10.1016/J.WEAR.2009.10.011.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043164809005730>.

Saragaglia D, Bonnin M, Dejour D, Deschamps G, Chol C, Chabert B, Refaie R, French Society of Hip and Knee the FS of H and (2013) Results of a French multicentre retrospective experience with four hundred and eighteen failed unicompartmental knee arthroplasties. *Int. Orthop.* 37: 1273–8.

doi:10.1007/s00264-013-1915-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715952>.

Sava MM, Munteanu B, Renault E, Berthier Y, Trunfio-Sfarghiu AM (2018) Tribological Analysis of UHMWPE Tibial Implants in Unicompartmental Knee Replacements: From Retrieved to In Vitro Studies. *Biotribology* 13: 1–15. doi:10.1016/j.biotri.2017.11.001.

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352573817300240>.

Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K (2003) Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr. Med. Chem.* 10: 2123–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871089>.

Schmidt TA, Gastelum NS, Nguyen QT, Schumacher BL, Sah RL (2007) Boundary lubrication of articular cartilage: Role of synovial fluid constituents. *Arthritis Rheum.* 56: 882–891.

doi:10.1002/art.22446. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17328061>.

Soltz MA, Ateshian GA (2000) Interstitial Fluid Pressurization During Confined Compression Cyclical Loading of Articular Cartilage. *Ann. Biomed. Eng.* 28: 150–159. doi:10.1114/1.239.

<http://link.springer.com/10.1114/1.239>.

Schurz, J.; Ribitsch, V. Rheology of synovial fluid. *Biorheology* 1987, 24, 385–399.

Stachowiak GW (Gwidon W. (2005) *Wear--materials, mechanisms and practice*. Wiley.

[https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=DBR75HUkYhEC&oi=fnd&pg=PA291&dq=Berthier+Y.,+Thirid+body+reality,+consequence+and+use+of+the+third+body+to+solve+a+friction+and+wear+problem,+G+Stachowiak+\(Ed.\),+Wear,+materials,+mechanisms+and+practice,+Wiley,+New+York+\(2005\)+478+p.+%5Bchapter+12%3Bp.+291-316%5D.+ISBN:0-470-01628-&ots=98nifMV4ZF&sig=LrTckkuBEUCOJ6u3GvajzF41UGA#v=onepage&q&f=false](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=DBR75HUkYhEC&oi=fnd&pg=PA291&dq=Berthier+Y.,+Thirid+body+reality,+consequence+and+use+of+the+third+body+to+solve+a+friction+and+wear+problem,+G+Stachowiak+(Ed.),+Wear,+materials,+mechanisms+and+practice,+Wiley,+New+York+(2005)+478+p.+%5Bchapter+12%3Bp.+291-316%5D.+ISBN:0-470-01628-&ots=98nifMV4ZF&sig=LrTckkuBEUCOJ6u3GvajzF41UGA#v=onepage&q&f=false)

Swann DA, Slayter HS, Silver FH (1981) The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 256: 5921–5.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7240180>.

Thrivikraman G, Madras G, Basu B (2014) In vitro/In vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Adv.* 4: 12763.

doi:10.1039/c3ra44483j. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ra44483j>.

Tolosano E, Altruda F (2002) Hemopexin: Structure, Function, and Regulation. *DNA Cell Biol.* 21: 297–306. doi:10.1089/104454902753759717. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042069>.

Trolez Y, Guillemin J-C (2005) Synthesis and Characterization of 2,4-Pentadiynenitrile—A Key Compound in Space Science. *Angew. Chemie Int. Ed.* 44: 7224–7226. doi:10.1002/anie.200502122. <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200502122>.

Unsworth A (1991) Tribology of Human and Artificial Joints. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 205: 163–172. doi:10.1243/PIME_PROC_1991_205_287_02.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1823790>.

Urban RM, Tomlinson MJ, Hall DJ, Jacobs JJ (2004) Accumulation in liver and spleen of metal particles generated at nonbearing surfaces in hip arthroplasty. *J. Arthroplasty* 19: 94–101.

doi:10.1016/J.ARTH.2004.09.013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15578561>.

Vincent M, Chemarin C, Cavalin C, Catinon M, Rosental P-A (2015) From the definition of silicosis at the 1930 Johannesburg conference to the blurred boundaries between pneumoconioses, sarcoidosis, and pulmonary alveolar proteinosis (PAP). *Am. J. Ind. Med.* 58: 31–38.

doi:10.1002/ajim.22518. <http://doi.wiley.com/10.1002/ajim.22518>.

WALKER, S. P (1973) A comparison of normal and artificial human joints. *Acta Orthop. Belgica Suppl.* 39: 43–54. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029610290/>.

Walton MJ, Weale AE, Newman JH (2006) The progression of arthritis following lateral unicompartmental knee replacement. *Knee* 13: 374–377. doi:10.1016/j.knee.2006.05.005.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876420>.

Wang N, Trunfio-Sfarghiu A-M, Portinha D, Descartes S, Fleury E, Berthier Y, Rieu J-P (2013) Nanomechanical and tribological characterization of the MPC phospholipid polymer photografted onto rough polyethylene implants. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 108: 285–94. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.02.011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563296>.

Watanabe M, Leng C-G, Toriumi H, Hamada Y, Akamatsu N, Ohno S (2000) Ultrastructural study of upper surface layer in rat articular cartilage by "in vivo cryotechnique" combined with various treatments. *Med. Electron Microsc.* 33: 16–24. doi:10.1007/s007950000003. <http://link.springer.com/10.1007/s007950000003>.

Waldman S. D., D. C. Couto, M. D. Grynopas, R. M. Pilliar, and R. A. Kandel, “Multi-axial mechanical stimulation of tissue engineered cartilage: Review,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 13, no. 613, pp. 66–73, 2007