



HAL
open science

Fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques : rôle des interfaces phospholipidiques

Magdalena Corneci

► **To cite this version:**

Magdalena Corneci. Fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques : rôle des interfaces phospholipidiques. Biomécanique [physics.med-ph]. INSA de Lyon, 2012. Français. NNT : . tel-00766779

HAL Id: tel-00766779

<https://theses.hal.science/tel-00766779>

Submitted on 21 Dec 2012

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.

THESE

Fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques : Rôle des interfaces phospholipidiques

Présentée devant
L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

École doctorale : **Mécanique, Énergétique, Génie Civil, Acoustique (MEGA)**, Lyon
Spécialité : **Biomécanique**

Pour obtenir
Le grade de docteur

Par

Magdalena Carla CORNECI

(Bio-Ingénieur médical, Université de Médecine et de Pharmacie, Iasi - ROUMANIE)

Soutenue le 21/ 09 / 2012 devant la Commission d'examen

Directeur de thèse	Y. BERTHIER	DR CNRS	INSA de LYON
Rapporteur	B. TINLAND	DR CNRS	CiNaM MARSEILLE
Rapporteur	D. OLARU	Professeur	Université de Iasi, Roumanie
Président du jury	M. LAGARDE	Professeur	INSA de LYON
Membre	M. GUICHARDANT	Professeur	INSA de LYON
Membre	A.M. TRUNFIO – SFARGHIU	CR CNRS	INSA de LYON
Membre	J.P. RIEU	Professeur	UCB LYON1

**Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures
(LaMCoS), CNRS UMR5259 – INSA de Lyon**

THESE DE DOCTORAT

*Fonctionnement tribologique des articulations synoviales
pathologiques : rôle des interfaces phospholipidiques*

Magdalena Carla CORNECI
INSA de Lyon, 2012

INSA Direction de la Recherche - Écoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr INSA : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI École Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr INSA : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43.12.94 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE http://ww2.ibcp.fr/ediss Sec : Safia AIT CHALAL INSA : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Johannes KELLENDONK Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 infomaths@univ-lyon1.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* M. OBADIA Lionel Sec : Viviane POLSINELLI INSA : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Learning from nature

“Biological materials and systems are multifunctional, adaptive, nonlinear, complex, and, in general, just "weird and wonderful".”

Biologist Stephen Wainwright, Duke University



http://wis-wander.weizmann.ac.il/site/en/weizman.asp?pi=686&doc_id=4055

Nano-biology

“Roaming a molecular-scale kingdom,
nanotechnologies may change the face of health care”

WIS, What we are doing about nanoscience

Dédicace

A mon cher Constantin,

Pour ton amour, ta tendresse, ta compréhension et plus spécialement pour tes encouragements de tous les jours pendant cette épreuve et tout le reste ...

A ma famille,

Les mots ne sauraient exprimer le respect, la reconnaissance et l'amour que je vous porterai à jamais

A tous mes vrais amis,

Pour leur soutien moral et leur affection, je leur souhaite un avenir rempli de joie, bonheur et accomplissements

A la mémoire de mon grand-père maternel,

Malgré l'absence, tes conseils m'accompagneront toujours pour me guider dans mes choix futurs

Et surtout

A la mémoire de ma grand-mère maternelle,

Voilà, ta petite fille a enfin tenu sa promesse ... mais t'es partie trop tôt pour l'apprendre ... merci d'avoir toujours eu confiance en moi, merci pour tes conseils et ta tendresse, pour la sagesse et les bons principes que tu m'a transmis depuis mon enfance ... les souvenirs resteront mais ta présence me manquera à jamais ...

Remerciements

Cette thèse a été préparée à l'INSA de Lyon, au sein du Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (*LaMCoS*) dirigé par le professeur Alain Combescure (et depuis septembre 2011 par M. David Dureisseix) et en étroite collaboration avec le Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures (*LPMCN*) d'Université Claude Bernard Lyon 1 et l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (*IMBL*) de l'INSA de Lyon.

Elle est l'avancement vers une recherche « bio » plus approfondie de l'équipe « Tribologie et Mécanique des Interfaces » (*TMI*) et plus particulièrement du groupe « Frottement, Usure et Lubrification Solide » (*FULS*), mené au LaMCoS par M. Yves Berthier, directeur de ma thèse.

Tout d'abord je tiens à remercier vivement **Yves Berthier** mon directeur de thèse qui, avec **Jean Paul Rieu** et **Ana Maria Tunfio-Sfarghiu**, ont su me montrer leur confiance et je veux leur témoigner ici que leurs encouragements et leurs conseils m'ont beaucoup aidé tout au long de ces années de recherches et d'épreuves parfois (trop) délicates.

Je tiens aussi à remercier d'avoir accepté d'être membre de mon jury et pour leur présence le jour de la soutenance tous les membres de jury : **Michel Lagarde** (président du jury), **Michel Guichardant**, avec une pensée particulière pour les rapporteurs **Bernard Tinland** et **Dumitru Olaru** qui ont eu la tâche délicate de relire et donner leurs avis sur ce travail de recherche. Je tiens à leur exprimer ici ma reconnaissance pour l'attention qu'ils ont portée à mon travail.

Ce travail de recherche n'aurait pas pu aboutir sans l'aide, le soutien et les conseils de plusieurs personnes que je tiens à remercier pour avoir été présents à mes côtés chaque fois que j'ai eu besoin d'eux :

- M. **Michel Guichardant** et M. **Michel Lagarde**, pour m'avoir donné accès et acceptée au sein de leur équipe à IMBL et M. **Jacques Bodennec** et **Ahmed Athanema** de Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire (*LPICM*, UCB Lyon1) sans qui la lipidomique serait restée pour moi un terrain encore peu exploré et parfois incompris ;
- M. le Prof. **Jean Paul Carret**, Mme **Françoise Carneva** et toute l'équipe « orthopédie » d'hôpital Edouard Herriot, pour m'avoir aidée à avoir des échantillons du fluide synovial si nécessaire dans mes recherches ;
- M. **Rémy Bougaran**, de *Corneal Industrie*, d'avoir accepté de prendre le relais et la collaboration pour la fabrication des ébauches de lentilles HEMA indispensables pour l'exploitation de notre modèle tribologique *ex vivo*.

Une pensée toute particulière et un grand merci à **Claude Godeau** et **Maurice Bouvier** (LaMCoS) ainsi qu'à **Michel Monchanin** (LPMCN) pour leur présence toujours souriante, leur bonne humeur, et surtout pour leurs précieux conseils et leur aide dans mes essais expérimentaux.

Le quotidien de ces années de recherches n'aurait pas pu être si convivial sans la présence de membre des différentes équipes au sein desquelles j'ai eu le plaisir de travailler. Il me vient à l'esprit : **Claire, Camille, Sylvie, Magali, Aurélien, Alexandra, Nicolas, Hayet, Soumia, Na, Anne-Marie, Mathieu** (LaMCoS), **Fairouz, Charlotte, Agnès, Elisabeth, Samuel, Jérémy, Marie-Geneviève** (LPMCN), **Magali, Ping, Patricia, Madeleine, Patrick** (IMBL) sans que cela veuille dire que ceux qui n'ont pas vu leur prénom ici soient oubliés. Merci à tous pour leur sympathie, les discussions, les rires et les bons moments qu'on a passés ensemble. Grâce à eux et à leur gentillesse, cette expérience s'est

révélée très enrichissante du point de vue scientifique bien entendu, mais aussi humain. Mon séjour parmi eux a été extrêmement agréable et restera un excellent souvenir.

Cette merveilleuse aventure n'aurait pas pu commencer sans l'aide, le soutien et les encouragements de plusieurs personnes, qui ont rendu possible mon arrivée en France (en tant qu'étudiante d'échange Erasmus) puis mon séjour (en tant que doctorante) à l'INSA de Lyon :

- M. le Prof. **Dumitru Olaru** (responsable Erasmus) et M. le Prof. **Mihai Gafitanu** (directeur de ma thèse en Roumanie) de la Faculté de Mécanique, Université Technique « Gheorghe Asachi » et le dr. **Lucian Popa** de l'hôpital d'Urgences de Iasi;
- M. le Prof. **Louis Flamand** de LaMCoS et M. **Jean Baptiste Chiocca**, Directeur des Résidences sur le campus, **Hélène, Pascale, Hans, Rose, Chrystel** et **Sandra** de la Mission Accueil, pour avoir contribué pleinement au bon déroulement de mon séjour à l'INSA.

Je tiens aussi à exprimer ici ma gratitude aux médecins que j'ai croisé durant cette période, cette fois-ci pour des raisons personnelles, les docteurs **Anne-Marie Ravel Chapuis, Pascal Seve** et **Corinne Bouchard**, puis le médecin du travail de l'INSA de Lyon, **Isabelle Joly** et toute son équipe à l'infirmerie du campus, ainsi qu'au docteur **Pascal Rostoucher** et aux kinésithérapeutes **Géraud Moreau** et **Thomas Dubie** de la Clinique de Tonkin, sans qui la récupération complète de ma main droite aurait été plus dure à surmonter. Je tiens aussi à remercier ici **Elisabeth Eccidio, Malika Bonnot** et tout particulièrement à **Nadège Ouakil**, qui m'ont soutenue et encouragée à avancer quand le quotidien est devenu parfois trop délicat.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans penser à :

- tout les roumains que j'ai connu et ceux avec qui j'ai travaillé pendant ces années de recherche, parmi lesquels je nomme ici les « insaliens » de vocation –**Stefan, Anda, Flavia, Monica, Iulia, Andrei, Mihai** ou bien ceux en « échange » de plus ou moins longue durée : **Ana-Maria, Eduard** et **Dominic, Iulia, Vlad, Luciana** (le meilleur souvenir de ce qu'on a partagé ensemble sera à jamais le saut à l'élastique ☺), **Bogdan M., Bogdan U., George, Tomita, Livia, Ionci, Nicoleta, Ana Maria, Adriana, Mme. Gina Stoica** et **Mme Luminita Irimescu**, qui, par leur présence, ont su « combler » les distances et ont fait possible de moins ressentir l'absence de la famille en faisant de notre mieux pour garder les traditions loin de chez nous (surtout en périodes de fêtes) ;
- mes amis que j'ai connu en France : **Claire, Camille, Aurélien, Pascale, Hélène, Edmond, Sandra** et **Jean Charles, Désiré, Jean Luc** et les « amap-iens » de « l'AMAP aux Potes », **Ionela** et sa famille, qui m'ont toujours soutenue dans mes projets et m'ont aidé à m'adapter et à « grandir » dans le quotidien français.

Je remercie beaucoup ma famille (avec une pensée toute particulière pour ma grande mère, **Magdalena** qui malgré nous avoir quitté récemment, restera vive dans mes souvenirs), ma belle famille et mes amies de longue date de Roumanie (plus particulièrement **Oana** et son mari **Catalin** et **Monica** et son mari **Ciprian**), qui m'ont toujours soutenue malgré la distance et les imprévus de la vie quotidienne.

Enfin, une pensée toute spéciale et pleine d'amour pour **Constantin**, ma moitié de tous les jours, sans qui je ne serais certainement pas arrivée à dépasser mes limites et à surmonter mes peurs et mes faiblesses afin de mener cette thèse à terme.

Avant – propos

Valorisation du travail de recherche

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet des :

- **communications orales ou posters** aux différents congrès, séminaires, ateliers et écoles thématiques : *Atelier Imagerie médicale (2006)*, *Biomed'D (2006, 2008)*, *Ecole d'été Leeds-Lyon (2007)*, *Journée LaMCoS (2008)*, *JFT (2008)*, *GDR CellTiss (2008)*, *Comefim'9 (2008)*, *Transalp'Nano (2008)*, *Leeds-Lyon (2009)*, *JIC (2009)*, *VarEHD (2010)*, *Ecole de tribologie (2010)*, *RoTrib (2010)*, *ICFD (2010)*, *Workshop de Biolubrification (2011)*, *Forum Microscopie (2011)* et *ICREN (2012)*.
- **publications scientifiques** dans des revues internationales à comité de lecture :
 - **Corneci, M.-C.**; Dekkiche, F.; Trunfio-Sfarghiu, A.M.; Berthier, Y.; Rieu, J.P., *Tribological properties of fluid phase phospholipid bilayers*, TRIBOLOGY INTERNATIONAL, 44(12), p. 1959-1968, Novembre 2011.
 - Dekkiche, F.; **Corneci, M.-C.**; Trunfio-Sfarghiu, A.M.; Munteanu, B.; Berthier, Y.; Kaabar, W.; Rieu, J.P., *Stability and tribological performances of fluid phospholipid bilayers: Effect of buffer and ions*. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES, 80 (2), pp. 232-239, 2010.
 - **M.C. Corneci**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, F. Dekkiche, Y. Berthier, M.-H. Meurisse and J.-P. Rieu, *Influence of lubricant physicochemical properties on the tribological operation of fluid phase phospholipid biomimetic surfaces*, ACTA TRIBOLOGICA, Vol. 18, (2010), ISSN 1220-8434, p. 58.
 - Simon Le Floc'h, **M.C. Corneci**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, M.-H. Meurisse, J.-P. Rieu, J. Duhamel, C. Dayot, F. Dang, M. Bouvier, C. Godeau, A. Saulot and Y. Berthier, *Imagerie médicale pour évaluer les conditions du fonctionnement tribologique des articulations synoviales*, ACTA TRIBOLOGICA, Vol. 18, (2010), ISSN 1220-8434, p. 65.
 - **M.C. Corneci**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, F. Dekkiche, Y. Berthier, M.-H. Meurisse, J.-P. Rieu, M. Lagarde and M. Guichardant, *Phospholipides dans le fluide synovial – influence sur le fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques*, ACTA TRIBOLOGICA, Vol. 18, (2010), ISSN 1220-8434, p. 77.
 - A.-M. Trunfio-Sfarghiu, **M.C. Corneci**, Y. Berthier, M.-H. Meurisse and J.-P. Rieu, *Mechanical and physicochemical analysis of the tribological operation of joint replacements*, ACTA TRIBOLOGICA, Vol. 18, (2010), ISSN 1220-8434, p. 89.
 - **Magdalena Corneci**, Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu, Yves Berthier, Marie-Helene Meurisse, Jean-Paul Rieu, Michel Guichardant, Michel Lagarde, *Nano-bio-tribologie: composition lipidiques - influence sur le comportement tribologique des articulations synoviales pathologiques*, BULETINUL INSTITUTULUI POLITEHNIC DIN IAȘI, Secția Construcții de mașini, Tomul LIV (LVIII), Fascicula 3, 2008, p.475-481.

Fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques : rôle des interfaces phospholipidiques

Résumé

Afin d'améliorer l'efficacité des traitements des pathologies articulaires, en tenant compte de leur complexité et de leur ampleur, des études récentes ont mis en évidence **le rôle des assemblages lipidiques associés à la structure discontinue du fluide synovial** dans le contrôle du fonctionnement tribologique articulaire. Ceci a conduit à la mise au point d'un modèle tribologique *ex vivo* (thèse AM Sfarghiu, 2006), proposant un « motif élémentaire » de la biolubrification articulaire, constitué de l'empilement d'interfaces phospholipidiques et de couches aqueuses.

En utilisant ce modèle, l'objectif de ce travail a été d'étudier l'évolution des interfaces phospholipidiques du fluide synovial en présence de pathologies. Pour ce faire, une méthodologie nano-bio-tribologique alliant des analyses **biochimiques, physicochimiques, nano-mécaniques** et **tribologiques** a été utilisée.

Les résultats de ces analyses montrent : l'influence de la faible rugosité des surfaces frottantes caractérisant les stades précoces des pathologies et celle des propriétés des interfaces phospholipidiques (liées à la variation de leur composition) sur la résistance mécanique, l'évolution au cours du frottement et la dégradation *in situ* des assemblages lipidiques des fluides synoviaux pathologiques. Le comportement des assemblages lipidiques est accentué par l'action des enzymes associées aux pathologies. Par conséquent, **le fonctionnement articulaire dépend de la résistance mécanique des interfaces phospholipidiques** et pour obtenir des coefficients de frottement très bas, l'accommodation de vitesse doit s'effectuer au niveau des couches d'hydratation qui entourent les ions présents dans la couche aqueuse.

Ces résultats permettront de comprendre à court terme **l'évolution des interfaces phospholipidiques dans les pathologies articulaires** et, à plus long terme le bon enchaînement cause/conséquence responsable d'une pathologie articulaire afin de développer des traitements plus efficaces, ciblés et non prothétiques.

MOTS-CLES : nano-bio-tribologie, analyse lipidomique, articulation synoviale pathologique, fluide synovial, assemblages lipidiques, lubrification par couches d'hydratation, triplet bio-tribologique, modèle *ex vivo*, phospholipides, coefficient de frottement, microscopie optique en fluorescence, microscopie de force atomique (AFM).

Tribological operation of pathological synovial joints: Role of phospholipidic interfaces

Abstract

In order to improve the effectiveness of joint diseases' treatments, given their complexity and magnitude, recent studies have highlighted the role of lipid assemblies associated with the discontinuous structure of the synovial fluid (SF) in the tribological performance of joint operation. Thus, an *ex vivo* tribological model (AM Sfarghiu, *PhD thesis, 2006*) providing a "basic pattern" for joint biolubrication was developed. It consists of the stack of phospholipidic interfaces and aqueous layers.

Using this model, the objective of this work was to study the evolution of phospholipidic interfaces of SF within pathological state. Therefore, a nano-bio-tribological methodology combining biochemical, physicochemical, nano-mechanical and tribological analysis was used.

The results of these analyses show: the influence of even small rubbing surfaces' roughness characteristics of early stage illness and that of phospholipidic interfaces' properties (related to their composition change) on the mechanical strength, changes in friction and *in situ* degradation of lipidic assemblies of pathological SF. The tribological operation is highlighted by enzymes' associated with diseases. Thus, joint operation depends on the mechanical strength of phospholipidic interfaces and to obtain very low friction coefficients, velocity accommodation must be done at the level of hydration layers surrounding ions in the aqueous solution.

These results would therefore allow **better understanding of the evolution of phospholipidic interfaces in joint diseases** and of the proper cause/consequence sequence responsible for a joint disease in order to develop more effective, targeted and non prosthetic treatments.

KEYWORDS: nanobiotribology, lipidomics, pathological synovial joint, synovial fluid, lipid assemblies, hydration lubrication layers, biotribological triplet, *ex vivo* model, phospholipids, friction, fluorescence optical microscopy, atomic force microscopy (AFM).

Functionarea tribologica a articulatiilor sinoviale patologice: rolul interfetelor fosfolipidice

Rezumat

Confruntati cu complexitatea si amploarea manifestarii patologiilor articulare, pentru a ameliora eficacitatea tratamentelor aplicate in aceste cazuri, studii recente au evidentiat rolul asamblajelor lipidice asociate structurii discontinue a fluidului sinovial (FS) in performantele tribologice ale functionarii articulare. Pentru aceasta a fost elaborat un model tribologic *ex vivo* (AM Sfarghiu, teza de doctorat, 2006) ce propune un „motiv elementar” pentru biolubrificarea articulara, constituit din intercalarea des interfete fosfolipidice si straturi de solutie apoasa.

Utilizand acest model, scopul acestei lucrari de doctorat a fost de a studia evolutia interfetelor fosfolipidice prezente in FS patologic. Pentru aceasta, s-a aplicat o metodologie de nano-bio-tribologie ce reuneste analize biochimice, fizico-chimice, nano-mecanice si tribologice.

Rezultatele acestor analize au evidentiat: influenta chiar a unei rugozitati reduse a suprafetelor de frecare (caracteristica stadiilor incipiente ale patologiei) si cea a proprietatilor interfetelor fosfolipidice (in special compozitia acestora) asupra rezistentei mecanice, a evolutiei in cursul frecarii si a degradarii *in situ* a asamblajelor lipidice din structura FS patologic. Comportamentul tribologic al acestor asamblaje este accentuat de actiunea enzimatica specifica patologiilor locale. Astfel, functionarea articulatiei sinoviale depinde de rezistenta mecanica a acestor interfete fosfolipidice si in plus, pentru a obtine coeficienti de frecare de valoare foarte scazuta, acomodarea vitezelor trebuie sa se realizeze la nivelul sferelor de hidratare care inconjoara speciile ionice prezente in stratul apos din structura FS.

Aceste rezultate permit intelegerea pe termen scurt, a **evolutiei interfetelor fosfolipidice in cadrul patologiilor articulare** si, pe termen lung, a „inlantuirii” logice „cauze-consecinte” responsabila de producerea si evolutia unei patologii articulare ce va permite dezvoltarea de tratamente non protetice mai eficiente.

CUVINTE CHEIE: nanobiotribologie, analiza lipidomica, articulatie sinoviala patologica, fluid sinovial, asamblaje lipidice, lubrifiere prin straturi de hidratare, triplet biotribologic, model *ex vivo*, fosfolipide, coeficient de frecare, microscopie optica in fluorescenta, microscopie de forta atomica

TABLE DE MATIERES

Dédicace	ix
Remerciements	xi
Avant-propos	xiii
Résumé	xv
Abstract	xvii
Rezumat	xix
TABLE DES MATIERES	xxi
LISTE DES ABREVIATIONS	xxv
LISTE DES FIGURES	xxvii
LISTE DES TABLEAUX	xxxiii
INTRODUCTION	1
Motivation socio-économique	1
Contexte scientifique	4
Objectif. Stratégie. Méthodologie	5
PARTIE A	7
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE – Bio-tribologie articulaire	7
A.1. Développement de la bio-tribologie articulaire	9
A.2. Le triplet tribologique articulaire	9
A.2.1. Composants du triplet tribologique articulaire	10
A.2.2. Composition du fluide synovial et proposition de structure	15
A.2.3. Hypothèses sur la lubrification limite avec du fluide synovial	21
A.3. Modèle tribologique <i>ex vivo</i> d'une articulation saine	26
A.3.1. Choix du mécanisme modèle	26
A.3.2. Choix des 1 ^{ers} corps modèle	27
A.3.3. Choix du 3 ^{ème} corps modèle	28
A.4. Pathologies articulaires	29
A.4.1. Facteurs mécaniques caractérisant les pathologies articulaires	29
A.4.2. Facteurs physico-chimiques caractérisant les pathologies articulaires	31
A.4.3. Facteurs biologiques caractérisant les pathologies articulaires	31
A.4.3.1. Modification de la synthèse des lipides	33
A.4.3.2. Rôle et action des enzymes dans les pathologies articulaires	33
A.5. Conclusions	40

PARTIE B

PARTIE EXPERIMENTALE – Analyse lipidomique des fluides synoviaux pathologiques 41

B.1. Objectifs des analyses lipidomiques	43
B.2. Structure et propriétés des phospholipides	44
B.2.1. Comportement des lipides dans l'eau	47
B.2.2. Propriétés des bicouches phospholipidiques	49
B.2.3. Réaction d'oxydation des lipides	51
B.2.4. Action des phospholipases sur les phospholipides	52
B.3. Analyse des FS pathologiques - Méthodologie	55
B.4. Résultats & discussions	57
B.4.1. Précautions et limites expérimentales	57
B.4.2. Echantillons analysés	59
B.4.3. Synthèse de résultats	60
B.4.4. Discussions	73
B.5. Conclusions & perspectives	77

PARTIE C

PARTIE EXPERIMENTALE – Comportement tribologique des interfaces phospholipidiques pathologiques 81

C1. ADAPTATION DU MODELE TRIBOLOGIQUE EX VIVO DU CAS SAIN POUR L'ETUDE DES PATHOLOGIES ARTICULAIRE	83
C1.1. Choix des corps en contact (1 ^{ers} corps)	84
C1.2. Choix du lubrifiant (3 ^{ème} corps)	85
C1.2.1. Lubrifiant – Interfaces phospholipidiques	86
C1.2.1.1. Méthodes générales pour la formation des bicouches	87
C1.2.1.2. Caractérisation des interfaces phospholipidiques	89
C1.2.2. Lubrifiant – la couche aqueuse	100
C1.3. Choix du mécanisme tribologique – dispositif expérimental	101
C1.4. Discussions et conclusions	106
C2. EFFET DE LA RUGOSITE DU SUBSTRAT SUR LES PROPRIETES TRIBOLOGIQUES DES BICOUCHES LIPIDIQUES	107
C2.1. Rugosité « macroscopique » de la surface de 1 ^{er} corps	107
C2.2. Rugosité « moléculaire » des interfaces phospholipidiques	112
C2.3. Discussions et conclusions	115
C3. SIMULATIONS DES MODIFICATIONS PHYSICO-CHIMIQUES ASSOCIEES AUX PATHOLOGIES	116
C3.1. Paramètres expérimentaux étudiés	116
C3.2. Milieu tamponné (solution buffer)	116
C3.3. Résultats	118
C3.3.1. Piégeage ou non de la couche aqueuse par les bicouches lipidiques	118
C3.3.2. Rôle du milieu tampon (stabilisateur du pH) et de la présence des ions	121
C3.3.3. Rôle du type de molécule tampon	125
C3.3.4. Rôle de la variation du pH (dans un même type de milieu tamponné)	128

C3.4. Discussions et conclusions	130
C4. SIMULATION DES MODIFICATIONS BIOLOGIQUES ASSOCIEES AUX PATHOLOGIES	133
C4.1. Paramètres expérimentaux étudiés	133
C4.2. Influence de la variation en composition chimique des « têtes » phospholipidiques pathologiques	133
C4.3. Action des enzymes	136
C4.4. Discussions et conclusions	141
C5. CONCLUSIONS	143
CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES	147
ANNEXES	153
1. Définition de l'arthrose (d'après OMS)	155
2. Schéma général de la physiopathologie de l'arthrose	156
3. Histologie et physiologie de la membrane synoviale	157
4. Evaluation de l'état pathologique du FS – analyse des prélèvements	161
5. Composition en PLs de FS de différentes espèces et comparatif avec le plasma sanguin	163
6. Calcul du nombre des bicouches qui peuvent être formées par les PLs du FS	165
7. Qu'est-ce que c'est la « lipidomique » ?	166
8. Les acides gras	171
9. Stockage (péremption) et manipulation des lipides	175
10. Préparation de solutions tampon (buffers)	177
11. Obtention ex vivo des solutions de vésicules par extrusion	181
12. Méthodes générales d'obtention des interfaces phospholipidiques	183
13. Principes de la chromatographie	186
14. Protocoles d'analyse lipidomique	191
15. Principe de fonctionnement des AFM	199
16. Principe de la Microscopie de Fluorescence	202
17. Principe de la technique de FRAPP	203
BIBLIOGRAPHIE	205

Liste des abréviations

<x>	Valeur moyenne
5-HETE	Acide 5-hydroxy-eicosatétraénoïque
AA	Acide arachidonique (20:4n-6)
AFM	Microscopie de force atomique (<i>angl</i> : atomic force microscopy)
AG	Acides gras
AGPIs	Acides gras polyinsaturés ($\omega 3$ et $\omega 6$) (<i>angl</i> . polyunsaturated fatty acids, PUFAs)
AH	Acide hyaluronique
ALP	Phosphatase alcaline
BHT	Hydroxytoluène butylé
BPS	Bicouches phospholipidiques supportées
CCM	Chromatographie sur couche mince (<i>angl</i> : thin layer chromatography, TLC)
μ	Coefficient de frottement
COX-1, COX-2	Cyclooxygénases 1 et 2
DHA	Acide docosahéaénoïc (22:6n-3)
DOPC _m	Bicouches DOPC obtenues par la méthode de co-adsorption des micelles
DOPC _v	Bicouches DOPC obtenues par la méthode d'éclatement des vésicules
ESI	ElectroSpray Ionisation
ESI - MS	Electrospray ionization mass spectrometry
FS	Fluide synovial
GAG	Glycosaminoglycanes
GC	Chromatographie gazeuse
GC-MS	Chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse
GPLs	Glycérophospholipides
HD	Lubrification Hydro - Dynamique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (<i>angl</i> : high performance liquid chromatography)
HS	Hyaluronate de sodium
IgG, IgA, IgM	Immunoglobulines
IL	Interleukine
L _{ox}	Lipoxygénase
LPC	Lyso-PC
LTB ₄	Leucotriène B ₄
LysoPLs	Lysophospholipides
MALDI	Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice
MS	Spectrométrie de masse
OA	Ostéoarthrose
P ₁ , P ₂	Protocoles d'extraction lipidique 1 et 2

PC	Phosphatidylcholine (lécithine)
PE	Phosphatidyléthanolamine (céphaline)
PGE ₁ , PGE ₂	Prostaglandine E ₁ , E ₂
PI	Phosphatidylinositol
pH _i	Point isoélectrique
PLA ₂	Phospholipase A ₂
P _{lip}	Phosphore lipidique
PLs	Phospholipides
PPC	Pyrophosphate de calcium
PRG 4	Proteoglycane
PS	Phosphatidylsérine
PTG	Prothèse totale de genou
PTH	Prothèse totale de hanche
RA	Arthrite rhumatoïde
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAPLs	Phospholipides tensio-actifs (<i>angl.</i> surface active phospholipids)
Sph	Sphingomyéline
TG	Triglycérides
T _m	Température de fusion, température de changement de phase (solide → fluide) d'un lipide (<i>engl.</i> melting temperature)
σ	Ecart type

Liste des figures

INTRODUCTION

- Fig. 1.** (a) Structure moléculaire du cartilage articulaire sain ; (b) progression de l'usure de cartilage lors de l'évolution arthrosique 2

Partie A

- Fig. 2.** Représentation schématique des articulations synoviales diarthrosiques de la main (*insert* : détail de la structure d'une articulation synoviale) 10
- Fig. 3.** Représentation schématique du triplet tribologique d'une articulation synoviale 11
- Fig. 4.** Représentation de différents régimes de lubrification articulaire 12
- Fig. 5.** Schéma de l'interface « membrane synoviale/cavité articulaire » où est synthétisé le FS 14
- Fig. 6.** Présence des vésicules sur la surface du cartilage articulaire – analyse cryo-MEB 18
- Fig. 7.** (a) Discontinuités dans le volume du FS ; (b) auto-assemblages tubulaires suite aux interactions entre l'AH et les SAPLs ; (c) SAPLs avec séparation de phases 19
- Fig. 8.** Interfaces lipidiques sur la surface du cartilage articulaire – analyse MET 20
- Fig. 9.** Modèle proposé pour la structure discontinue du FS 20
- Fig. 10.** Deux conformations et rôles possibles de la lubricine (lubrifiant limite dans l'articulation synoviale) sur le cartilage : (a) brosses denses de polyélectrolytes ; (b) molécule d'adhésion et protection des bicouches lipidiques (SAPLs) 23
- Fig. 11.** Schéma représentant une couche de SAPLs adsorbée sur la surface articulaire 24
- Fig. 12.** Représentation schématique du mécanisme de lubrification par ions d'hydratation 24
- Fig. 13.** Schéma du modèle tribologique *ex vivo* d'une articulation synoviale 26
- Fig. 14.** Schéma de la structure du cartilage articulaire et d'hydrogel HEMA 27
- Fig. 15.** Schéma sur la structure du 3^{ème} corps modèle 28
- Fig. 16.** Paramètres caractéristiques des pathologies articulaires agissant directement sur les interfaces phospholipidiques contenues dans le fluide synovial 30
- Fig. 17.** (a) Enchaînement causes – conséquences et (b) évolution des symptômes d'OA 32
- Fig. 18.** Schéma comparatif de l'état sain et pathologique d'une articulation synoviale : (a) cas sain - cartilage intact. (b) dégradation du cartilage dans le cas d'une arthrose accompagnée de l'inflammation de la membrane synoviale et la formation des excroissances osseuses 32
- Fig. 19.** Schéma reprise de Nitzan *et al.* [183,251] concernant l'évolution des modifications pathologiques au niveau articulaire : (a) destruction de la structure caractéristique du FS sain ; (b) dépolymérisation de l'AH ; (c) destruction du film lubrifiant avec contact direct possible entre les surfaces du cartilage articulaire 35
- Fig. 20.** Diagramme en ruban de la structure dimérique de l'ALP bactérienne 37
- Fig. 21.** Réactions *in vivo* pour la formation de l'apatite suite à l'action de l'ALP 38
- Fig. 22.** Action de l'ALP dans l'articulation synoviale : (a) structure du PPC ; (b, flèche) zone de minéralisation du cartilage articulaire dans l'articulation de genou ; (c, cercles rouges) dépôt des cristaux de PPC dans le FS 38
- Fig. 23.** Présence des cristaux de PPC dans la structure du FS, après coloration MGG 39

Partie B

Fig. 24.	Structure générale et représentation schématique de la structure d'un phospholipide	45
Fig. 25.	Représentation schématique de la structure d'un phospholipide	46
Fig. 26.	Différentes types de PLs en fonction de la structure des têtes polaires	46
Fig. 27.	Evolution de la charge relative des PLs en fonction de la variation de pH	47
Fig. 28.	Exemple de phases possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux	48
Fig. 29.	Organisation supramoléculaire des phospholipides (molécules amphiphiles)	49
Fig. 30.	Types d'assemblages formés par les molécules amphiphiles (détergents, phospholipides)	49
Fig. 31.	Schéma de la transition de phase d'une bicouche phospholipidique	50
Fig. 32.	Mouvements des phospholipides au sein d'une bicouche phospholipidique	50
Fig. 33.	Oxydation des lipides insaturés	52
Fig. 34.	Sites d'action des phospholipases	53
Fig. 35.	Action oxydative de la PLA ₂ sur les phospholipides avec libération d'un lysophospholipide et d'une chaîne d'acide gras	53
Fig. 36.	Structure de PLA ₂ (gauche) et interactions moléculaires enzyme-PL (droite)	53
Fig. 37.	Métabolisme de l'AA vers la libération des marqueurs d'inflammation (LTB ₄ , HETE)	53
Fig. 38.	(a) Oxydation enzymatique des PLs et (b) conséquences sur la structure et les assemblages de phospholipides	54
Fig. 39.	Protocole d'analyse lipidomique appliqué aux échantillons de FS	56
Fig. 40.	Présence des médiateurs lipidiques d'inflammation (LTB ₄ & 5-HETE) dans les FS pathologiques analysés (technique d'analyse : HPLC, pics caractéristiques d'adsorption)	61
Fig. 41.	Représentation comparative des résultats d'analyse du contenu en acides gras des chaînes acyles pour PE (en haut) et PC (en bas), obtenus en utilisant deux protocoles de séparation (P ₁ et P ₂) pour le prélèvement « AG »	67
Fig. 42.	Analyse quantitative (nanomoles) des FS sains et pathologiques. PLT = phospholipides totaux, barres d'erreurs à 12%.	68
Fig. 43.	Quantités (en % par rapport aux PLT) des phospholipides contenus dans les FS sains et pathologiques ; PLT = phospholipides totaux, barres d'erreurs à 12%	68
Fig. 44.	Profil des phospholipides (% par rapport aux PLT) contenus dans le FS sain et pathologique analysés suite à une séparation CCM 2D	69
Fig. 45.	Comparatif des résultats (% de PLT) pour les FS pathologiques analysés et les résultats de la bibliographie (pour le FS pathologique et le sang)	70
Fig. 46.	Modification de la structure et de l'organisation des interfaces phospholipidiques du FS suite à l'action de la PLA ₂ sur les bicouches lipidiques	74
Fig. 47.	Types de phospholipides qui peuvent être prédominants dans les FS analysés (structures moléculaires d'après <i>Avanti Polar Lipids</i>)	75
Fig. 48.	Structure des acides gras poly-insaturés contenus dans les PLs des FS analysés	76
Fig. 49.	Présence d'un phospholipide contenant le DHA (22 :6) dans une bicouche lipidique – effet sur ses propriétés (d'après [32])	76
Fig. 50.	Schéma synthétique concernant la composition, la structure et les propriétés des phospholipides	78

Partie C

Fig. 51.	Articulation synoviale : (a) coupe anatomique ; (b) triplet tribologique articulaire	83
Fig. 52.	Vérification de la propreté des surfaces : (a) microscopie optique ; (b) analyse AFM de la topographie de la surface du verre propre (avec profil en z selon la ligne indiquée)	85
Fig. 53.	Schéma du 3ème corps modèle (bicouches phospholipidiques et couche aqueuse)	85
Fig. 54.	Schéma d'une bicouche phospholipidique supportée	86
Fig. 55.	(a) Structure chimique et (b) vue 3D des molécules de DOPC et DPPC (* source : Avanti Polar Lipids ; taille des molécules dans JMol®)	87
Fig. 56.	Méthodes d'obtention des bicouches phospholipidiques supportées	88
Fig. 57.	Montage expérimental pour le rinçage (« goutte à goutte ») des interfaces phospholipidiques après incubation	88
Fig. 58.	Structure chimique et spectres d'excitation (partie gauche de chaque spectre) et d'émission (partie droite de chaque spectre) des lipides fluorescents (a) NBD-PC et (b) TRITC DHPE	89
Fig. 59.	Microscopie optique - exemples d'images qui peuvent être obtenus suite au dépôt des interfaces phospholipidiques sur les surfaces des 1ers corps	91
Fig. 60.	Photoblanchiment des interfaces phospholipidiques DOPC	92
Fig. 61.	(a) Présence des traces de lyso-PC au niveau des bicouches DOPCm (2 jours de maintien dans le milieu aqueux) et (b) absence dans le cas d'une bicouche DOPCm fraîchement préparée	92
Fig. 62.	Le levier et la pointe pyramidale AFM - image en microscopie électronique	93
Fig. 63.	Imagerie en microscopie de force atomique des bicouches de DOPCm préparées par la méthode de co-adsorption des micelles	94
Fig. 64.	(a) Présence des traces de détergent DDM au niveau des bicouches DOPCm à 1 incubation et (b) absence dans le cas d'une bicouche DOPCm à 2 incubations	95
Fig. 65.	(A) Principe du retour de fluorescence après photoblanchissement et (B) courbe de la remontée de fluorescence	96
Fig. 66.	Vieillessement des interfaces phospholipidiques de type DOPCm avec des traces importantes (1 incubation) et négligeables (2 incubations) de détergent DDM – analyse par FRAPP	97
Fig. 67.	Histogrammes correspondant à la force de pénétration (A,C) et à la distance de saut (B, D) mesurée par AFM pour des bicouches de DOPCm dans l'eau ultra pure en fonction du nombre d'incubations utilisées pour leur dépôt par la méthode de co-adsorption de micelles	97
Fig. 68.	Imagerie AFM des bicouches de DOPCm après deux incubations	98
Fig. 69.	Coefficient de diffusion moléculaire au niveau des bicouches de DOPCm après deux incubations, pour dilution rapide ou lente	99
Fig. 70.	Paramètres utilisés afin d'étudier le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques modèles	101
Fig. 71.	Dispositif expérimental	102
Fig. 72.	Visualisation <i>in situ</i> des interfaces phospholipidiques au niveau du contact	102
Fig. 73.	Visualisation du contact modèle articulaire avant frottement en microscopie optique : a) classique (lumière blanche) b) en fluorescence (lumière bleue)	103
Fig. 74.	Etalonnage du dispositif expérimental avant/après les mesures de frottement	104
Fig. 75.	Courbe d'étalonnage en début et à la fin d'un des essais tribologiques	104

Fig. 76.	Photo d'une courbe de frottement enregistré pendant les essais ex vivo sur le papier millimétrique	104
Fig. 77.	Améliorations et vue d'ensemble du dispositif expérimental	105
Fig. 78.	Analyse AFM, profil des rugosités des surfaces de verre neuves (surface de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$)	107
Fig. 79.	Analyse AFM, profil des rugosités de la surface en verre MG après deux protocoles différentes de nettoyage (sur une surface de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$)	108
Fig. 80.	Variation des profils de rugosité mesurés par AFM (surface de $5 \times 5 \mu\text{m}$) pour la surface en verre « poli » : (a) avant dépôt, après nettoyage et (b-c) après dépôt, avec des bicouches de DOPCv (b) et respectivement DOPCm 2 incubations (c)	109
Fig. 81.	Effet de la rugosité du substrat (P vs. MG) sur le comportement tribologique des interfaces DOPCv et DOPCm ; milieu aqueux : solution saline tamponnée (TS)	110
Fig. 82.	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	111
Fig. 83.	Représentation schématique des essais de frottement utilisant des interfaces phospholipidiques de type : DOPCv (a) et DOPCm (b)	112
Fig. 84.	Comportement tribologique des interfaces DOPCv et DOPCm – influence de la rugosité moléculaire mimée à l'aide de deux fluorophores attachés sur la tête (TRITC) et respectivement sur les queues (NBD) des phospholipides	113
Fig. 85.	Représentation schématique des essais de frottement utilisant des interfaces lipidiques contenant différents types de fluorophore	114
Fig. 86.	Structure chimique des molécules tampon utilisées : (a) TRIS; (b) TRIS-maléate;(c) acétate	117
Fig. 87.	Réactions chimiques à l'équilibre des milieux tampon utilisés : (a) TRIS; (b) TRIS-maléate;(c) acétate	118
Fig. 88.	Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-D), en fonction de nombre de bicouches présentes au niveau du contact (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai)	119
Fig. 89.	Formes typiques de courbes de frottement	120
Fig. 90.	Accommodation de vitesse lors des essais de frottement utilisant 1 et respectivement 2 interfaces lipidiques dans le contact	121
Fig. 91.	Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-E), en fonction de la stabilité du milieu aqueux (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai)	122
Fig. 92.	Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-C), en fonction de la présence des ions dans un milieu aqueux stable (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai)	123
Fig. 93.	Influence de la présence des ions dans la couche aqueuse sur la résistance nano-mécanique à l'indentation des bicouches DOPCm - spectroscopie de force AFM	124
Fig. 94.	Schéma d'un possible couplage chimique entre la molécule de tampon TRIS et la bicouche lipidique	125
Fig. 95.	Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-D) en fonction du type de molécule tampon dans le milieu aqueux (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai)	126
Fig. 96.	Influence de la molécule de tampon sur la résistance nano-mécanique à l'indentation des bicouches DOPCm - spectroscopie de force AFM	127
Fig. 97.	Variation du coefficient de diffusion en fonction de la molécule du tampon (analyse FRAPP)	128
Fig. 98.	Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-D) en fonction de la variation du pH dans le milieu aqueux tamponné avec le	129

	Tris (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai)	
Fig. 99.	Influence de la variation du pH (dans un milieu stable) sur la résistance nano-mécanique à l'indentation des bicouches DOPCm - spectroscopie de force AFM	130
Fig. 100.	Schéma présentant les couches d'hydratation au niveau des multicouches lipidiques du FS et le mécanisme de lubrification par sphères d'hydratations (ions entourés d'une couche fortement organisée de molécules d'eau)	132
Fig. 101.	(a) Structure chimique et (b) vue 3D (source : Avanti Polar Lipids) des molécules utilisées pour obtenir les interfaces phospholipidiques en phase fluide	134
Fig. 102.	Effet de la composition des interfaces phospholipidiques sur leur comportement tribologique	135
Fig. 103.	Image AFM d'une bicouche de DOPC+10%DOPI obtenus par la méthode de co-adsorption de micelles (2 incubations)	136
Fig. 104.	Effet de l'action de la PLA ₂ sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques : (A) coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai et (B-E) état de dégradation de la bicouche en fin d'essais	137
Fig. 105.	Effet de la présence du détergent DDM sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques : coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai (A) et état de dégradation de la bicouche en fin d'essais (B-C)	139
Fig. 106.	Réalité biologique : action de l'enzyme ALP et activation in situ de la minéralisation	140
Fig. 107.	Effet de l'action de l'enzyme ALP sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques : coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai (A) et état de dégradation de la bicouche en fin d'essais (B-I)	141
Fig. 108.	Évolution des interfaces phospholipidiques lors des pathologies articulaires	145
ANNEXES		
Fig. 109.	Schéma physiopathologique de l'arthrose	156
Fig. 110.	Structure histologique de la membrane synoviale normale	157
Fig. 111.	Synoviocytes (de type A et B) dans la membrane synoviale (vue en microscopie électronique)	158
Fig. 112.	Unité structurale de la molécule d'AH	159
Fig. 113.	Placement et rôle de l'analyse lipidomique dans les familles des techniques « -omiques »	166
Fig. 114.	Classes de lipides étudiées par l'analyse lipidomique	169
Fig. 115.	Classification des acides gras (en fonction de nombre de doubles liaisons, C=C)	171
Fig. 116.	Orientation de la chaîne acyle suite à la présence d'une liaison double, C=C	171
Fig. 117.	Comparaison des structures saturées, mono et poly-insaturées	172
Fig. 118.	Solutions buffers les plus courants en fonction du pH	177
Fig. 119.	(A) Mini-extruder et son positionnement correct (B) sur le block chauffant	182
Fig. 120.	Structure chimique d'une molécule de n-Dodecyl-beta-D-maltoside (DDM)	183
Fig. 121.	Technique de préparation de micelles : étalement sur les parois du tube à essai par évaporation du solvant avec un courant d'azote.	184
Fig. 122.	Principe de la chromatographie sur couche mince	187
Fig. 123.	Principe de la chromatographie en phase gazeuse	188
Fig. 124.	Exemple type de chromatogramme d'AG de PLs obtenue par chromatographie en phase gazeuse	189

Fig. 125.	Principe de la chromatographie liquide à haute pression	189
Fig. 126.	Exemple d'enregistrement obtenu pour une HPLC	190
Fig. 127.	Schéma de la séparation CCM des phospholipides totaux et des acides gras mono- et di-hydroxylés contenu dans le FS	192
Fig. 128.	Séparation des classes de PLT contenus dans les échantillons de FS avec de protocoles de séparation CCM différentes	193
Fig. 129.	Plaque de CCM 2D permettant la séparation de diverses classes de lipides dans l'échantillon analysé	196
Fig. 130.	Séparation des classes de PLs par CCM 2D	197
Fig. 131.	Dispositif et principe de fonctionnement du microscope à force atomique	199
Fig. 132.	Courbe force-distance.	200
Fig. 133.	Principe de fonctionnement du microscope de fluorescence	202
Fig. 134.	Schéma du dispositif de FRAP	204
Fig. 135.	Principe du retour de fluorescence après photoblanchiment et courbe de remontée de fluorescence	204

Liste des tableaux

Partie A

Tableau 1.	Molécules présentes dans la composition des FS sains et pathologiques	16
Tableau 2.	Comparatif des propriétés du cartilage articulaire et d'hydrogel HEMA	28
Tableau 3.	Evolution de la dégradation de cartilage (vieillesse vs. ostéoarthrose)	36

Partie B

Tableau 4.	Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PE (prélèvement « AL »)	63
Tableau 5.	Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PC (prélèvement « AL »)	63
Tableau 6.	Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PE (prélèvement « AG »)	64
Tableau 7.	Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PC (prélèvement « AG »)	64
Tableau 8.	Calcul de l'erreur relative des prélèvements analysés	65
Tableau 9.	Prélèvement « AG » : vue comparative de la composition (% mol) en acides gras des phospholipides PC et PE obtenue suite à <i>deux protocoles de séparation CCM (P₁ & P₂)</i>	66
Tableau 10.	Variation de la composition en acides gras (% mol) des chaînes acyle des PLs contenus dans les FS sain et pathologiques analysés	72

Annexes

Tableau 11.	Technologies utilisées dans la recherche lipidomique	170
Tableau 12.	Principaux acides gras saturés	173
Tableau 13.	Principaux acides gras insaturés	173
Tableau 14.	Températures de la Transition de Phase des PLs	174

INTRODUCTION

La détection tardive des pathologies articulaires est due principalement aux particularités biologiques des cartilages articulaires, notamment au fait que les symptômes de la maladie (principalement la douleur) ne sont décelés qu'une fois que l'endommagement du cartilage a atteint l'os. Ainsi, afin d'améliorer l'efficacité des traitements appliqués, il est nécessaire de comprendre, souhaitable dès le début de la maladie, son évolution et les bons enchaînements causes-conséquences qui déterminent son évolution. Pour se faire, il faut tenir compte que les pathologies articulaires sont causées par une multitude de facteurs (mécaniques, physico-chimiques et biochimiques) qui génèrent ensemble la rupture de l'homéostasie articulaire et que ceci pourrait provenir de différents éléments composant l'articulation synoviale : le cartilage, le fluide synovial (FS), l'os ou le système musculo-ligamentaire.

Motivation socio-économique

La plus fréquente des pathologies articulaires affectant les articulations synoviales et le cartilage articulaire, est l'*arthropathie*. Il existe de nombreux types d'arthropathies, dont les plus fréquentes sont l'**arthrose** sous sa forme dégénérative, **ostéoarthrose** (OA)*, et l'**arthrite rhumatoïde** (RA), chacune ayant un facteur déclencheur différent, qui peut être relié ou à un traumatisme articulaire ou à l'attaque immune/auto-immune des cellules inflammatoires dans l'articulation [10].

Dans cette thèse, on a choisi d'étudier l'**OA** du fait qu'elle est l'une des plus fréquentes maladies rhumatismales chez les personnes âgées [40,44]. Des études démographiques récentes [17,32] ont révélé que cette maladie se retrouve chez 16 % des personnes de plus de 55 ans et atteint 70 % des plus de 65 ans [39]. Cette maladie affecte environ 100 millions de personnes en Europe [13,17] et on estime que le nombre de patients arthrosiques consultant chaque année en France est d'environ 3,5 millions [28] tandis qu'en Angleterre, l'OA toucherait un total de 8.5 million de personnes [14,23]. Les articulations les plus atteintes de l'OA sont : les genoux (41 %), les articulations de la main (30 %), les hanches (20 %) [28]. Si l'âge est bien un facteur de risque de l'arthrose, elle peut cependant se développer très tôt et mettre de nombreuses années avant de présenter des symptômes cliniques visibles. Ainsi, l'OA ne touche pas seulement les personnes âgées, les études indiquant qu'environ 10% de la

* Une réunion de l'OMS et de l'American Academy of Orthopaedic Surgeons (1994) a proposé une **définition** qui englobe les principales facettes de la maladie : *L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuses conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale.* L'opinion qui prévaut est que l'arthrose n'est pas une maladie univoque mais un groupe d'affections dégénératives articulaires. En d'autres termes, elle n'est pas une maladie mais un syndrome, l'aboutissement ultime de diverses maladies touchant l'articulation, ayant un caractère dynamique et multifactoriel. [27].

population des plus de vingt ans a développé de l'arthrose et d'autant que la population vieillit plus la prévalence de l'OA devrait (encore) augmenter. La tendance des dernières années d'augmentation de la durée de vie de la population générale, fait que la maladie affecte de plus en plus de personnes, avec un coût conséquent pour le système social. Une étude des experts SOFMER, SOFCOT et SFR [11] indique une augmentation d'environ 54% du nombre des patients traités en 10 ans (au total 10 millions dont 4.6 avec symptomatologie persistante), ce qui induirait un coût de l'arthrose d'environ 1.6 milliards euros (en 2003) avec une augmentation d'environ 2.5%/an/patient. En 2030, l'arthrose pourrait toucher 22% de la population française [17].

De plus, ces types de maladies articulaires dégénératives et inflammatoires peuvent aussi se développer chez d'autres mammifères (chiens, chats et chevaux) [6,8,9] qui prennent dans notre société une place de plus en plus importante (animaux de compagnie, courses hippiques) avec des coûts conséquents pour leur soins.

Ces maladies dégénératives et/ou inflammatoires d'étiologie inconnues sont caractérisées, dans leur stade avancé, par une douleur chronique et la destruction de la structure biologique de l'articulation, concernant principalement les composants du cartilage articulaire (Fig. 1a) entraînant ainsi la perte fonctionnelle de l'articulation [22].

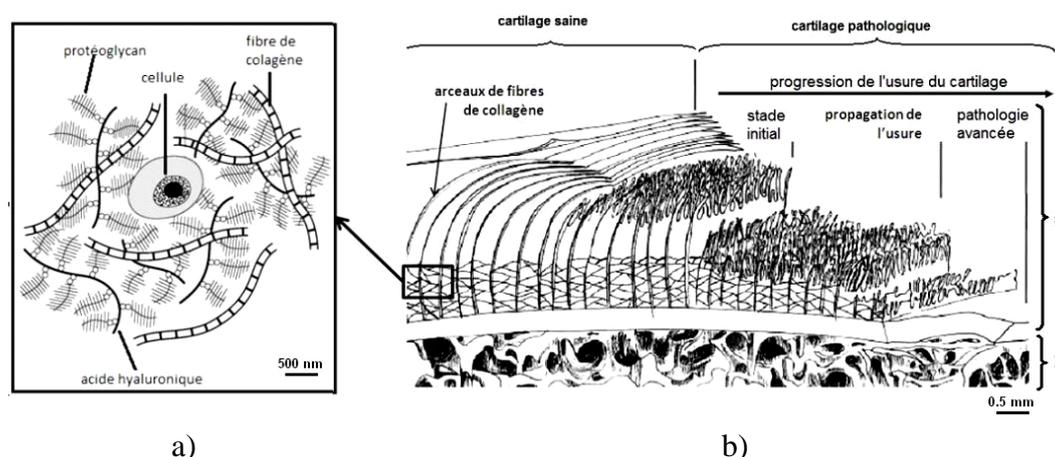


Figure 1. (a) Structure moléculaire du cartilage articulaire sain ; (b) progression de l'usure de cartilage lors de l'évolution arthrosique [2,41]

L'OA est donc une maladie invalidante, la 3^{ème} cause d'incapacité totale ou partielle de l'individu en France [11], qui entraîne une baisse progressive de la qualité de vie des malades* [5,26,37] allant jusqu'à rendre la personne dépendante [29]. L'invalidité est liée à l'endommagement de la surface du cartilage articulaire lié à la destruction de l'intégrité de l'arceau collagénique qui se trouve sur cette surface [22,38]. Si cette destruction n'est pas stoppée (cas du cartilage arthrosique), cet endommagement se propage rapidement dans la profondeur du cartilage (Fig. 1b) [2,41].

* L'OA évolue au début le plus souvent sur un mode intermittent (poussées douloureuses entrecoupées d'intervalles libres), puis continu. Les symptômes principaux sont la douleur et la gêne fonctionnelle. Suite à la dégradation du cartilage (structure sans innervation nerveuse), les extrémités osseuses (contiens des terminaisons nerveuses) de l'articulation deviennent moins bien protégées et ainsi le patient ressent une douleur à la mise en charge, y compris pendant la marche et en position debout. Souvent, pour limiter la douleur, les malades se déplacent moins, ce qui entraîne une perte de rigidité et de mobilité au niveau des muscles et des tendons de l'articulation atteinte par l'OA.

Les **pathologies articulaires sont en général difficile à traiter** non seulement du fait de l'étiologie complexe de la maladie mais aussi à cause de la structure biologique qui fait que le cartilage articulaire est un tissu :

- **Non innervé** : le cartilage articulaire est une structure sans terminaisons nerveuses et donc ne produit pas de sensation liée à la douleur. La douleur n'apparaît donc que lorsque les lésions du cartilage atteignent l'os, c'est-à-dire à un stade avancé de la maladie, d'où la difficulté du traitement.
- **Non lymphatique** : le cartilage articulaire ne contient pas des vaisseaux lymphatiques et il a donc une très faible résistance aux maladies, donc une faible immunité ; l'intervention du système immunitaire lors de l'évolution de l'OA ne peut pas être contrôlée de fait de son « inaccessibilité » via le système lymphatique général ;
- **Non vasculaire** : le processus de nutrition du tissu cartilagineux est difficile et se fait à l'aide des vaisseaux sanguins situés dans les tissus sous-jacentes et par diffusion du fluide synovial.

Etant donné que la plupart des maladies présentent des interactions complexes de facteurs multiples, dans ces conditions, le diagnostic et le traitement resteraient donc peu satisfaisants. Ainsi, les traitements médicaux existants n'agissent malheureusement que pour :

- réduire les symptômes de l'OA [40], principalement la douleur [19] à l'aide des médicaments anti-inflammatoires ;
- retarder la propagation des fissures dans le cartilage avec des lubrifiants visqueux. Ainsi, plusieurs études ont montré le rôle de l'**acide hyaluronique** (composant de la structure du cartilage articulaire) et du fluide synovial dans la lubrification articulaire et des variations de ses caractéristiques (quantité, poids moléculaire) dans le cas sain ou de diverses pathologies [12,25,29,34]. De ce fait, l'un des traitements de l'OA est de réaliser des injections à base d'AH, connues aussi sous le nom de *viscosuppléments** [1,3,7,19,21,24,31,33,35,38].

Malgré qu'on cherche à retarder la progression de la maladie le plus longtemps possible par un traitement médical, quand une symptomatologie invalidante et non calmée par les traitements médicamenteux et physiques s'installe, la **chirurgie prothétique** est la seule solution pour éviter l'immobilisation de l'articulation [16,30]. Ainsi, environ 50000 prothèses de genou sont posées chaque année en France, ce qui signifie que la plupart des arthroses sont prises en charge médicalement [15]. Ceci parce que le coût des prothèses est assez élevé et dépend bien sûr des modèles utilisés, du délai écoulé depuis leur première mise sur le marché (amortissement des coûts de recherche), des matériaux utilisés. Par exemple, le coût d'une prothèse de hanche, est de l'ordre de 1500 à 3000 euros. Une prothèse de genou coûte 2 000 à 3 000 euros (ordre de grandeur). Ces chiffres permettent de se faire une idée mais ils restent approximatifs. Le coût d'une prothèse varie, si l'on considère son prix de vente par le fabricant, son prix de remboursement par la sécurité sociale en France (intégralement prise en charge), le coût global de l'intervention qui intègre l'ensemble des coûts annexes pris en

* Sur le marché il existe actuellement différents produits à base d'AH : *Synvisc*®, *Supartz*®, and *Orthovisc*®, *Hyalgan*® utilisés pour le traitement par infiltration/viscosupplémentation des pathologies articulaires [14,31,36] qui vise à restaurer les constantes rhéologiques du FS, promouvoir la synthèse d'un AH de poids moléculaire plus élevé et donc plus fonctionnel, améliorer la mobilité et le fonctionnement articulaires, et présenter une action antalgique (diminuer la douleur articulaire) [20].

charge par l'assurance maladie. Ainsi, une évaluation précise du coût d'une opération pour mettre en place une prothèse est difficile à faire, car ces coûts sont très variables selon les articulations, selon la maladie initiale et les soins particuliers s'y rapportant, notamment la durée de l'hospitalisation. On peut toutefois estimer que ce coût varie de 10000 à 20000 euros pour l'implantation d'une prothèse standard [18].

Dans ce contexte, cette thèse s'intéresse à l'identification des causes « naissantes » de l'arthrose, qui génèrent une perturbation de la bio-tribologie articulaire afin de pouvoir agir dans des phases plus précoces avec un traitement médical plus efficace.

Contexte scientifique

Ce travail s'inscrit dans la lignée des approches multi échelles en mécanique du vivant au sein du *Laboratoire de Mécanique des Contacts et de Structures (LaMCoS)*, notamment concernant les problématiques liées au comportement des contacts frottants biologiques.

Ainsi, les contacts frottants biologiques tels que œil/paupière, les cartilages articulaires, les capillaires sanguins, les alvéoles pulmonaires, les matériaux des prothèses (métal, céramique, polyéthylène) représentent dans l'ensemble des « **triplets tribologiques** » [4] constitués par :

- les **1^{ers} corps** (les deux corps en contact, par exemple : les cartilages articulaires, la cornée et la paupière) séparés par
- le **3^{ème} corps** (par exemple : le fluide synovial, le liquide lacrymal, le surfactant pulmonaire) qui a pour rôle de limiter les phénomènes d'usure et de réduire le frottement par l'accommodation de la vitesse de cisaillement entre les deux **1^{ers} corps** ;
- le **mécanisme** (par exemple le système musculo-ligamentaire) qui impose les sollicitations globales.

Des études montrent que les causes des pathologies articulaires comme l'ostéoarthrite peuvent se trouver liées à chacun des éléments du triplet tribologique. Ainsi, on peut y avoir des causes :

- **mécaniques** : notamment liées au dysfonctionnement du **mécanisme** (le système musculo-ligamentaire), par accumulations de contraintes anormales dans le cartilage qui génèrent des fissures à la surface frottante du cartilage en augmentant sa rugosité et modifiant ainsi les conditions limite pour la lubrification;
- **physico-chimiques** : des changements de composition, pH et concentration ionique génèrent un déséquilibre au niveau du motif élémentaire du **3^{ème} corps**, notamment la destruction des assemblages moléculaires lipidiques dans la structure du fluide synovial pathologique ;
- **biologiques** : l'activation des enzymes dans les cas pathologiques génère des changements structuraux au niveau de l'interface entre les **1^{ers} corps** (les cartilages articulaires) et le **3^{ème} corps** (le fluide synovial).

Les travaux de recherche de cette thèse se sont concentrés sur l'étude du **3^{ème} corps** de fait que les modifications pathologiques précoces surviennent principalement au niveau du fluide synovial. Dans ce sens, les recherches récentes indiquent une structure discontinue du fluide

synovial [43] formée d'assemblages lipidiques, constitué de poches de gel glycoprotéique entourées par des interfaces lipidiques qui sont constituées par l'empilement de bicouches lipidiques entre lesquelles une couche aqueuse de sérum physiologique est piégée (épaisseur d'une bicouche ~ 5 nm, épaisseur de la couche aqueuse non mesurée mais supposée du même ordre de grandeur) les deux en équilibre mécanique, physico-chimique et biologique dans le cas d'une articulation saine. En accord avec ses résultats, les travaux de thèse d'Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu [41] sur le fonctionnement tribologique des articulations synoviales saines proposent un « motif élémentaire » pour la biolubrification articulaire constitué de l'ensemble formé par une couche aqueuse piégée entre deux bicouches phospholipidiques. Dans ce cas, lorsque l'accommodation de vitesse se fait au niveau de la couche aqueuse, on obtient un coefficient de frottement très faible ($\mu \sim 0.0015$) [42].

Par conséquent dans cette thèse nous nous sommes axés plus précisément, sur l'étude des **interfaces phospholipidiques** constituant les assemblages lipidiques présents dans le fluide synovial pathologique.

Objectif. Stratégie. Méthodologie

L'objectif de ce travail a été **d'étudier l'évolution des interfaces phospholipidiques du fluide synovial** dans des conditions limites simulant :

- l'usure légère du cartilage articulaire ;
- l'action des facteurs physico-chimiques ;
- l'action enzymatique.

Stratégie : Les moyens d'expérimentation *in vivo* étant insuffisants pour nous permettre l'étude du fonctionnement tribologique des assemblages lipidiques, nous avons utilisé une expérimentation *ex vivo*, en utilisant le modèle tribologique proposé auparavant [41,42] qui reproduit les spécificités tribologiques d'une articulation saine. Par rapport aux objectifs fixés, ce modèle a été adapté en se rapportant aux paramètres caractéristiques des pathologies articulaires.

Pour ce faire, une **méthodologie nano-bio-tribologique** alliant des études *biochimiques, physico-chimiques, nano-mécaniques et tribologiques* a été appliquée, afin de comprendre le bon enchaînement cause/conséquence responsable d'une pathologie.

Dans cette logique, le travail de cette thèse est présenté en **3 parties** :

- ❖ La partie A est consacrée à la **bio-tribologie articulaire**. On y présente de manière succincte les caractéristiques des articulations synoviales saines et pathologiques et la composition du fluide synovial. Puis les recherches actuelles dans ce domaine sont présentées, pour nous permettre de détailler la stratégie employée au cours de cette thèse, notamment les méthodes d'analyses appliquées pour caractériser le fonctionnement tribologique des interfaces phospholipidiques dans les cas des pathologies articulaires.

- ❖ Dans *la partie B* on présente le principe des études **biochimiques** des fluides synoviaux pathologiques, utilisant **l'analyse lipidomique**. Les résultats de ces études nous ont permis de quantifier les variations de la composition lipidique et de mettre en évidence des marqueurs inflammatoires ; leur présence met en évidence la destruction des assemblages lipidiques suite à l'action enzymatique associée aux pathologies articulaires.
- ❖ *La partie C* se concentre sur **l'analyse tribologique** de l'évolution des pathologies articulaires, et plus particulièrement sur l'influence des caractéristiques mécaniques, physico-chimiques et biologiques des pathologies articulaires sur les interfaces lipidiques du fluide synovial (FS), constituées de l'empilement de deux bicouches lipidiques entre lesquelles une couche aqueuse est piégée.

Des *conclusions générales* sur les résultats obtenus ainsi que quelques *perspectives* aux travaux effectués seront présentés à la fin de ce manuscrit. On a pu ainsi mettre en évidence l'influence des propriétés :

- des **1^{ers} corps** modèles : la rugosité des surfaces frottantes,
- de **la couche aqueuse** : la stabilité et la variation du pH, la concentration ionique et la présence d'enzymes caractérisant l'évolution des pathologies,
- des **bicouches lipidiques** : la mobilité locale (phase fluide ou solide) et la composition chimique des têtes phospholipidiques

sur le comportement tribologique, l'évolution et la résistance mécanique des interfaces lipidiques au cours des pathologies.

Pour faciliter la lecture, les protocoles expérimentaux des différentes études appliquées seront présentés en *annexes*, de même que les détails concernant les principes des différentes techniques utilisées et les informations considérées comme utiles dans la compréhension de ce manuscrit. De plus, au début de ce manuscrit se trouve une *table d'abréviations et acronymes* utilisés tout au long de ce manuscrit et à laquelle le lecteur est invité à se référer en le lisant.

Partie A.

Synthèse bibliographique – Bio-tribologie articulaire

L'étude des interactions entre les éléments articulaires a connu un fort développement dans ces dernières décennies. Ainsi, ces études sont complexes et nécessitent d'avoir une vue d'ensemble sur les interactions mécaniques physico-chimiques et biologiques caractérisant les éléments articulaires. Pourtant, dans la bibliographie on trouve des interprétations parfois différentes pour un même phénomène, chacune des interprétations étant réaliste, mais par rapport à un point de vue particulier et pas dans l'ensemble des interactions.

Dans ce contexte, cette partie :

- *présente un aperçu de la **bio-tribologie d'une articulation synoviale**, les principales caractéristiques des articulations synoviales (saines et pathologiques) en insistant sur la composition du **fluide synovial** et le rôle de ses composants moléculaires (en particulier celui des **assemblages phospholipidiques**) dans la **lubrification articulaire** ;*
- *se termine par le **positionnement de cette thèse** et les choix d'étude qui ont été faites par rapport aux différentes hypothèses actuelles de la biolubrification et par rapport à la bibliographie existante, afin de nous permettre une meilleure compréhension du **rôle des interfaces lipidiques du fluide synovial dans la lubrification articulaire limite**.*

A.1. DEVELOPPEMENT DE LA BIO-TRIBOLOGIE ARTICULAIRE	9
A.2. LE TRIPLET TRIBOLOGIQUE ARTICULAIRE	9
A.2.1. Composants du triplet tribologique articulaire	10
A.2.2. Caractéristiques du fluide synovial : composition et proposition de structure	15
A.2.3. Hypothèses sur la lubrification limite avec du fluide synovial.....	21
A.3. MODELE TRIBOLOGIQUE EX VIVO D'UNE ARTICULATION SAINES	26
A.3.1. Choix du mécanisme modèle.....	26
A.3.2. Choix des 1 ^{ers} corps modèle.....	27
A.3.3. Choix du 3 ^{ème} corps modèle.....	28
A.4. PATHOLOGIES ARTICULAIRES	29
A.4.1. Facteurs mécaniques caractérisant les pathologies articulaires	29
A.4.2. Facteurs physico-chimiques caractérisant les pathologies articulaires.....	31
A.4.3. Facteurs biologiques caractérisant les pathologies articulaires	31
A.4.3.1. Modification de la synthèse des lipides.....	33
A.4.3.2. Rôle et action des enzymes dans les pathologies articulaires.....	33
A.5. CONCLUSIONS	40

A.1. Développement de la bio-tribologie articulaire

Le terme de « **bio-tribologie** » a été utilisé pour la première fois par Dowson et Wright en 1973, afin de définir « *tous les aspects de la tribologie liés aux systèmes biologiques* » [67].

Cette branche des sciences biologiques a émergé du champ classique de la tribologie [95,124,132] englobant les concepts de frottement, usure et lubrification. Elle peut donc être considérée comme la science des surfaces biologiques en contact glissant et a une importance capitale dans la compréhension du fonctionnement normal et/ou pathologique des tissus biologiques participants aux contacts dans le corps humain, tels que le cartilage articulaire, les vaisseaux sanguins [161], les dents [135], le cœur, les tendons, les ligaments, la peau etc. [64]. Ainsi, le frottement, l'usure et la lubrification sont des phénomènes qui caractérisent les surfaces de divers contacts biologiques. Par exemple, l'usure peut entraîner des douleurs intenses lors d'une dégradation du cartilage articulaire comme dans le cas d'une arthrose [197,221].

La compréhension des phénomènes caractérisant le fonctionnement tribologique des structures vivantes impose l'application d'études complexes. Ceci génère la constitution de diverses communautés scientifiques, chacune appliquant une stratégie propre et ciblé parfois sur un seul élément articulaire sans prendre en compte l'ensemble des interactions qui peuvent avoir lieu entre les différents composants des structures étudiées.

Le domaine de la **bio-tribologie** est donc très vaste et comme nous l'avons déjà précisé dans l'introduction, le travail de cette thèse a pour objectif l'étude des *pathologies des articulations synoviales*.

Dans cette logique, ce chapitre présentera par la suite les caractéristiques du contact frottant de type **articulation synoviale**, sa composition et sa structure, ainsi que les mécanismes de lubrification identifiés à ce niveau, puis les maladies qui peuvent y apparaître (avec un accent particulier sur l'arthrose), tout en indiquant le rôle de différents composants du **fluide synovial** (*appelé FS dans la suite de ce manuscrit*) dans le fonctionnement tribologique de ces contacts.

A.2. Le triplet tribologique articulaire

L'articulation synoviale humaine saine est considérée comme un tribosystème très performant qui fonctionne toute une vie assurant un minimum de frottement et d'usure au niveau du contact [255]. Ces performances tribologiques exceptionnelles [137,182] sont dues principalement aux matériaux « vivants » qui forment les contacts frottants et qui :

- facilitent le mouvement relatif entre leurs surfaces par synthèse des molécules qui agissent comme lubrifiants naturels ;

- minimisent leur usure grâce à la présence de cellules ayant un fort potentiel régénératif et donc la capacité de réparer le tissu endommagé par biosynthèse des structures moléculaires.

Mais malgré ces performances exceptionnelles du milieu vivant, on n'est pas capable d'expliquer :

- comment les contacts biologiques font-ils pour résister à l'usure à l'échelle d'une vie ?
- pourquoi certains contacts vivants finissent-ils par s'user avec l'âge ?

Pour répondre à ces questions, il est essentiel de comprendre les interactions mécaniques, physico-chimiques et biologiques qui ont lieu entre les différents composants de la structure de ces contacts vivants [251].

A.2.1. Composants du triplet tribologique articulaire

Parmi de nombreux exemples de contacts frottants biologiques, les **articulations synoviales**^{*} représentent des systèmes vivants complexes d'un point de vue biomécanique [84]. Ces articulations (Fig. 2, [268]) de type *diarthrose*[†] (par opposition aux articulations de type *synarthroses*[‡] ou *amphiarthroses*[§]) permettent en général une grande diversité des mouvements avec une amplitude importante^{**} et assurent essentiellement un mouvement caractérisé par un coefficient de frottement très bas entre les segments articulaires tout en assurant à ce niveau la transmission de charges relativement élevées [152]. La dégradation pathologique d'un des composants articulaires (le fluide synovial ou la structure du cartilage articulaire [105]) conduit à un frottement et une usure accrue [134,187] et par conséquent à la réduction de la mobilité articulaire [124,235].

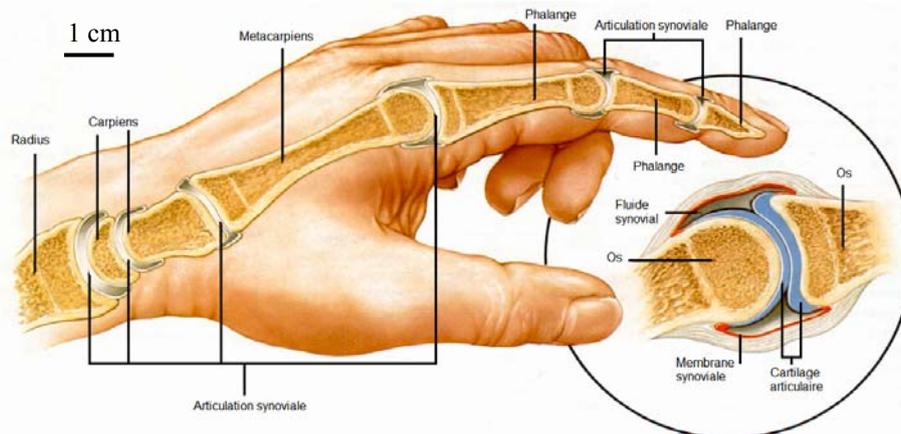


Figure 2. Représentation schématique des articulations synoviales diarthrosiques de la main (*insert* : détail de la structure d'une articulation synoviale) [268]

^{*} Dans le corps humain on a au total 187 **articulations synoviales**, dont les articulations du genou, de la hanche, de l'épaule, des doigts etc. ;

[†] **Diarthrose** (*di* = à part, *arthron* = articulation) est une articulation synoviale ayant une grande mobilité qui permet une liberté des mouvements entre les os qui la forment ;

[‡] **Synarthrose** (*syn* = ensemble, *arthron* = articulation) articulation immobile, dépourvue de membrane synoviale et de cartilage articulaire, où les extrémités osseuses sont réunies par un tissu fibreux dense (ex. les sutures crâniennes) ;

[§] **Amphiarthrose** (*amphi* = des deux cotés, *arthron* = articulation) articulation semi-mobile dépourvue de membrane synoviale mais dont les extrémités osseuses, recouverte de cartilages, sont réunies par un fibrocartilage et des ligaments périphériques (ex. symphyse pubienne, articulations intervertébrales) ;

^{**} La mobilité d'une diarthrose dépend de la forme des surfaces articulaires.

D'un point de vue tribologique, pour comprendre et faire une analyse réaliste du fonctionnement articulaire il faut prendre en compte l'ensemble du **triplet tribologique** constituant l'articulation synoviale et les différentes interactions entre ses composants [14].

En considérant la structure anatomique d'une articulation synoviale, le triplet tribologique articulaire (Fig. 3) est constitué :

- du **mécanisme** représenté par le système musculo-ligamentaire, qui impose les sollicitations globales et qui se traduit au niveau local par une pression du contact et une vitesse relative des corps en contact ;
- des **1^{ers} corps** constitués par les cartilages articulaires qui forment les surfaces en contact,
- du **3^{ème} corps**, le FS, qui sépare les 1^{ers} corps et assure la lubrification.

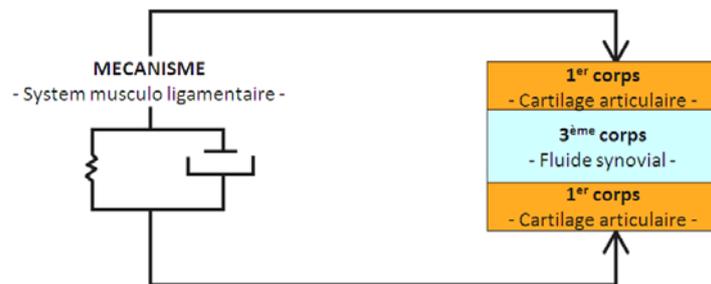


Figure 3. Représentation schématique du triplet tribologique d'une articulation synoviale

A.2.1.1. Le mécanisme – le système musculo-ligamentaire

Il met en mouvement les premiers corps du contact articulaire suite à la génération de la commande de mouvement par le **système neuro-musculaire** et la réalisation effective du mouvement par le **système musculo-ligamentaire** [251].

De plus, la **capsule articulaire**, les **ligaments** et le système **musculo-tendineux** environnants interviennent dans la tenue des deux extrémités osseuses de l'articulation, assurant ainsi sa stabilisation.

Le mécanisme par lequel les articulations synoviales sont lubrifiées a suscité beaucoup d'intérêt depuis plusieurs décennies [147]. Une compréhension détaillée du mécanisme de la « bonne » lubrification aurait des applications évidentes pour le traitement des pathologies des articulations synoviales dans lesquelles le système de biolubrification est « en panne », entraînant des dommages du cartilage et de l'os et affectant ainsi la qualité de vie des individus [46].

Ainsi, le mécanisme articulaire intervient dans les conditions limite du fonctionnement tribologique local en y imposant la pression et la vitesse relative (tangentielle et normale) permettant ainsi l'instauration d'un régime de lubrification plutôt hydrodynamique (HD) ou plutôt limite. Plusieurs études ont montré que les différentes phases du cycle de la marche peuvent être associées à plusieurs types de régimes de lubrification (Fig. 4 [181, 251]) et que

dans l'ensemble, pendant environ 50% d'un cycle de marche le contact artulaire fonctionne en lubrification HD et 50% en condition limite [251].

En ce qui concerne le régime de **lubrification hydrodynamique (HD)** [65,66,157,167,178], les performances tribologiques articulaires sont dues à la maintenance d'une épaisseur du film lubrifiant, homogène et continue (Fig. 4). Cette épaisseur (de l'ordre de quelques centaines de nm à quelques μm) peut-être maintenue :

- par des vitesses relatives tangentielles élevées susceptibles de générer un régime HD par effet de « coin d'huile » [68,69] ;
- par des vitesses relatives normales élevées pendant le chargement qui maintiennent une épaisseur du film par des effets de type « squeeze » [70,190] ;
- de fait que les cartilages articulaires sont des structures poro-élastiques [254,266] qui:
 - o d'une part par leur **structure élastique**, qui favorise un régime de type elasto-hydrodynamique (EHD) [65,66,167] quand l'épaisseur du film lubrifiant est de même ordre de grandeur que la déformée du cartilage artulaire ;
 - o d'autre part par leur **porosité** qui permet la circulation d'une phase aqueuse ;
 - depuis le cartilage artulaire vers le film lubrifiant, favorisant ainsi un régime de lubrification de type « **weeping** » [3,166] ;
 - depuis la cavité artulaire contenant le film lubrifiant vers le cartilage artulaire, assurant ainsi un régime de lubrification de type « **boosted** » [264].

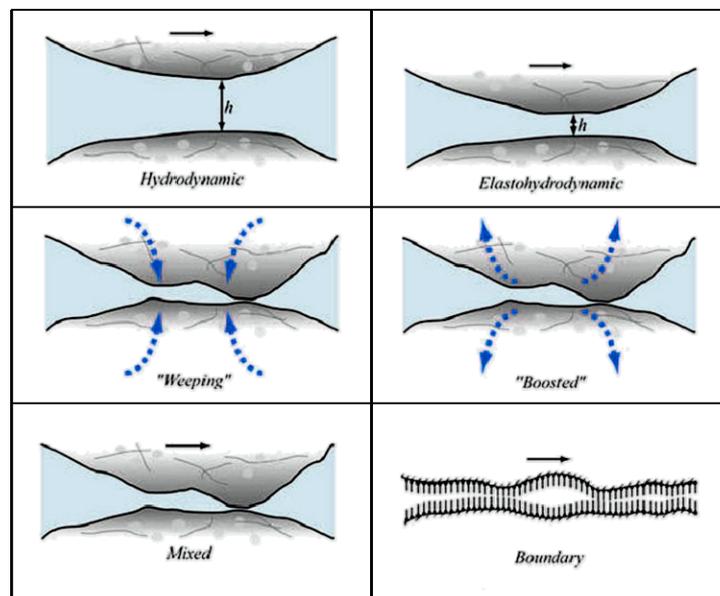


Figure 4. Représentation de différents régimes de lubrification artulaire [183]

La lubrification HD se caractérise par une dépendance de la variation du coefficient de frottement avec les vitesses relatives (tangentielles et normales) au niveau du contact artulaire et par des phénomènes de portance qui modifient les pressions locales du contact.

Par contre, comme nous allons le voir dans la section § A2.2.2, le fluide synovial (FS) a une structure complexe qui présente des discontinuités à l'échelle du film lubrifiant. De ce fait, les théories de lubrification « classique » ne peuvent pas être appliquées.

Le **régime limite** [46,102,103,106,132,206,225,240] se rencontre quand le mécanisme tribologique est caractérisé par :

- de fortes pressions locales,
- de très faibles vitesses relatives,

ce qui fait que dans ces conditions une épaisseur continue supérieure à 100 nm du film lubrifiant ne peut pas être formée. Ce régime de lubrification est caractérisé par une invariance du coefficient de frottement avec la vitesse relative et la pression. Le frottement va être accommodé dans les couches moléculaires adsorbées sur les surfaces du cartilage articulaire.

*De plus, comme le régime de **lubrification limite** pose le plus de problèmes d'usure au niveau articulaire, c'est pour cette raison que dans cette thèse nous nous sommes intéressés seulement au fonctionnement articulaire dans ce régime de lubrification.*

A.2.1.2. Les premiers corps – le cartilage articulaire

La surface des deux extrémités osseuses composant l'articulation est couverte par le **cartilage articulaire** qui a comme fonctions principales d'assurer une surface appropriée pour favoriser la lubrification articulaire et de prévenir les phénomènes d'usure caractéristiques des cas pathologiques de type arthrose [244]. Il existe aussi des articulations synoviales (par exemple celle du genou) où les deux surfaces osseuses ne sont pas parfaitement emboîtées, et dans ce cas un **ménisque** ou plusieurs plis de fibrocartilage assurent une meilleure conformité des surfaces articulaires et donc la stabilité de l'articulation et la répartition optimale des forces au niveau du contact [160].

Les recherches sur la structure complexe (Fig.1, *Introduction*) et les propriétés des cartilages articulaires sont abondamment présentées dans les revues scientifiques [2,18,24,26,48,97,136,159,174,238,251,259,267]. Dans cette thèse on s'est concentré seulement sur les propriétés mécaniques et physico-chimiques qui lui permettent d'assurer des rôles spécifiques dans la lubrification articulaire.

Afin de reproduire *ex vivo* les bonnes conditions de fonctionnement d'une articulation, comme les prélèvements de cartilage articulaire perdent leurs propriétés vivantes quand ils sont soumis à des essais tribologiques de longue durée, il faudra prendre en compte les propriétés poro-élastiques du cartilage articulaire. Ces propriétés ont été largement étudiées dans les dernières années et plusieurs types de matériaux polymériques de type hydrogels* [25,43,80,85,113] sont proposés pour simuler *ex vivo* les propriétés du cartilage articulaire

* **Hydrogels** proposés comme matériaux modèles pour le cartilage articulaire : le poly-alcool vinilique (PVA), le poly-acid acrylique (PAA), ou bien le poly-hydroxy-éthyl methacrylate (pHEMA) [25] ;

sain ou pathologique. Parmi ceux-ci, dans cette thèse (§A.3.2) nous avons utilisé un hydrogel de type HEMA (le choix et la mise au point de ce matériau ont été fait au LaMCoS pendant les thèses d'Ana Maria Sfarghiu [251] et Luciana Bostan [26]).

A.2.1.3. Troisième corps – le fluide synovial (FS)

Le fluide synovial (FS) est sécrété par les synoviocytes de type B [72] présents dans la structure de la **membrane synoviale** * qui délimite la cavité articulaire. La membrane synoviale tapisse la face interne d'une articulation synoviale (Fig. 2 et Fig. 5, [148]) et s'insère à la limite de la transition os/revêtement cartilagineux. Elle est bordée à l'extérieur par la capsule articulaire et les formations ligamentaires, recouvrant ainsi toutes les surfaces non-cartilagineuses à l'intérieur de la capsule articulaire. Les insertions de la membrane synoviale et de la capsule sur l'os se confondent et se prolongent vers le périoste extra-articulaire. La membrane synoviale s'organise en replis et en franges, surtout dans les zones où les influences mécaniques sont les plus restreintes [34,126].

La membrane synoviale est vascularisée et innervée (Fig. 5, [148]). Elle est séparée de la capsule articulaire par une couche de tissu cellulaire qui contient les vaisseaux sanguins et les nerfs qui assurent la nutrition et l'innervation au niveau articulaire. La membrane synoviale a aussi un rôle dans la défense et la réponse immunitaire intra-articulaire [54].

Au niveau de l'articulation synoviale, le FS :

- facilite le glissement des zones en contact,
- accomode la vitesse relative de contact,
- régule la pression de contact et la température locale,
- lubrifie et nourrit le cartilage articulaire (qui est une structure non vasculaire), évitant ainsi la dégradation du cartilage et donc l'évolution des pathologies articulaires.

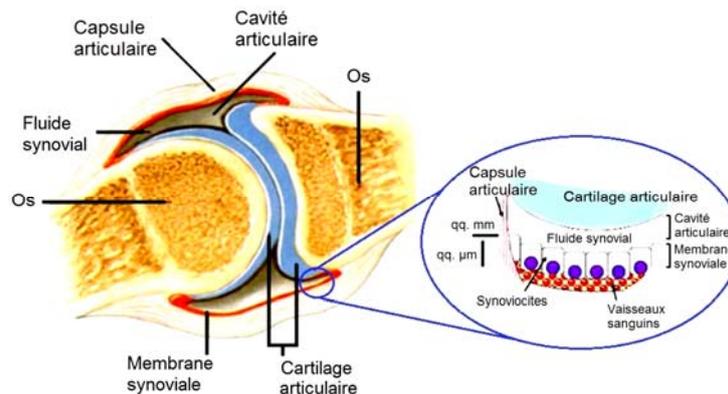


Figure 5. Schéma de l'interface membrane synoviale/cavité articulaire où est synthétisé le FS [148].

Etant donné que dans cette thèse on a choisi d'étudier le régime de lubrification limite et principalement le comportement et l'évolution du FS dans le cas des pathologies articulaires, on va détailler par la suite sa composition et sa structure.

* Détails sur la membrane synoviale en annexe.

A.2.2. Caractéristiques du fluide synovial : composition et proposition de structure

Le nom de « fluide synovial »* (FS) se réfère à une substance gluante, de type « blanc d'œuf », qui nourrit les structures articulaires. Le FS est un fluide visqueux qui comble les espaces creux de l'articulation [215].

Historiquement, le terme de « fluide synovial » a été cité dans le texte d'Hippocrate, *Places in Man*, où est mentionné qu'il y a une petite quantité de fluide visqueux dans les articulations [73]. Un autre récit historique a été fait par Galien (médecin grec, AD 131-201) dans *Sur la fonction des parties du corps humain*. On y indique simplement qu'il existe un fluide corporel huileux sur la surface du cartilage articulaire [73].

A.2.2.1. Composition du FS

Le FS, sécrété dans la cavité articulaire délimitée par la capsule articulaire, provient essentiellement du sang qui traverse les vaisseaux sanguins (capillaires) présents à l'intérieur de la membrane synoviale (Fig. 5). Le FS est un dialysat (ultrafiltrat[†]) de plasma sanguin [17,33,149,182], produit par ultrafiltration passive à travers les capillaires de la membrane synoviale :

- l'eau et les petites molécules (électrolytes, glucose, urée, lactate et gaz dissous : dioxyde de carbone, azote et oxygène qui ont un petit poids moléculaire) passent dans le FS et ont les mêmes concentrations que dans le plasma [74,249] tandis que,
- les molécules de poids moléculaire élevé (tel que les protéines de type fibrinogène, ayant un poids moléculaire ~340 KDa [115]), ne passent pas la barrière endothéliale de la membrane synoviale [8] et restent donc dans le plasma.

S'ajoute aussi dans la composition du FS l'acide hyaluronique (AH), qui est sécrété *in situ* par les synoviocytes de type B [96,172] présentes dans la structure de la membrane synoviale ; l'AH est « responsable » de la consistance visqueuse semblable au blanc d'œuf [33] du FS. Ainsi, le FS sain est très visqueux [39, 182,191], a un pH très faiblement alcalin (entre 7.3 et 7.43 [49,194]) et est transparent et légèrement ambré [226].

Le FS présent normalement dans une articulation synoviale saine est peu abondant et son volume varie (de 0.13 à 4 ml) selon la taille de l'articulation [33]. A titre d'exemple, la quantité de FS dans l'articulation humaine du genou sain est de l'ordre de 0,2 ml [71] tandis que dans le cas des pathologies articulaires, le volume peut augmenter jusqu'à 200ml [33].

Les composants du FS (qu'il soit sain ou pathologique) sont :

* Dérivé du latin *syn* = avec et *ovum* = œuf [152] ;

† Le FS et le plasma sanguin ont une composition ionique identique, pauvre en protéines de gros poids moléculaire et en éléments cellulaires.

- l'acide hyaluronique (AH) [165,184],
- les protéines [163],
- les protéoglycanes [229,242] ;
- les bicouches lipidiques auto-assemblées souvent appelées « Surface Active PhosphoLipids » (SAPLs^{*}) dans la littérature [17,104].

En ce qui concerne les protéoglycanes, il en existe principalement deux types :

- ceux présents dans la structure du cartilage articulaire, qui forme des réticulations avec les glucides pour composer ainsi l'agrécane[†] ;
- molécules de type glycoprotéine, nommé « protéine de zone superficielle (SZP) » ou « protéoglycane 4 » (PRG₄), une glycoprotéine de type mucine avec des fortes propriétés actives de surface.

Ces composants du FS sont produits soit par les synoviocytes de la membrane synoviale [61,96,104,129,172,233,234] soit par les chondrocytes présentes dans la structure du cartilage articulaire [224,228,229] et leurs quantités varient en fonction de l'état sain ou de l'affectation pathologique (arthrite rhumatoïde –RA ou ostéoarthrose – OA) de l'articulation et donc du FS (Tableau 1, [4,16,17,20,33,39,55,73,79,92, 142,165,173,193,194,223]).

Tableau 1. Molécules présentes dans la composition des FS sains et pathologiques (OA = ostéoarthrose ; RA = arthrite rhumatoïde) [4,16,17,20,33,39,55,73,79,92, 142,165,173,193,194,223]

Type de FS Composition	Sain	RA	OA
AH (mg/ml)	1-4	0.8-2	0.7-1.1
Protéines (mg/ml)	15-25	36-54	29-39
PRG ₄ (mg/ml)	0.052-0.450	0.276-0.762	0.02-0.1
SAPLs (mg/ml)	0.1-0.2	1.5-3.7	0.2-0.3
pH	7.3 – 7.43	7.4-8.6	7.4-7.6

Pour le cas d'un FS sain (Tableau 1) :

- l'acide hyaluronique, AH, sous forme de sel de sodium (hyaluronate de sodium, voir *Annexe – Membrane synoviale*), a une concentration d'environ 3mg/ml ;
- les protéines, filtrées à travers la membrane synoviale depuis le plasma sanguin (l'albumine, 7-18 mg/ml, la plus abondante des protéines dans le FS [213] et les globulines, 0.5-2.9 mg/ml [163]) ;
- les protéoglycanes de type PRG₄ sont présents dans le FS sain en faible quantité, allant de 0.052 à 0.45 mg/ml.

^{*} Des multiples études récentes sur le rôle des composants du FS dans la biolubrification considèrent ces bicouches comme étant constituées de **PLs** « actifs de la surface », d'où leur dénomination de **SAPLs** (en anglais, « surface active phospholipids ») [61,102,233,234]. Comme cet étude s'adresse à plusieurs communautés de spécialistes (biochimistes, médecins, mécaniciens etc.) une terminologie appropriée sera utilisée, respectivement : **PLs** dans la *partie B* détaillant les aspects biochimiques liés à l'analyse lipidomique des FS pathologiques, puis **SAPLs** tout au long de manuscrit détaillant les aspects tribologiques des études effectués.

[†] Agrécane = protéine complexe de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire.

- les **SAPLs** bien qu'ils soient présents dans le FS sain en faible quantité (0,1-0,2 mg/ml [100]) assurent des propriétés et un fonctionnement tribologique remarquable des articulations synoviales saines (*voir §A.2.4.*).

Dans le cas des FS pathologiques (Tableau 1) :

- la concentration d'AH est plus faible et son poids moléculaire est abaissé [101], ce qui entraîne une diminution de sa viscosité. Une partie de ces modifications est imputable à la dépolymérisation des longues chaînes polysaccharidiques par des radicaux libres produits par les leucocytes et à l'épanchement articulaire qui conduit à la diminution de la concentration d'AH. Ainsi, la *viscosupplémentation*, qui consiste à injecter dans la cavité articulaire de l'AH à haut poids moléculaire est utilisée dans le traitement de l'arthrose* [77] (*voir Introduction*).
- la concentration des protéines est de 29-39 mg/ml ce qui est supérieur aux valeurs pour une articulation saine. En fait, la quantité des protéines dans la composition du FS sain est beaucoup plus faible que dans celle du plasma [216] parce que la membrane synoviale ne peut pas être traversée par des macromolécules (*voir Annexe – Membrane synoviale*). La concentration des substances protéiques augmente dans les cas pathologiques, notamment celles inflammatoires [231]. Ainsi, dans le FS on peut avoir une concentration d'albumine de 20 à 39 mg/ml et de γ - globuline à 15,4 mg/ml [57,141,264], cela à cause du passage pathologique de ces molécules depuis le plasma à travers la membrane synoviale ;
- les protéoglycanes (PRG₄) bien que présents en faible quantité, celle-ci est supérieure pour le cas des FS pathologiques (RA environ 0.276-0.762 mg/ml et OA environ 0.02-0.1 mg/ml) par rapport au contenu dans le FS sain; cela est due notamment à l'usure du cartilage articulaire qui « libère » les protéoglycanes qui composent l'agrécan de la matrice cartilagineuse ;
- la quantité des SAPLs est de 0.2-0.3 mg/ml, valeur supérieure à celle pour des SAPLs d'une articulation saine [89,163], due aussi au passage pathologique des composants du plasma dans le FS. Le type de lipides présents sera présenté en §B.4.3.

Ces variations de la composition dans le cas des pathologies articulaires déterminent aussi une augmentation des valeurs du pH : le FS normal a un pH entre 7,3 et 7,43, tandis que divers FS pathologiques ont un pH plus élevé (pH ~7.6 pour l'OA et ~8 en cas de RA) (Tableau 1). [142,165].

Par sa composition et sa structure, qui déterminent ses propriétés, le FS assure plusieurs **fonctions** [6,10,28,162,226] dont les plus importantes sont :

- la **nutrition** des surfaces du cartilage articulaire (principalement pour le glucose et l'oxygène),
- l'**élimination** des produits cataboliques (le lactate et le dioxyde de carbone),

* La pratique des injections intra-articulaires est déjà ancienne puisqu'elle remonte aux années 1935 où diverses préparations, en particulier des solutions salines, ont été utilisées dans le genou [59]. Les corticoïdes intra-articulaires sont utilisés dans l'arthrose depuis plus de 50 ans. Enfin, on assiste actuellement au développement du traitement par l'AH (AH) qui est injecté intra-articulaire dans les articulations atteintes d'arthrose [200].

- la **lubrification** au niveau articulaire par ses composants qui interviennent dans le fonctionnement articulaire.

A.2.2.2. Hypothèse concernant la structure du FS

Des expérimentations sur des articulations de rat [267] ont montré la présence de vésicules de quelques micromètres de diamètre dans le **volume du fluide synovial** ainsi que sur la surface du cartilage articulaire (Fig. 6) ce qui suggère la **répartition discontinue du fluide synovial au niveau du contact articulaire**.

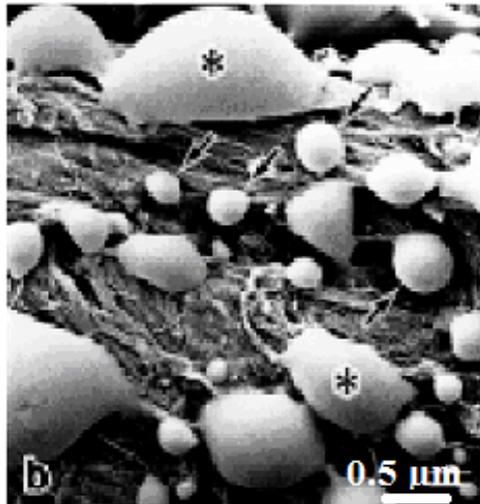


Figure 6. Présence des vésicules (*) sur la surface du cartilage articulaire – analyse cryo-MEB [267]

Cette répartition discontinue (Fig. 7a) dans le volume du FS peut avoir ses origines dans la composition du FS [251] qui permet la formation :

- des structures glyco-protéiques (gel synovial contenant l'AH et les protéines), qui sont entourées par
- des structures de type multicouches (constituées par les SAPLs).

En étudiant les interactions entre l'AH et les SAPLs, Pascali-Ronchetti [192] ont mis en évidence la formation d'auto-assemblages ayant une structure tubulaire de quelques µm en longueur et environ 0.1 µm en diamètre. Ces tubes (Fig. 7b), remplis d'AH, sont formés par des multicouches lipidiques (allant jusqu'à 12 bicouches empilées). Ces résultats ont été confirmés par des études récentes [170] qui ont mis en évidence par une analyse TEM de FS de rat la présence des structures assemblées de type vésicules (Fig. 7c), dont la paroi est constituée de 6 bicouches lipidiques empilées.

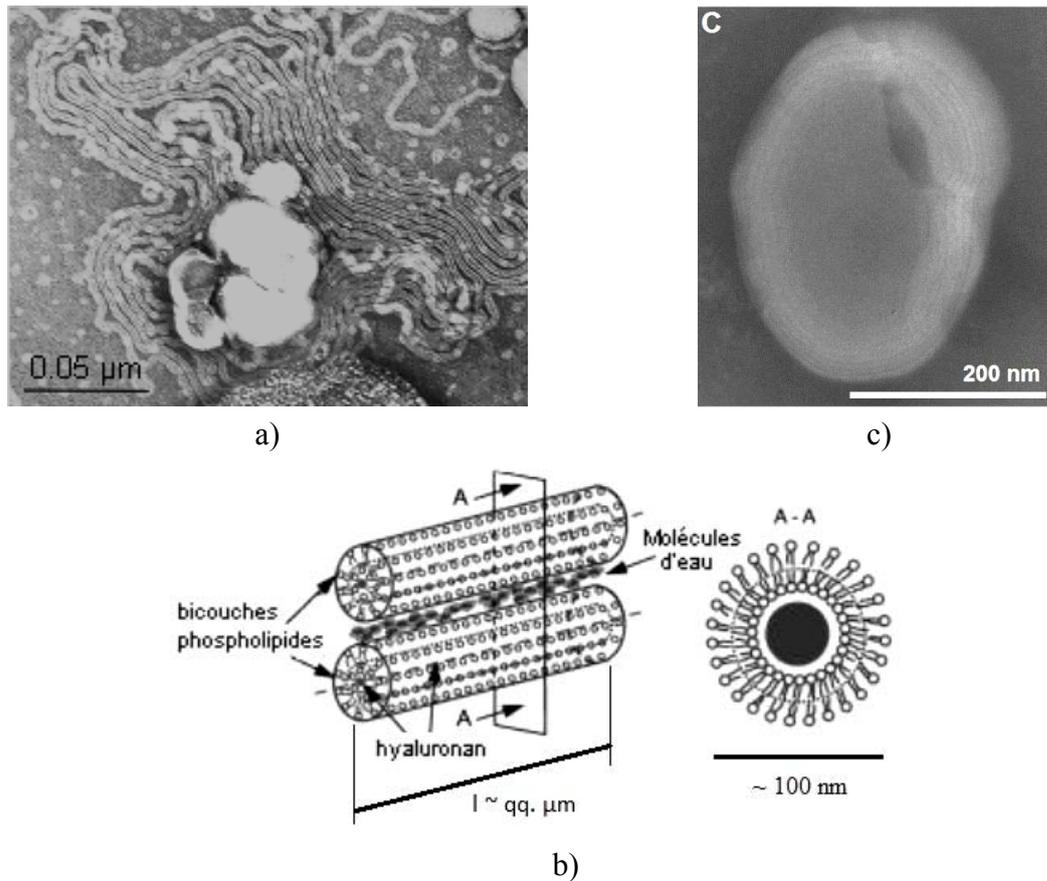


Figure 7. (a) Discontinuités dans le volume du FS ; (b) auto-assemblages tubulaires suite aux interactions entre l'AH et les SAPLs ; (c) SAPLs avec séparation de phases [170,192,252]

De plus, les études de Forsey *et al.* [77] sur le rôle dans la lubrification des structures supramoléculaires complexes [46,47] décrites dans la Fig. 7 [124,192,251] montrent que celles-ci réduisent le frottement du contact articulaire [165] et que la présence des SAPLs diminuent le caractère rhéofluidifiant des solutions aqueuses d'AH assurant ainsi les propriétés et le rôle physiologique du FS [45]. De plus, la formation de ces structures moléculaires assure la protection des SAPLs et par conséquent du cartilage articulaire contre l'action des enzymes [183] et des ROS (radicaux libres, formes activées de l'oxygène) [123,139]. Elles assurent aussi une diminution du coefficient de frottement dans le cas des modèles expérimentaux ostéoarthrosiques, jusqu'à une valeur proche de celle d'une articulation synoviale saine [46,139].

En utilisant la microscopie électronique en transmission (MET), Hills *et al.* ont mis en évidence l'existence des interfaces lipidiques sur la surface du cartilage articulaire, formées par un empilement de 3 à 7 bicouches lipidiques (Fig. 8, [107]) entre lesquelles se trouve du sérum physiologique (solution physiologique saline tamponné contenant environ 0.155M NaCl) [106]. Ces structures lipidiques sont présentes sur la surface d'autres structures du corps humain, telles que la plèvre, le péricarde et le péritoine, en y assurant un glissement sans effort des tissus [108].

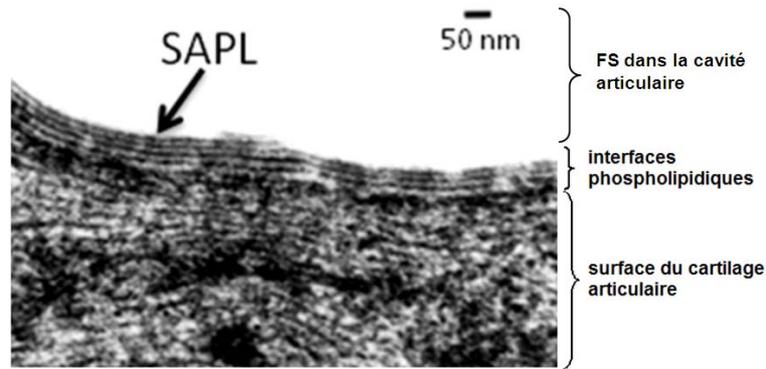


Figure 8. Interfaces lipidiques sur la surface du cartilage articulaire – analyse MET [107]

On peut donc conclure que l'empilement des bicouches lipidiques génère des structures de type **interfaces lipidiques** (Fig. 8 et Fig. 9), à la fois :

- dans le volume du FS où celles-ci entourent les vésicules constituées de gel glycoprotéique ;
- à l'interface entre le volume du FS et les surfaces du cartilage articulaire.

Dans ce contexte, des études récentes [251,267] sur le mécanisme de la lubrification articulaire saine ont montré que les performances tribologiques remarquables (minimum de frottement et d'usure au niveau du contact articulaire) du FS sain sont dues à sa **structure discontinue** (Fig. 9, [41,251]), dont le modèle proposé montre qu'elle est constituée de :

- **vésicules (poches)** remplies de gel synovial glycoprotéique (constitué d'AH et protéines, principalement albumine et γ -globulines) qui uniformisent les pressions locales du contact en comblant les rugosités de la surface du cartilage afin d'optimiser ainsi la transmission des charges normales ;
- **multicouches lipidiques** constitués par l'empilement des *bicouches lipidiques* et ayant une fonction de localisation du glissement avec un minimum de frottement et d'usure.

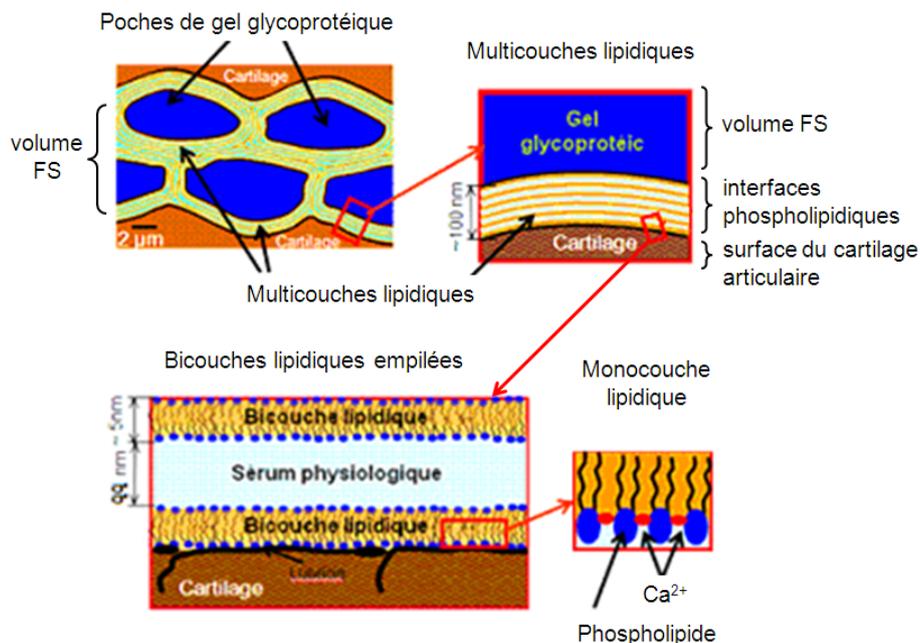


Figure 9. Modèle proposé pour la structure discontinue du FS [251]

Au niveau d'une bicouche lipidique on distingue les éléments qui la composent :

- des structures de type lipidique (principalement des molécules de **phospholipides**, conformément aux résultats présentés dans la *Partie B* [41])
- des ions bivalents tels que Ca^{2+} ou monovalents, pouvant s'adsorber aux têtes polaires des lipides et assurant ainsi la rigidité mécanique de la structure.

La présence de bicouches lipidiques empêche l'effet rhéofluidifiant du gel synovial et maintient ainsi une viscosité élevée du FS. En outre, des travaux de recherche récents [40,56] ont mis en évidence la résistance des bicouches lipidiques à la compression et au cisaillement. Ainsi, l'ensemble de la structure discontinue du FS doit être prise en compte pour les études tribologiques car elle est susceptible d'entraîner un mode d'accommodation des vitesses particulier généré par la présence de structures de viscosités très différentes.

A.2.3. Hypothèses sur la lubrification limite avec du fluide synovial

Lorsque les charges portantes sont les plus élevées, Les articulations synoviales se déplacent souvent plus lentement et dans ces conditions seulement un mécanisme de lubrification de type **limite** pourrait fonctionner.

Ainsi, le mouvement relatif des surfaces frottantes d'un contact dans le cas d'un régime de lubrification limite ne favorise pas la formation d'un film de lubrifiant d'une épaisseur beaucoup plus grande que la rugosité caractérisant ces surfaces. Donc, la seule barrière qui évite le contact direct entre les deux surfaces du cartilage articulaires composant l'articulation synoviale est un film moléculaire adsorbé sur les surfaces du contact qui se forme en concordance avec la topographie des surfaces. En l'absence de ce film, fortement adsorbée à la surface et ayant la capacité de régénération sous sollicitations, des interactions directes de contact entre les surfaces du cartilage favorisent leur dégradation rapide par usure mécanique.

Malgré le fonctionnement souvent en régime limite, plusieurs études ont montré que les articulations synoviales gardent des coefficients de frottement faibles (de 0.0005 à 0.04 selon [30,35,76,106,254]).

Pour expliquer ces résultats, plusieurs études ont cherché à identifier quel serait le composant moléculaire du FS qui peut intervenir en lubrification limite.

Pour identifier ces molécules, dès les années '70, des expériences ont été faites en extrayant la couche moléculaire de la surface du cartilage articulaire et parce que cette couche a été montrée comme ayant des bonnes propriétés lubrifiantes on l'a nommée « lubricine ».

Afin de la caractériser chimiquement, Swann en 1972 [241] a identifié par électrophorèse que celle-ci est constituée de molécules de type glycoprotéine, nommé « protéine de zone superficielle (SZP) » ou « protéoglycane 4 » (PRG_4), une glycoprotéine de type mucine avec des forte propriétés actives de surfaces [131,212,242,272]. La lubricine est un polymère

chargé avec une longueur de contour d'environ 200 nm [274]. Par la suite, celle-ci a été nommée « protéine active de surface » (SAP) [130,164,179,243]. Ces découvertes ont depuis ouvert la voie à la recherche dans le domaine de la lubrification articulaire limite.

Mais avec les avancées des techniques biochimiques, en 2000, Hills et Butler [103,106,236] ont découvert que les échantillons de FS contenant de la lubricine contiennent aussi des molécules de phospholipides (SAPLs).

Ainsi, actuellement il existe au moins deux candidats moléculaires qui peuvent être considérés comme jouant un rôle actif dans le mécanisme de lubrification limite de surface du cartilage articulaire:

- les « protéines actives de surface » (SAP) et
- les « phospholipides actifs de surface » (SAPLs).

Ces appellations « actives » sont utilisées pour

- mettre en évidence les excellentes propriétés lubrifiantes de phospholipides et de protéines ;
- expliquer les coefficients de frottement très bas obtenus dans la biolubrification limite.

En outre, les SAP et les SAPLs extraites de la couche de surface du cartilage articulaire sont souvent testées ensemble et c'est cette combinaison, appelée « lubricine » qui a été trouvée capable de maintenir un coefficient de frottement très faible [48,130,243]. Les rôles tribologiques de chacune de ces molécules sont encore débattus.

Récemment, il a été proposé par le groupe de Klein [209,2010] que la protection et la lubrification limite des surfaces biologiques sont dues à un mécanisme similaire à celui observé pour le cas des brosses moléculaires constituées de polyélectrolytes qui sont chargés dans un milieu aqueux et sont entourés par une couche de molécules d'eau liée aux groupes polaires chargés. Ces molécules ont permis d'obtenir des coefficients de frottement très bas, $\mu \sim 0.0005$, à des pressions allant jusqu'à plusieurs MPa, tels que mesurés par machine à forces de surfaces (SFA) [208]. Le groupe de J. Israelachvili [274] a également mesuré par SFA des forces de frottement entre la lubricine (polyélectrolyte biologique naturel) adsorbée sur des surfaces hydrophiles ou hydrophobes. Les coefficients de frottement à basse pression étaient plus élevés ($\mu \sim 0,02-0,04$), arrivant à une valeur $\mu = 0.2$ quand la pression a été supérieure à 0.6 MPa. Cette différence pourrait s'expliquer par la très grande densité surfacique et donc par la plus grande compacité (de type brosse de polymère) des polyélectrolytes synthétiques testés par Klein par rapport aux polyélectrolytes biologiques testés par Israelachvili. Une interprétation possible est que des coefficients de frottement élevés peuvent être obtenus lorsqu'on étudie des polyélectrolytes biologiques probablement en raison des effets d'interpénétration et de réarrangement de la couche de lubricine.

In vivo, les faibles concentrations de polyélectrolytes (par exemple 250 mg/ml [274] dans 1,1 ml de FS pour le cas d'une articulation du genou sain) et la grandeur des surfaces frottantes biologiques ($\sim 121 \text{ cm}^2$ pour les cartilages articulaires du genou [88,154]) suggèrent que la conformation moléculaire ne permet pas de former des brosses denses adhérentes à la

surfaces. Par conséquent, les faibles coefficients de frottement *in vivo* ne semblent pas être expliqués par la lubrification limite des polyélectrolytes. En outre, les progrès de la caractérisation biochimique de la lubricine indiquent que sa structure moléculaire est semblable à la vitronectine et à l'hémopexine [212]. La vitronectine confère à la lubricine le rôle de molécule adhésive, celle-ci manifestant une forte affinité (donc adhésion) avec l'agrécane de la matrice du cartilage articulaire [212,232] et avec les bicouches lipidiques du FS [232]. Ainsi, des résultats d'études récentes menés au laboratoire (*thèse D. Mirea, 2011*), couplant ces polymères biologiques à des leviers AFM et les forçant à entrer en contact avec des bicouches lipidiques indiquent des probabilités d'adhésion de 56.5% [170] et 82.9% [171] entre la mucine (substitut de lubricine car celle-ci n'est pas commercialisée) et les bicouches lipidiques. La partie hémopexine confère à la lubricine des propriétés anty-oxydantes [248], ainsi elle aurait un rôle protecteur contre l'oxydation biochimique des lipides [248] qui empêcherait ainsi leur dégradation et donc la destruction de la structure du FS, se qui affecterait le fonctionnement tribologique articulaire.

D'après ces résultats (qui montrent une très forte affinité entre la lubricine et les bicouches lipidiques) et les constats scientifiques sur l'interaction de la lubricine avec les molécules constituant la matrice du cartilage articulaire et la faible concentration dans le FS il est possible que la lubricine, au lieu de former des brosses de polyélectrolytes denses qui localisent le frottement (Fig. 10a), s'étende sur la surface frottante du cartilage ayant ainsi un rôle d'accrochage et de protection pour les bicouches SAPLs empilées à l'interface avec le FS (Fig. 10b). Ainsi, la **lubricine**, comme protéine de surface [223,224] assurerait la stabilité structurale jouant un rôle d'adhésif moléculaire [212] entre les bicouches lipidiques de SAPLs et la surface frottante du cartilage articulaire, ainsi qu'entre les bicouches et le gel synovial glycoprotéique du volume de FS, protégeant les surfaces du cartilage articulaire.

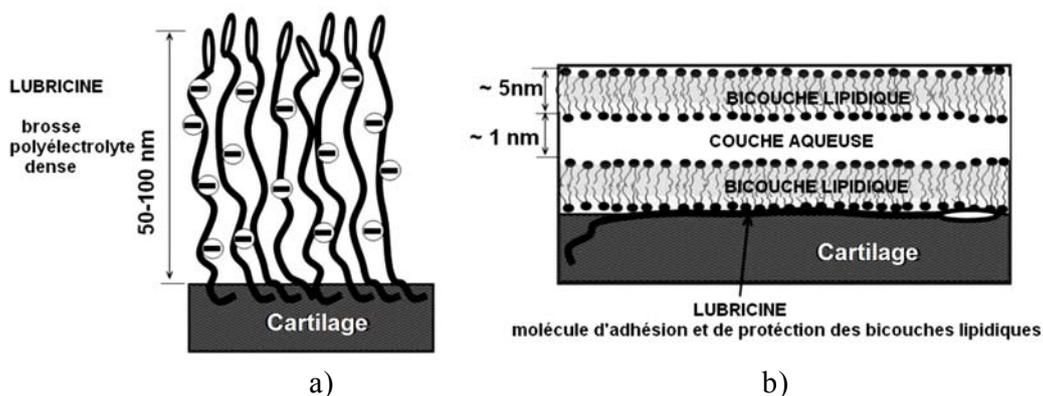


Figure 10. Deux conformations et rôles possibles de la lubricine (lubrifiant limite dans l'articulation synoviale) sur le cartilage : (a) brosses denses de polyélectrolytes ; (b) molécule d'adhésion et protection des bicouches lipidiques (SAPLs)

Les recherches de Batchelor et Stachowiak (1996) [11] ont conclu que les assemblages moléculaires constitués par les SAPLs et les glycoprotéines ont un rôle important dans la lubrification des articulations synoviales et les travaux de Murakami *et al.* (1998) [180] et de

Forster et Fisher (1999) [78] soutiennent également la capacité de lubrification limite des différents constituants du FS, y compris des SAPLs.

Plus encore, les recherches de Hills [102] suggèrent que les SAPLs constituent l'ingrédient essentiel de la lubrification limite des articulations. Transporté à la surface du cartilage dans le FS, les SAPLs y formeraient une interface entre la surface articulaire et le volume de FS (Fig. 11) [107] grâce à leur capacité d'auto-assemblage en bicouches (planes ou courbées) [246]. Cette interface, constitué de multicouches lipidiques (Fig. 9, [251]) assurerait une lubrification limite lorsque les surfaces articulaires devraient normalement être « en contact ».

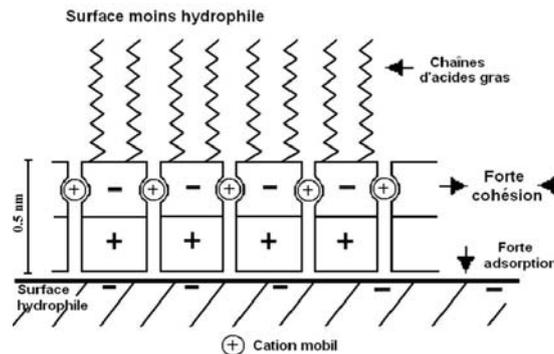


Figure 11. Schéma représentant une couche de SAPLs adsorbée sur la surface articulaire [107]

Mais le mécanisme fondamental à l'échelle moléculaire de cette remarquable biolubrification n'est peut être pas si différent de celui de lubrification interfaciale dans le cas des broches de polyélectrolytes greffées sur les surfaces frottantes [208] ou dans le cas des surfaces frottantes en mica, chargées électriquement en présence d'une solution aqueuse d'ions (Na^+). Dans ce dernier cas, un rôle majeur dans le mécanisme de lubrification revient aux sphères d'hydratation [98] formées par l'organisation de molécules d'eau autour des ions (Fig. 12, [30,42]).

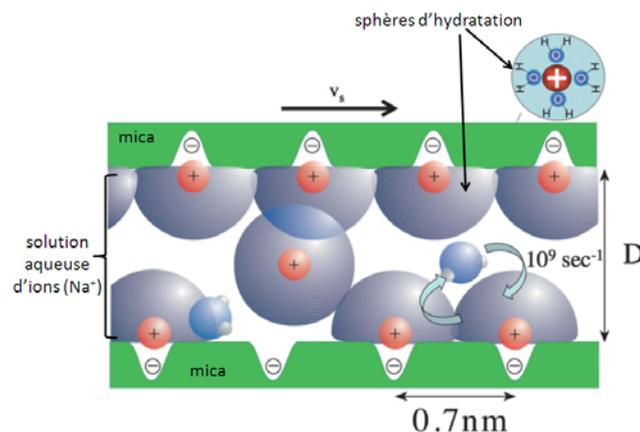


Figure 12. Représentation schématique du mécanisme de lubrification par ions d'hydratation [d'après 143]

La présence de ces sphères d'hydratation assure, suite à l'échange très rapide (10^9 s^{-1} , [144]) des molécules d'eau entre l'eau libre interstitielle et l'eau d'hydratation, des propriétés lubrifiantes remarquables par un mécanisme de « roulement à billes » (« *ball bearing* », [144]) et des coefficients de frottement très faibles, de l'ordre de 0.0015 [30]. De plus, les études

récentes par SFA de Klein *et al.* [83,90] ont mis en évidence le rôle des interfaces lipidiques obtenues à partir de vésicules (liposomes de PC) dans la réduction de frottement, avec des valeurs du μ d'environ 2×10^{-5} pour une pression moyenne allant jusqu'à 12MPa.

Dans ce contexte, alors que se poursuivent des discussions actives scientifiques (mais parfois aussi historiques et communautaires) sur le rôle des protéines et/ou des lipides SAPLs dans la biolubrification articulaire, dans cette thèse on a choisi d'étudier le rôle des interfaces SAPLs dans la biolubrification articulaire limite.

Comme nous l'avons dit, les moyens d'expérimentation in vivo étant insuffisants pour étudier le fonctionnement tribologique des assemblages moléculaires, il est nécessaire de réaliser des expérimentations ex vivo. Afin de garantir le « réalisme » des résultats obtenus par rapport à la réalité biologique, ces expérimentations nécessitent de reproduire ex vivo les spécificités du fonctionnement articulaire, à l'aide d'un modèle tribologique ex vivo.

A.3. Modèle tribologique *ex vivo* d'une articulation saine

Afin de surmonter les difficultés d'expérimentation liées à des problèmes de conservation caractérisant les matériaux vivants pour étudier le comportement tribologique des interfaces de type SAPLs, il est nécessaire de reproduire *ex vivo* par un modèle tribologique (Fig. 13) le triplet tribologique articulaire (décrit dans §A.2.1. et Fig. 3) en utilisant des matériaux synthétiques. Ces matériaux permettent une simulation réaliste des caractéristiques mécaniques, physico-chimiques et structurales du triplet tribologique articulaire, en revanche aucun matériau synthétique ne peut reproduire les compensations biologiques caractérisant le milieu vivant (ex. : la synthèse des macromolécules, le remodelage structural etc.).

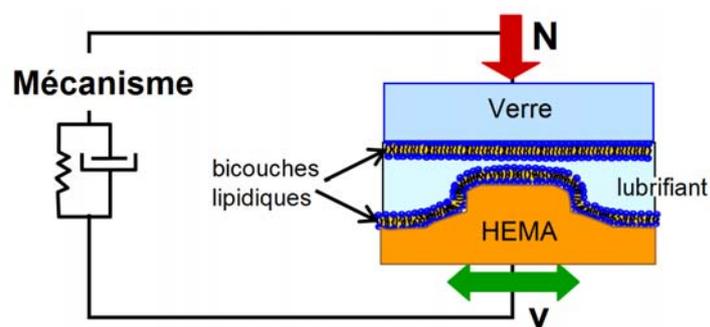


Figure 13. Schéma du modèle tribologique *ex vivo* d'une articulation synoviale

Ainsi, le modèle tribologique *ex vivo* défini dans cette partie est constitué d'un mécanisme modèle et de 1^{er} et 3^{ème} corps modèles, présentés ci-dessous.

A.3.1. Choix du mécanisme modèle

Tel que précisé dans le §A.2.1.1, dans cette thèse nous avons choisi d'étudier le fonctionnement articulaire dans le cas du **régime de lubrification limite**.

Les conditions mécaniques restrictives caractérisant le régime limite (fortes pressions locales au niveau du contact et très faibles vitesses relatives), imposent des sollicitations locales qui permettent que les effets de portance hydrodynamique soient négligeables, de sorte que le rôle des composants moléculaires (les interfaces SAPLs) soit mis en évidence et exacerbé.

On impose donc un régime de lubrification limite, avec une pression de contact de quelques dixièmes de MPa et une vitesse relative de quelques mm/s, paramètres qui n'influencent pas l'évolution de coefficient de frottement, tel que validés dans la *partie C*. Ces paramètres sont un compromis expérimental pour bien visualiser le contact pendant des essais de frottement, tout en restant dans un régime de lubrification limite.

A.3.2. Choix des 1^{ers} corps modèle

Dans le §A.2.1.2 nous avons indiqué que pour étudier *ex vivo* le comportement tribologique d'une articulation synoviale, il est nécessaire de reproduire *ex vivo* les propriétés poro-élastiques du cartilage articulaire. Les manipulations de prélèvement de cartilage affectent la structure complexe du cartilage, et notamment détruisent la membrane collagénique présente à sa surface. En outre, il perd ses propriétés vivantes quand il est soumis à des essais tribologiques de longue durée, ce qui emmène les chercheurs à s'orienter vers des matériaux non vivants pour trouver un substitut de cartilage articulaire, qui respecte le mieux possible ses propriétés mécaniques et physico-chimiques. Ainsi des matériaux synthétiques très hydrophiles de type **hydrogels** [43,80,85,113] : polyalcool vinylique (PAV), hydroxy-éthyl-méthacrylate (HEMA, [26,80]) sont actuellement utilisés comme modèles expérimentaux du cartilage articulaire.

Parmi les matériaux synthétiques de type **hydrogel** proposés pour simuler *ex vivo* ces propriétés mécaniques du cartilage articulaire, notre choix s'est porté sur l'hydrogel de type hydroxyéthyl-méthacrylate (HEMA) [25,26] de fait que sa structure (Fig. 14, [251]) et ses propriétés mécaniques (Tableau 2, [251]) sont très proches de celles du cartilage articulaire.

Ainsi, l'hydrogel HEMA présente des chaînes polymériques de méthacrylate qui forment des réticulations éthyle représentées par des structures de type hydroxy-éthyle, hydrophiles de fait des groupes HO⁻ qu'elles contiennent. Cette structure est comparable à celle du cartilage articulaire qui présente des fibres collagéniques réticulées par des assemblages moléculaires de type protéoglycane (gel), contenant des groupes hydrophiles (charges négatives de type SO₃⁻ et COO⁻) qui lui confère un caractère hydrophile.

Quand l'hydrogel HEMA est hydraté dans une solution tamponnée de NaCl (150mM), au pH physiologique (pH ~7), son module d'élasticité en compression est d'environ 0.5 MPa et sa perméabilité pour l'eau ~ 10⁻¹⁶ m⁴/N.s (pour une épaisseur de 1 mm de matériau soumise à une différence de pression hydrostatique de 2 MPa) [251].

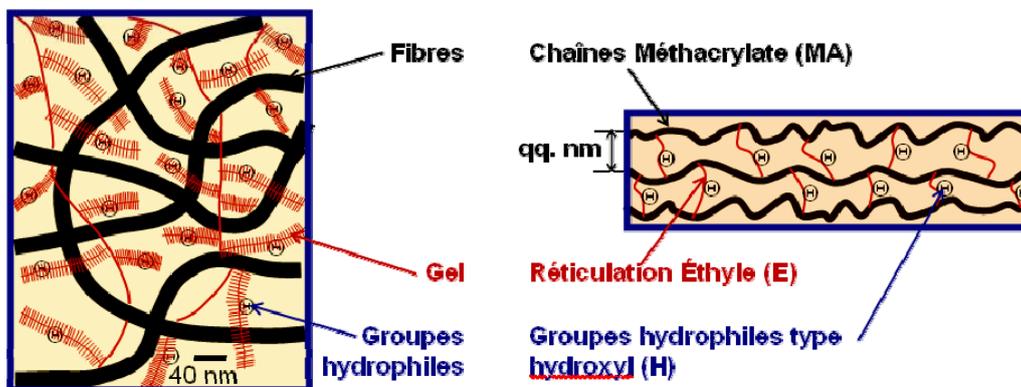


Figure 14. Schéma de la structure du cartilage articulaire et d'hydrogel HEMA [251]

Tableau 2. Comparatif des propriétés du cartilage articulaire et d'hydrogel HEMA (solution tampon de NaCl, 150mM [251])

Propriétés	Cartilage [176]	Hydrogel HEMA [168]
Module d'élasticité en compression (MPa)	0.5 – 1	0.2 – 0.9
Coefficient Poisson	0.2 – 0.4	-
Concentration en eau (w%)	Couche externe ~20 Couche interne ~70	~75
Perméabilité d'origine physico-chimique (m^4/Ns)	$10^{-16} - 10^{-15}$	$\sim 10^{-16}$

On comparant les propriétés mécaniques décrites dans le tableau 2, on peut constater leur similitude pour le cartilage articulaire et l'hydrogel HEMA.

Les caractéristiques du milieu d'hydratation influencent les caractéristiques mécaniques d'hydrogel HEMA [25], nous avons choisi comme milieu d'hydratation un milieu salé tamponné, avec un pH stable de 7.2 et 150 mM NaCl (voir *partie C*), caractéristiques semblables au sérum physiologique.

Afin de répondre à la nécessité de visualiser *in situ* le contact pendant les essais tribologiques, une surface en verre transparent a été choisie comme contre-face au 1^{er} corps modèle pour le cartilage articulaire (*Partie C* et Fig. 13).

Comme modèle du cartilage articulaire on a utilisé l'hydrogel HEMA issu des ébauches de lentilles cornéennes en HEMA semi-rigides (don généreux de la société *Corneal Industrie, France*), dont la macro géométrie (Fig. 13) présente une partie bombée permettant la localisation de la zone du contact lors des essais tribologiques (voir *Partie C*). De plus, la rugosité de la surface HEMA est très faible (quelques nm rms) par rapport à la rugosité du cartilage naturel (quelques μm rms) et cette différence a rendu possible l'étude du comportement tribologique des interfaces lipidiques tels que décrites ci-après.

A.3.3. Choix du 3^{ème} corps modèle

En rapport avec la structure discontinue du FS (décrite dans le §A.2.2.2) et les objectifs fixés pour les études présentés dans cette thèse (cf. §A.2.4) comme modèle *ex vivo* pour le 3^{ème} corps, on a choisi les **interfaces phospholipidiques** SAPLs constituées de deux bicouches phospholipidiques de très faible épaisseur (5 nm) adsorbées sur les surfaces des 1^{ers} corps hydrophiles, entre lesquelles se trouve une couche aqueuse (Fig. 15).

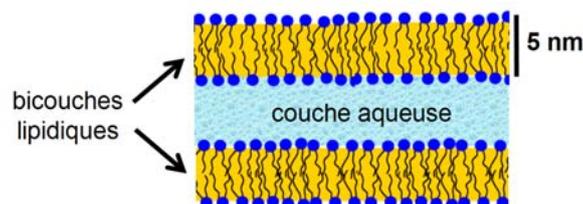


Figure 15. Schéma sur la structure du 3^{ème} corps modèle

A.4. Pathologies articulaires

Les fonctions du FS et le bon fonctionnement articulaire assurés par l'action du FS en tant que lubrifiant articulaire (fonction assurée principalement par ses composants) sont gravement perturbées en cas de diverses pathologies articulaires [17,58,73,99].

L'arthrose constitue un processus dégénératif chronique non inflammatoire affectant principalement le cartilage articulaire puis les autres composants d'une articulation synoviale : la membrane synoviale, puis l'os et les tissus péri-articulaires [219].

Actuellement l'arthrose n'est plus considérée comme une conséquence directe du vieillissement mais plutôt comme étant due à l'interaction de facteurs divers et multiples, à savoir des facteurs génétiques, métaboliques, mécaniques physico-chimiques et biologiques affectant l'articulation malade [31,247].

Ces facteurs (Fig. 16), déclenchent une activation et une prolifération anormale des chondrocytes [50] qui détermine une dégradation progressive du cartilage articulaire générant à la fois :

- l'usure et l'augmentation de la rugosité de la surface articulaire qui active et favorise l'action des enzymes de type ALP qui, en présence des interfaces phospholipidiques favorisent la minéralisation locale et l'auto-entretien de processus d'usure ;
- la modification de la perméabilité de l'eau et des ions au niveau du cartilage articulaire, ce qui détermine ainsi une variation du pH et de la concentration ionique, favorisant l'action d'autres enzymes pathologiques agissant sur les interfaces phospholipidiques de FS.

Ainsi, afin de comprendre le rôle des interfaces phospholipidiques dans le fonctionnement tribologiques des interfaces phospholipidiques il est absolument nécessaire de comprendre l'influence que ces facteurs (mécaniques, physico-chimiques et biologiques) ont sur l'intégrité des interfaces contenues dans le FS.

A.4.1. Facteurs mécaniques caractérisant les pathologies articulaires

Suite aux sollicitations locales défectueuses en cas de pathologies de type rupture de ligament, ménisques ou fracture du cartilage, il y a des accumulations de contraintes mécaniques qui génèrent la fissuration et l'endommagement des cartilages articulaires, avec une modification de la rugosité locale suite à l'usure de la surface du cartilage (Fig. 1 - Introduction) et donc du fonctionnement tribologique caractérisant une articulation synoviale saine.

Le processus de dégradation du cartilage semble susceptible d'inclure à la fois des facteurs «mécaniques» et «biochimiques», qui peuvent interagir [31,82].

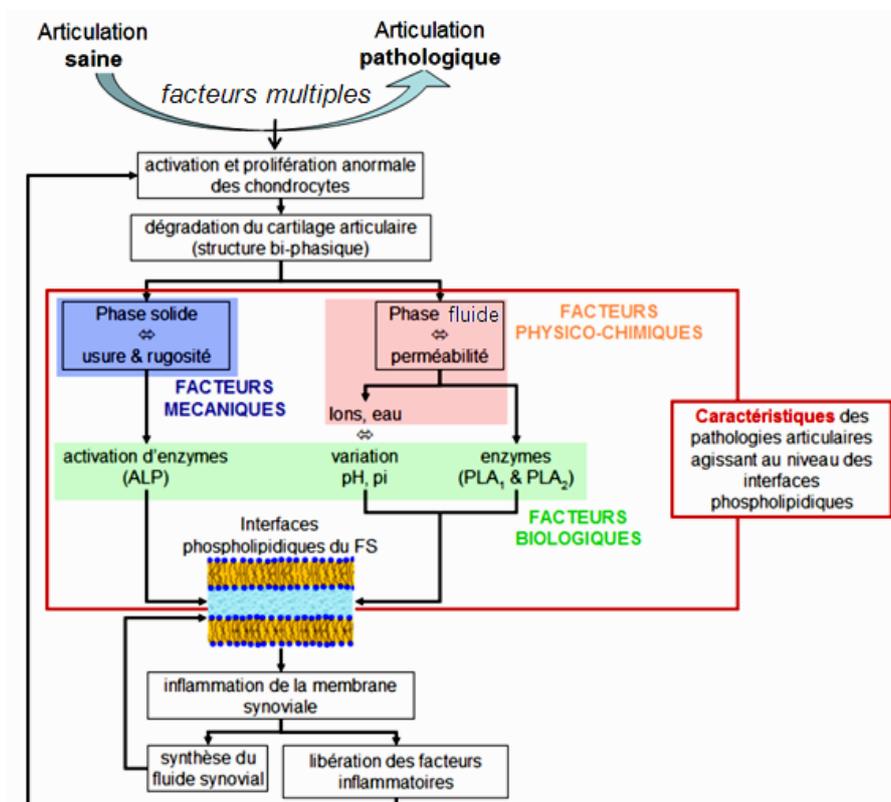


Figure 16. Paramètres caractéristiques des pathologies articulaires agissant directement sur les interfaces phospholipidiques contenues dans le fluide synovial.

Du point de vue **mécanique**, le cartilage est un matériau soumis à des charges répétitives et à des mouvements relatifs. Des microlésions pourraient donc s'accumuler et conduire à des phénomènes de rupture par fatigue. Ce mécanisme peut expliquer la détérioration du cartilage artériel, qui a une capacité limitée de régénération. En général une personne fait 2 à 3 millions de pas par an, et ainsi le cartilage doit sans doute résister à plus de 100 millions de cycles de charge pendant une durée de vie (même 160 millions de cycles pour le cas des personnes dont la durée de vie est d'environ 80 ans), ce qui correspond à une durée de vie infinie en termes de conception technique. Dans une telle situation, un très petit changement dans les conditions locales de contact peut avoir un effet très important sur l'évolution de sa structure [221].

Parmi ces facteurs, on a choisi d'étudier dans cette thèse l'influence des faibles variations de la rugosité du cartilage artériel sur le rôle et l'évolution des interfaces SAPLs en cas de pathologie artériel. Nous sommes conscients que ce paramètre est probablement de moindre importance que l'apparition de microlésions mais il est facilement contrôlable au moins sur l'une des deux surfaces de notre triplet tribologique (le verre).

A.4.2. Facteurs physico-chimiques caractérisant les pathologies articulaires

La perturbation pathologique de l'équilibre entre les mécanismes de synthèse et ceux de résorption du FS peut modifier sa concentration moléculaire et ionique, modification qui augmente la différence de pression osmotique entre le cartilage et le FS ce qui génère une migration anormale d'eau et d'ions positifs entre ces deux structures et induit un changement des propriétés physico-chimiques locales (*variation du pH et de la concentration ionique*) et mécaniques du cartilage.

L'opinion qui prévaut souvent dans la littérature est donc que les SAPLs jouent un rôle déterminant dans le fonctionnement articulaire et que les structures qu'elles forment se déprécient en qualité et quantité lorsque le cartilage se transforme suite au développement d'une pathologie articulaire [109]. La dégénérescence est souvent associée à des changements dans le pH du FS ce qui a des effets concomitants sur l'état de la mouillabilité de la surface du cartilage et affecte ainsi la formation et le maintien des assemblages lipidiques assurant le fonctionnement articulaire sain.

Parmi ces facteurs, on a choisi d'étudier dans cette thèse l'influence de la variation du pH et de la concentration ionique sur le rôle et l'évolution des interfaces SAPLs en cas de pathologie articulaire.

A.4.3. Facteurs biologiques caractérisant les pathologies articulaires

Le cartilage articulaire sain est en perpétuel renouvellement, avec des phases de destruction/dégradation compensées par des phases de reconstruction/régénération. Les chondrocytes présentes dans sa structure assurent ce remodelage régulier du cartilage qui est soigneusement contrôlé : dans la phase de destruction/dégradation, les chondrocytes assurent la sécrétion des enzymes de dégradation tandis qu'au cours des phases de reconstruction/régénération, les cellules du cartilage effectuent la synthèse de collagène et de protéoglycanes [175,176,251].

Toutefois, l'étiologie exacte de l'arthrose est loin d'être complètement comprise car c'est une maladie résultant de plusieurs mécanismes physiopathologiques (Fig. 17 et Fig. 18, [44,125,150]) dans lesquels les facteurs locaux et systémiques, ainsi que les déclencheurs sont en interaction biomécanique [1,7,32,7,269].

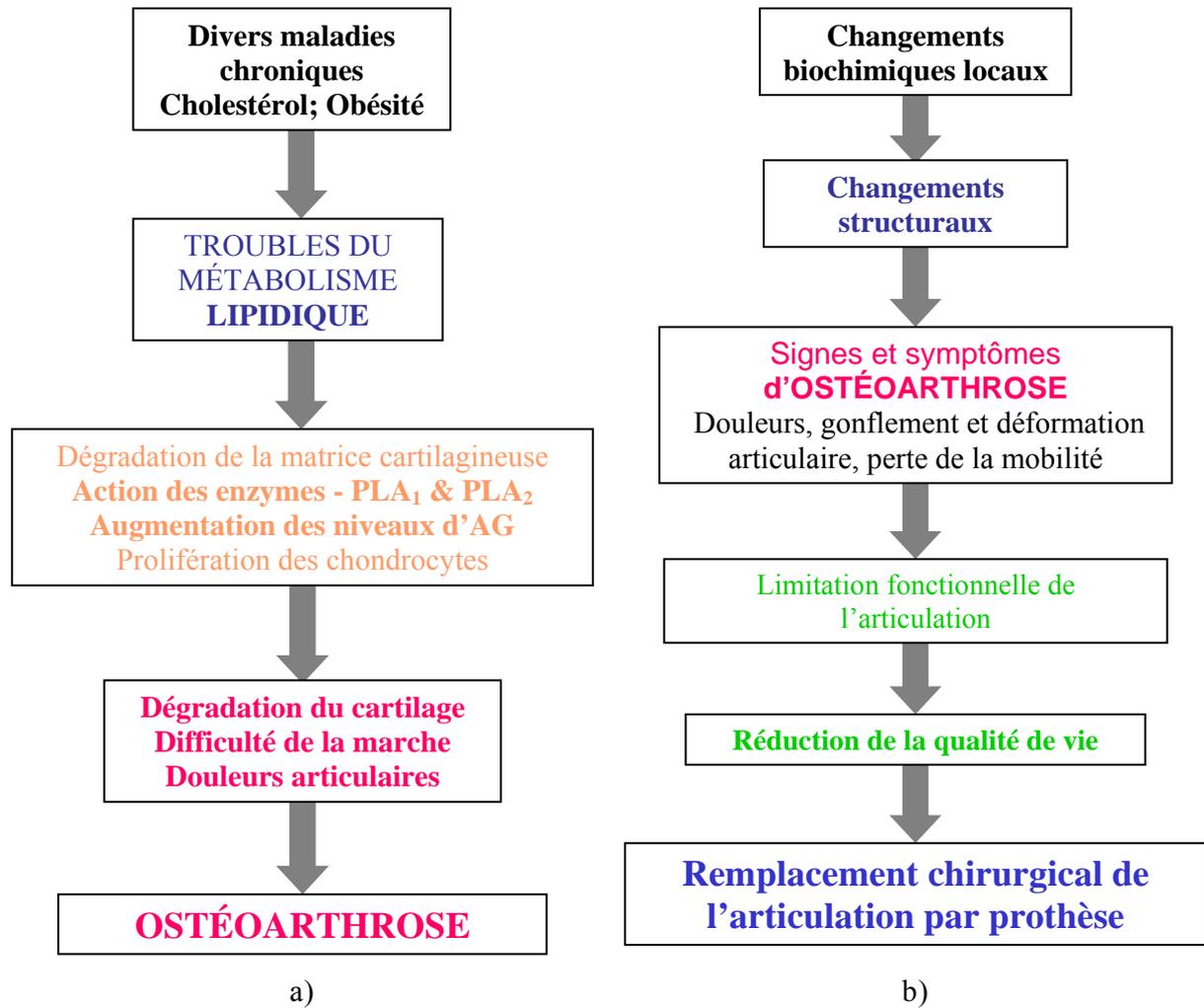


Figure 17 (a) Enchaînement causes – conséquences et (b) évolution des symptômes de l’ostéoarthrose (Schémas reprises de Gkretsi et al., [87]).

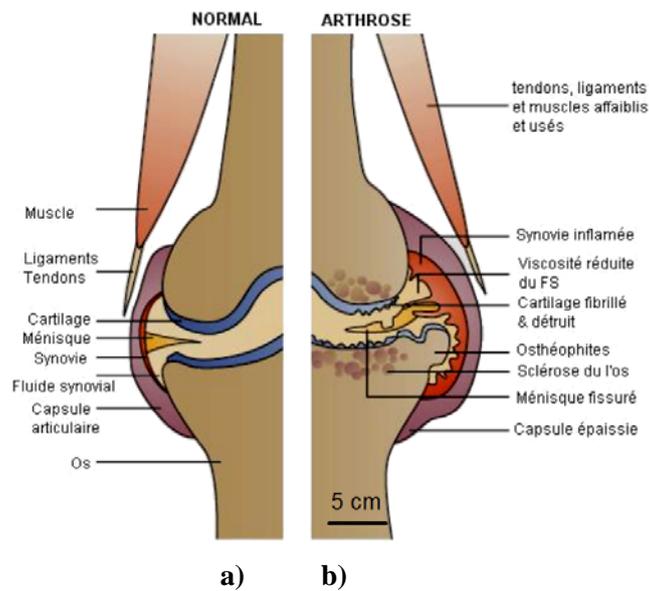


Figure 18. Schéma comparatif de l’état sain et pathologique d’une articulation synoviale : (a) cas sain - cartilage intact. (b) dégradation du cartilage dans le cas d’une arthrose accompagnée de l’inflammation de la membrane synoviale et la formation des excroissances osseuses [269].

Dans ce contexte, *l'arthrose* peut se définir comme un défaut de tentative de réparation du cartilage endommagé [140,222]. En effet, suite à la dégradation du cartilage, des débris peuvent rester dans l'articulation (Fig. 18), irriter la membrane synoviale, stimuler les cellules du système immunitaire qui s'y trouvent et aboutissant ainsi à la synthèse de très nombreux médiateurs inflammatoires [28]. Cette inflammation déclenche la libération d'**enzymes*** (*voir §A.4.2*) capable de détruire aussi bien la structure du cartilage que les interfaces phospholipidiques présentes dans la structure du FS [82,140,214]. Il a été montré que les interfaces SAPLs du FS sain sont modifiées à la fois sur la surface/ du cartilage articulaire (donc à l'interface avec le FS) et respectivement dans le volume du FS, avec des conséquences importantes pour le fonctionnement sous charge et la lubrification de l'articulation malade. Ces modifications des interfaces des SAPLs peuvent être déterminées par des modifications de la :

- synthèse des lipides (avec un changement de leur composition de fait qu'il y a plus de lipides issus du sang) ;
- structure lipidique par des effets enzymatiques.

A.4.3.1. Modification de la synthèse des lipides

Parmi les facteurs générant la modification de la synthèse lipidique, on a choisi d'étudier dans cette thèse

- la variation de la composition des interfaces SAPLs au cours des pathologies comme l'OA (*voir Partie B*) ;
- l'influence de cette variation sur leur rôle et évolution en cas de pathologie articulaire (*voir Partie C*).

A.4.3.2. Rôle et action des enzymes dans les pathologies articulaires

Des modifications dans le profil des composants du FS, principalement de l'AH et des lipides suite à l'action de divers enzymes de types hydrolases et lipolytiques sont maintenant connues pour se produire dans le cadre de l'évolution pathologique d'une articulation synoviale.

A titre d'exemple, il a été établi que la peroxydation des lipides du FS participe à la physiopathologie articulaire et notamment à la production d'épanchements inflammatoires [52,156,262] ce qui détermine une augmentation du volume de FS qui influence son fonctionnement tribologique.

Les principaux enzymes qu'on peut distinguer lors de l'évolution d'une pathologie articulaire liées au fluide synovial sont : les phospholipases, la hyaluronidase, et la phosphatase alcaline. Leur mécanisme d'action sera détaillé par la suite de cette section.

* Une **enzyme** est une protéine qui joue un rôle de catalyseur biologique, c'est-à-dire de composé qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction.

A.4.3.2.1. Les phospholipases

Lors du fonctionnement d'une articulation synoviale saine, le système de lubrification s'adapte en permanence par remodelage. Dans ce processus, assuré dans le cas sain de telle manière que la lyse (élimination biologique) des composants du FS et particulièrement des SAPLs est en équilibre avec la synthèse (sécrétion) de nouvelles molécules dans le FS et des enzymes de type **phospholipases** (notamment la PLA₂, sécrétée dans le FS par les synoviocytes*, les chondrocytes et les ostéoblastes [257]), qui sont probablement responsables de l'hydrolyse des SAPLs [200]. Cette action sur les SAPLs détermine la production de nouveaux types de molécules, avec une conformation différente et ainsi l'organisation en bicouche des interfaces lipidiques articulaires pourrait être détruite.

Les mécanismes impliqués dans l'homéostasie† d'une articulation saine sont donc très complexes et ils se compliquent encore lors d'événements pathologiques [227,270]. On suppose que, dans le cas des pathologies articulaires se produit un déséquilibre entre la sécrétion et l'élimination des composants du FS [151,226], or, la présence de la PLA₂ dans le FS lorsque elle est mal contrôlée constitue une menace pour la continuité et l'intégrité des assemblages lipidiques (Fig. 15) [21,93,169,239,261] et donc pour sa structure discontinue caractérisant le FS sain [251].

Les **phospholipases** [190,263] représentent un groupe d'enzymes solubles dans l'eau qui catalysent la réaction d'hydrolyse des liaisons ester dans la structure des PLs [82,169] dont la plus étudiée est la PLA₂, responsable de l'hydrolyse en position *sn*-2 des PLs (dont le plus abondant dans les membranes biologiques est la phosphatidyl-choline, PC) [199,205,256]. Suite à cette action enzymatique, l'intégrité des couches lipidiques est atteinte et la lysophosphatidylcholine (lyso-PC), une des molécules « messagère » dans l'inflammation articulaire, est libérée [63,82,200,220] tout comme des acides gras, principalement de l'acide arachidonique (AA) (voir *Fig. 37, § B.2.4*) [168]. La lyso-PC agit comme un agent chémostatique au site d'inflammation favorisant ainsi la réaction inflammatoire locale [87,168] tandis que l'AA libéré représente un précurseur essentiel pour la biosynthèse des médiateurs d'inflammation divers de type eicosanoïdes y compris les prostaglandines, tromboxanes, et les leucotriènes [13,53,60,63,153,177,211,256].

Un des types majeurs de PLA₂ et celle de groupe IIA, une PLA₂ « sécrétée » [91]. Les études montrent que cette enzyme a été purifiée à partir des FS des articulations atteintes de RA [145]. L'enzyme s'accumule à des niveaux élevés dans la cavité articulaire dans le cas des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [201,202]. De plus, Vadas et ses collaborateurs [258] ont montré que l'enzyme purifiée à partir du FS, une fois injectée dans une articulation, peut causer des modifications inflammatoires aiguës et prolifératives subaiguës au niveau des structures articulaires. En outre, des études *in vitro* ont montré une synthèse accélérée des prostaglandines par la membrane synoviale atteinte de RA [21] et une augmentation de

* Les synoviocytes humains sont capables de libérer de la PLA₂ dans l'espace extracellulaire synovial après stimulation par l'interleukine 1 (IL-1), une cytokine qui se retrouve en grande quantité dans le FS d'une articulation atteinte par la RA [86] ;

† L'**homéostasie** représente la constance du milieu intérieur, un processus par lequel un organisme vivant maintient constantes les conditions internes nécessaires et surtout indispensables à la vie cellulaire.

l'accumulation des acides gras (principalement l'AA) dans le cartilage articulaire atteint d'OA [155] entraînant une promotion de la résorption osseuse et la destruction du cartilage articulaire [214]. Ces produits entraînent à la fois une vasodilatation de la membrane synoviale (ce qui en résulte une perméabilité et une perfusion accrues de la membrane synoviale, permettant ainsi aux lipoprotéines plasmatiques d'entrer plus facilement dans la cavité articulaire) et un déclenchement des processus inflammatoires qui aboutissent à la destruction des articulations en cas d'arthrite [22,51,75,93,205,217,239,261].

Phospholipase A_2 conditionne aussi l'hydrolyse des acides gras nécessaires à la biosynthèse des prostaglandines et leucotriènes appelées eicosanoïdes ce qui a les mêmes conséquences [75].

De ce fait, le rôle de la PLA_2 dans le processus d'inflammation a été intensivement étudié [81,82,207,236,270,273]. La littérature récente montre que l'activité de la PLA_2 , l'enzyme qui catalyse la génération de lysophospholipides (lyso-PLs) à partir de PLs, est nettement plus accentuée dans les FS et les sérums de patients atteints de RA et l'OA à la différence de donneurs sains [27,128,202-204] et que des résultats comparables ont été observés dans les études sur des chiens atteints d'OA [189].

Modification de la structure du FS suite à l'action de la PLA_2

Différentes études biologiques ont montré que dans le cas des pathologies articulaires, l'enzyme PLA_2 est activée par la présence des radicaux libres [183]. Suite à l'action de cette enzyme, se produit la destruction des couches lipidiques et en conséquence, celle de la structure caractéristique du FS sain, principalement celle des poches de gel glycoprotéique (Fig. 19a). Ce phénomène peut être corrélé avec une baisse de la viscosité du FS : les molécules d'AH sont étirées suivant la direction de cisaillement puis dépolymérisées suite à l'action des hyaluronidases (Fig. 19b). Il y a alors contact direct entre les rugosités du cartilage ce qui génère la dégradation et l'usure des surfaces frottantes de cartilages articulaires (Fig. 19c).

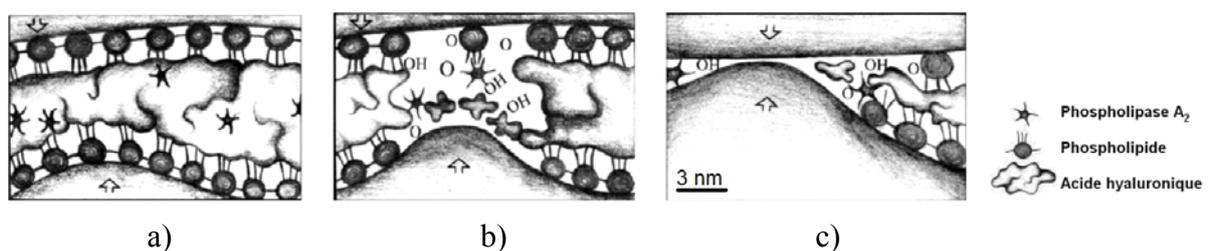


Figure 19. Schéma reprise de Nitzan *et al.* [183,251] concernant l'évolution des modifications pathologiques au niveau articulaire : (a) destruction de la structure caractéristique du FS sain ; (b) dépolymérisation de l'AH ; (c) destruction du film lubrifiant avec contact direct possible entre les surfaces du cartilage articulaire

A.4.3.2.2. La hyaluronidase

Le haut poids moléculaire de l'AH (4 à 5×10^6 Da) lui interdit de pénétrer dans les couches profondes du cartilage articulaire. L'AH synthétisé par la membrane synoviale est en partie dépolymérisé à l'intérieur de l'articulation synoviale, puis complètement au sein de la membrane synoviale qui possède une enzyme caractéristique, la **hyaluronidase** [126].

La **hyaluronidase** est une enzyme diminuant la viscosité des milieux riches en AH ; elle a pour fonction de détruire l'AH, et dans le cas du tissu conjonctif, permet ainsi aux bactéries et autres agents agresseurs d'y pénétrer plus facilement. En thérapeutique, elle est utilisée pour faciliter la diffusion de certains principes actifs dans la peau et dans le tissu conjonctif [120].

On observe une augmentation de la concentration synoviale d'AH avec l'âge et une diminution de son poids moléculaire. Au contraire, dans le cas des pathologies articulaires, on note une diminution aussi bien de la concentration et du poids moléculaire de l'AH du FS (Tableau 3, [19,97]). Ainsi, la variation des concentrations de diverses molécules composant le FS peut être différente dans le cas de vieillissement et dans le cadre d'une évolution pathologique de la maladie. Ces différences de variation (à la hausse comme à la baisse, Tableau 3) sont utiles afin d'établir si la diminution des performances articulaires est dû simplement au vieillissement ou bien à cause d'un état pathologique local.

Tableau 3. Evolution de la dégradation de cartilage (vieillissement naturel vs ostéoarthrose) [19,97]

Composant articulaire	Vieillissement	Ostéoarthrose
Contenu en eau	↓	↑
Module d'élasticité	↑	↓
Concentration PRG	-	↑
Dégradation PRG	↓	↑↑
Concentration AH	↑	↓
Dégradation AH	↓	↓↓

Ces modifications sont d'autant plus importantes que l'inflammation articulaire est plus intense :

- ainsi, le poids moléculaire de l'AH dans le cas d'un FS rhumatoïde est bas ou subnormal selon divers auteurs, mais c'est surtout sa concentration dans le FS qui est faible [158] ;
- dans le cas d'une arthrose, le poids moléculaire de l'AH est diminué de façon très variable, de 0,5 à 4×10^6 Da, ainsi que sa concentration, d'environ 0.8-2 mg/ml [94]. Ces «déficits» en concentration et en poids moléculaire sont la conséquence de multiples facteurs: dilution du FS par exsudation plasmatique* ce qui diminue la concentration, anomalies de la synthèse de l'AH (synthèse d'un AH moins polymérisé) [19], plus ou moins associées à une dégradation accélérée des molécules de poids

* L'**exsudation plasmatique** = fuite du plasma vers les tissus, assurée par des médiateurs de la réaction inflammatoire et favorisée par l'écartement des cellules endothéliales des capillaires ;

moléculaire normal par l'action des radicaux libres* (les molécules d'AH présentes dans l'articulation sont donc beaucoup plus petites, ce qui diminue les propriétés rhéologiques du FS) [9,186,210,251].

L'AH est largement responsable de la viscosité et de l'élasticité du FS et il joue un rôle indirect mais très important dans la lubrification de type limite qui caractérise le fonctionnement normal d'une articulation synoviale par la protection des molécules de SAPLs contre l'action de la PLA₂. La diminution de sa concentration et de son poids moléculaire dans une articulation pathologique concourt donc à l'augmentation des phénomènes inflammatoires synoviaux et donc à l'aggravation de l'agression du cartilage (Fig. 19).

A.4.3.2.3. La phosphatase alcaline (ALP)

La phosphatase alcaline (ALP) (Fig. 20, [114]) est une enzyme de type hydrolase, responsable de la suppression des groupes de type phosphate à partir de nombreuses structures moléculaires, y compris les PLs. Le processus d'élimination du groupement phosphate est appelé déphosphorylation. Comme leur nom l'indique, les phosphatases alcalines sont les plus efficaces dans un environnement alcalin. L'enzyme mesure 5 à 10 nm et a des sites actifs d'action séparés de 3 nm [119]. Pour son action enzymatique, l'ALP agit en présence de cofacteurs métalliques activateurs tels que les ions de Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ [118]

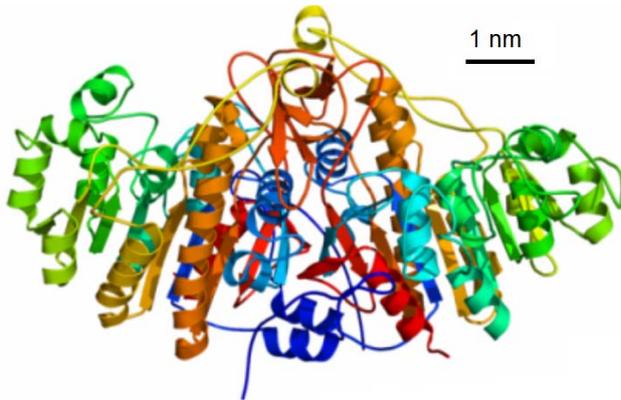


Figure 20.

Diagramme en ruban (couleur « arc en ciel », partie N-terminale = bleu, partie C-terminale = rouge) de la structure dimérique de la ALP bactérienne [114]

L'ALP est indispensable à la minéralisation de l'os, car l'ALP agit sur le pyrophosphate inorganique (PP_i) et permet ainsi la libération de phosphate inorganique (P_i) qui se lie au calcium (Ca²⁺) pour former des **cristaux d'apatite** (Fig. 21) [5,117]. Ainsi, dans les *ostéoblastes* (cellules osseuses ayant pour but la fabrication du tissu osseux) et les *chondroblastes* (cellules dans la structure du cartilage articulaire), existent des vésicules de calcification, c'est-à-dire de minuscules protubérances des membranes cellulaires, qui contiennent de l'ALP. Celles-ci se détachent de la cellule et vont dans la matrice osseuse. Dans la matrice, il y a un dépôt de sels de calcium : les cristaux s'agglutinent de telle sorte qu'il n'y a pas de fracture quand l'os subit des contraintes [12,250].

* Des études récentes ont montré que l'initiation et la progression de l'OA se doit en partie à l'action intra-articulaire des ROS (*reactive oxygen species, engl.*), générant un stress oxydatif, capable d'oxyder et en conséquence de modifier la structure des composants articulaires, principalement le collagène, les PRG et l'AH [89,138,186,247]

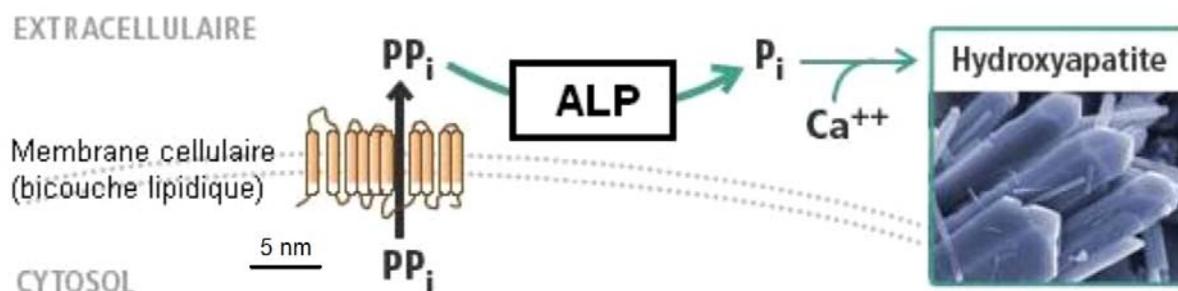


Figure 21. Réactions *in vivo* pour la formation de l'apatite suite à l'action de l'ALP [117]

En ce qui concerne le FS, parmi les PLs qui s'y trouvent, la phosphatidylserine (PS) [196,271] a une forte affinité pour les ions de Ca^{2+} [23,29].

De plus, dans les FS atteintes d'OA, où le pH est basique (Tableau 3), les niveaux d'ALP augmentent [146,227]. Or, en présence de l'ALP, les interactions entre la PS et les ions Ca^{2+} déterminent l'activation de processus de minéralisation et donc la précipitation des cristaux de pyrophosphate de calcium (PPC) dans le FS et sur la surface du cartilage (Fig. 22) [116].

Au cours du mouvement articulaire, la présence de ces cristaux favorisent l'usure du cartilage et l'accentuation des symptômes et ainsi l'aggravation de la pathologie articulaire [121].

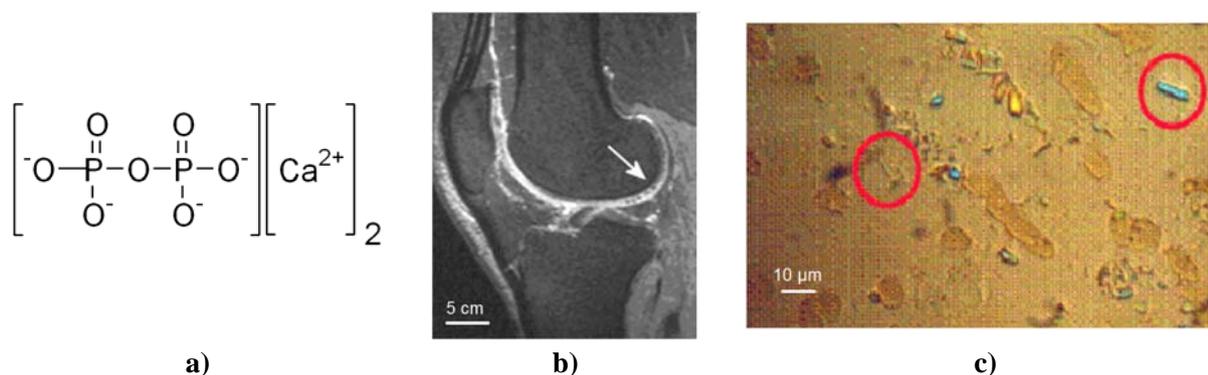


Figure 22. Action de l'ALP dans l'articulation synoviale : (a) structure du PPC ; (b, flèche) zone de minéralisation du cartilage artériel dans l'articulation de genou ; (c, cercles rouges) dépôt des cristaux de PPC dans le FS [116,121]

Durant l'examen cytologique des liquides articulaires et péri articulaires, on trouve des cristaux de pyrophosphate de calcium (PPC) ayant une longueur de 0,5 à 10 μm , avec des formes variées (losanges, parallélogrammes, plus rarement bâtonnets). Ces cristaux ont une localisation extra ou intracellulaire et ils sont parfois très rares (moins d'une dizaine sur une lame) ou très petits et échappent ainsi à l'analyse. Une particularité de ces cristaux est qu'ils sont encore visibles après la coloration des tissus de type May-Grunwald-Giemsa (MGG) (Fig. 23) [228,122].

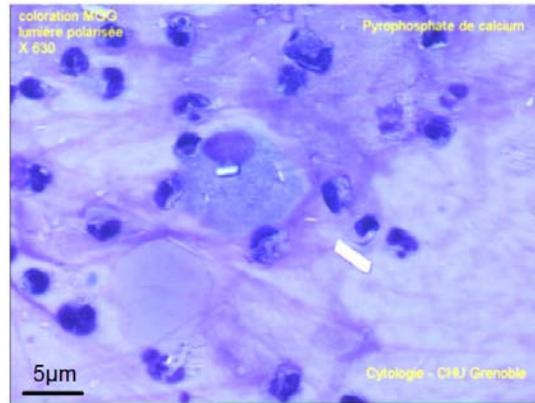


Figure 23. Présence des cristaux de PPC dans la structure du FS, après coloration MGG [122]

En terme de durée de vie, ces cristaux peuvent être présents plusieurs mois après l'accès inflammatoire dans un épanchement articulaire. Cliniquement on parle de chondrocalcinose articulaire (CCA), une affection extrêmement fréquente, liée à des dépôts de cristaux de PPC dans les structures articulaires. On désigne parfois cette affection sous les termes de "chondrocalcinose articulaire diffuse" (le terme "diffus" permettant d'insister sur le siège souvent poly-articulaire des lésions) ou de "synoviocalcinose" (cette définition soulignant la fréquence des synovites et la présence de cristaux dans la membrane synoviale et le FS).

Parmi ces facteurs, on a choisi d'étudier dans cette thèse l'influence de l'action enzymatique (pour la PLA₂ et l'ALP, chacune agissant à un pH optimal de 7.4 respectivement 8.2) sur le rôle et l'évolution de ces interfaces en cas de pathologie articulaire.

A.5. Conclusions

Depuis les années 50 de nombreux travaux cherchent à comprendre les performances tribologiques remarquables (minimum de frottement et d'usure) du triplet tribologique articulaire sain ainsi que la perte de ces performances dans le cas des pathologies articulaires.

Les études visant à comprendre les phénomènes liés au fonctionnement des articulations synoviales humaines sont très complexes et elles nécessitent une vue d'ensemble sur les interactions mécaniques, physico-chimiques et biologiques caractérisant les structures articulaires vivantes.

Les pathologies articulaires sont causées par une multitude de facteurs (mécaniques, physico-chimiques et biologiques) qui gênent la rupture de l'homéostasie articulaire pouvant provenir du cartilage, de la synovie, de l'os ou du système musculo-ligamentaire.

Les recherches visant à comprendre le fonctionnement tribologique des articulations synoviales saines ont mis en évidence le rôle des composants du fluide synovial, notamment celui des assemblages moléculaires dans la lubrification articulaire. Ainsi, des études physico-chimiques du fluide synovial ont montré que sa composition moléculaire entraîne des interactions entre le composant lipidique et les composants glycoprotéiques, d'où la formation d'une structure discontinue [251] composée de vésicules entourées de multicouches lipidiques. Donc, **un intérêt particulier dans cette thèse est porté aux interfaces phospholipidiques présentes dans la structure du fluide synovial et à l'interface avec le cartilage articulaire ; nous nous sommes axés notamment à étudier leur rôle et évolution dans les pathologies articulaires.**

Pour se faire, nous avons utilisé un **modèle tribologique *ex vivo*, constitué par les interfaces phospholipidiques SAPLs** formées par l'empilement de deux bicouches phospholipidiques entre lesquelles se trouve une couche aqueuse (Fig. 15).

Avec ce modèle on va étudier **l'influence des paramètres caractérisant les pathologies articulaires** (à un stade très précoce, quand le cartilage articulaire est très faiblement usé et ayant comme origine le fluide synovial) sur le rôle et l'évolution de ces interfaces. Il s'agit de paramètres :

- mécaniques : *les faibles variations de la rugosité* des surfaces en contact ;
- physico-chimiques : *la variation du pH et de la concentration ionique* de la couche aqueuse ;
- biologiques : *la variation pathologique de la composition des interfaces SAPLs et l'action enzymatique de la PLA₂ et de l'ALP.*

Partie B.

Partie expérimentale – Analyse lipidomique des fluides synoviaux pathologiques

Bien que dans la littérature des résultats concernant la composition en phospholipides des fluides synoviaux soient présentés, une analyse en détail de ceux-ci nous a emmenés à avoir certaines doutes pour des résultats parfois incomplets et en désaccord avec la réalité biologique.

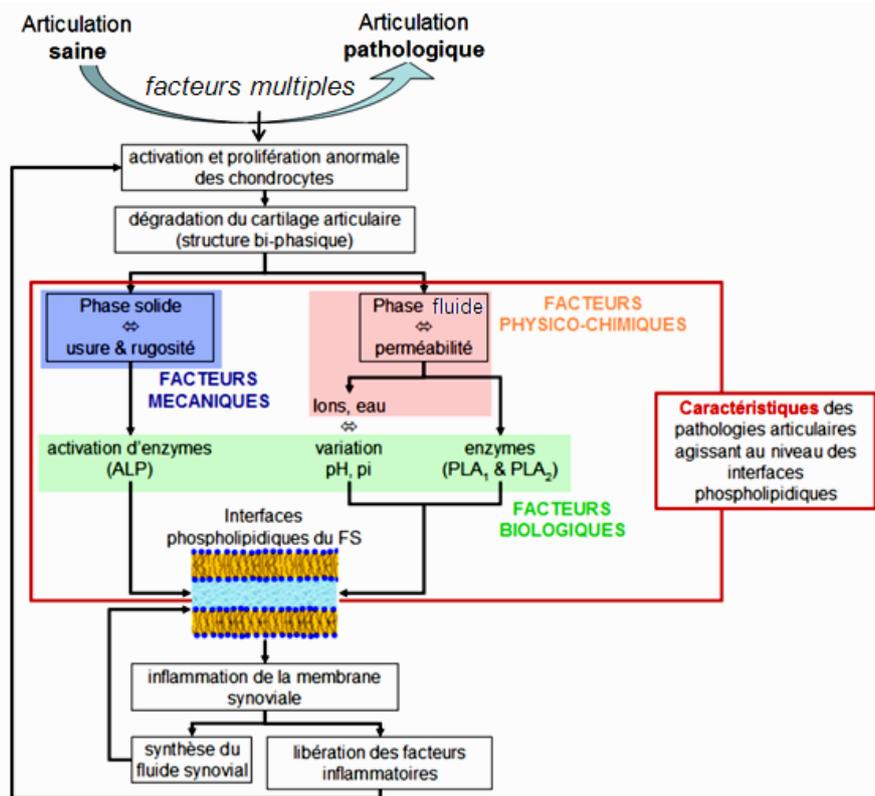
De ce fait, cette partie a pour objectif de caractériser (qualitativement et/ou quantitativement) le profil des phospholipides et des médiateurs lipidiques de l'inflammation, présents dans le fluide synovial (FS). Pour ce faire, des échantillons de fluides synoviaux sain et pathologique ont été analysés.

On présentera d'abord le principe de l'analyse lipidomique et la méthodologie utilisée. Puis, après le détail des résultats obtenus, une analyse critique par rapport à la littérature et les limites expérimentales ainsi que des perspectives en vue d'amélioration de la technique d'analyse seront également présentés.

B.1. OBJECTIFS DES ANALYSES LIPIDOMIQUES	43
B.2. STRUCTURE ET PROPRIETES DES PHOSPHOLIPIDES.....	44
Les phospholipides.....	44
B.2.1. Comportement des lipides dans l'eau.....	47
B.2.2. Propriétés des bicouches phospholipidiques.....	49
B.2.3. Réaction d'oxydation des lipides.....	51
B.2.4. Action des phospholipases sur les phospholipides	52
B.3. ANALYSE DES FS PATHOLOGIQUES - METHODOLOGIE	55
B.4. RESULTATS & DISCUSSIONS.....	57
B.4.1. Précautions et limites expérimentales.....	57
B.4.2. Echantillons analysés.....	59
B.4.3. Synthèse de résultats.....	60
B.4.4. Discussions	73
B.5. CONCLUSIONS.....	77

B.1. Objectifs des analyses lipidomiques

Dans le cas de pathologies articulaires, tel que présenté dans la section §A.4. on peut supposer un changement de la structure des interfaces phospholipidiques contenues dans le fluide synovial (FS) pathologique suite à l'action de divers facteurs (mécaniques, physico-chimiques et/ou biologiques, conformément à la figure 17 - Partie A, reproduite ci-après). Cette modification de structure a pour conséquence directe une modification de leurs propriétés tribologiques.



Celles-ci dépendent des deux caractéristiques thermodynamiques des interfaces phospholipidiques :

- le type de **phase des phospholipides** qui les composent (phase solide ou fluide) qui influence leur **mobilité locale** et implicitement la **rhéologie** de ces interfaces ;
- la présence de différents types de « **têtes** » **phospholipidiques** (ayant des structures chimiques variables, voir §B.2.) qui par leurs propriétés chimiques locales peuvent influencer l'**accrochage** de ces interfaces à la surface du cartilage artériel

Ainsi, une **analyse lipidomique quantitative** nous a permis de mettre en évidence et de quantifier les différentes classes des phospholipides (de type PC, PE, PI, PS, Sph) présentes dans la composition des fluides synoviaux analysés ainsi que la nature de leurs chaînes acyle (saturés, mono- et poly- insaturés) qui impose la phase des molécules.

Les propriétés tribologiques dépendent aussi de **l'action de diverses enzymes** (principalement celles de type phospholipases) qui sont activées dans le cadre de l'évolution locale de la pathologie articulaire. Ces enzymes agissent au niveau des structures lipidiques du FS et génèrent ainsi la formation des lyso-phospholipides ou de marqueurs de l'inflammation (LTB₄ ou 5-HETE). Plus concrètement, l'infiltration des leucocytes* entraîne la formation de leucotriènes (en particulier LTB₄) à partir de l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) [30,82] qui est « libéré » suite à l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) lors de l'inflammation. L'acide arachidonique (AA) devient ensuite substrat d'une autre enzyme (la 5-lipo-oxygénase, L_{OX}) pour former les leucotriènes (LTB₄) et l'acide 5-hydroxy-eicosatétraénoïque (5-HETE) (*voir §A.4.2, concernant l'action des enzymes sur les phospholipides*) des composant ayant un rôle de régulateur de l'activité physiologique, surtout dans les états inflammatoires [26] d'où l'intérêt croissant de les étudier en tant que marqueurs des pathologies [29]. La présence de ces marqueurs dans les fluides synoviaux pathologiques analysés a été mise en évidence par une **analyse lipidomique qualitative**.

Pour mieux comprendre les aspects chimiques présentés dans cette partie, la structure et les propriétés des phospholipides sont présentés dans le [paragraphe §B.2](#).

Le principe et les techniques d'analyse lipidomique ainsi que les détails concernant la nomenclature des acides gras qui composent les chaînes acyle des phospholipides sont inclus dans la section « [annexes](#) » de ce manuscrit.

B.2. Structure et propriétés des phospholipides

Les phospholipides (lipides phosphorés) font partie de la classe des **lipides complexes**, cet à dire des lipides qui contiennent en plus du carbone, hydrogène et oxygène un ou plusieurs hétéroatomes (*azote, soufre et pour le cas des phospholipides, du phosphore*).

Les structures cellulaires des mammifères contiennent plus de 1000 molécules de phospholipides différentes, cette diversité [72] étant due à une large variété des chaînes acyle estérifié (notés « acides gras » dans la Fig. 25) dans leurs structures, dans les positions *sn-1* et *sn-2*. De manière générale, la position *sn-1* d'un phospholipide contient des substituents d'acide gras saturé, tandis que les chaînes acyle dans la position *sn-2* sont principalement des espèces moléculaire insaturées. [25,40,99].

Les phospholipides sont les composants essentiels des membranes cellulaires et sont donc présents dans tous les organismes vivants [98]. La principale classe de phospholipides naturels est représentée par les **glycérophospholipides** (GPLs). Celles-ci représentent environ 60% (%mol) de la masse lipidique [106], dont majoritairement de PC (45-55%, [40]) et en quantité suffisamment abondante existent aussi le PE (15-25%, [40]), tandis que le PS et le PI

* **Leucocytes** = globules blancs, cellules du système immunitaire dont le nombre augmente dans l'organisme dans le cas d'infection ou de réaction inflammatoire ;

existe en générale en petite quantité (2 à 10% PS [99] et <1% PI). Il faut toutefois garder à l'esprit que dans un organisme multicellulaire, les différentes tissues qui le composent (donc ayant des cellules différentes) ont des compositions phospholipidiques différentes [40]. Ainsi, le cerveau est riche en PS comparatif aux autres tissues des mammifères et en particulier en ce qui concerne les espèces moléculaires contenant comme acide gras insaturé l'acide docosahéaenoïc (DHA, 22:6n-3) [55].

Les **glycérophospholipides** sont composés des esters de **glycérol**, **2 acides gras** (positions *sn-1* et *sn-2*), un **phosphate** et un **alcool**. La structure générale d'un phospholipide est reportée à la figure 24.

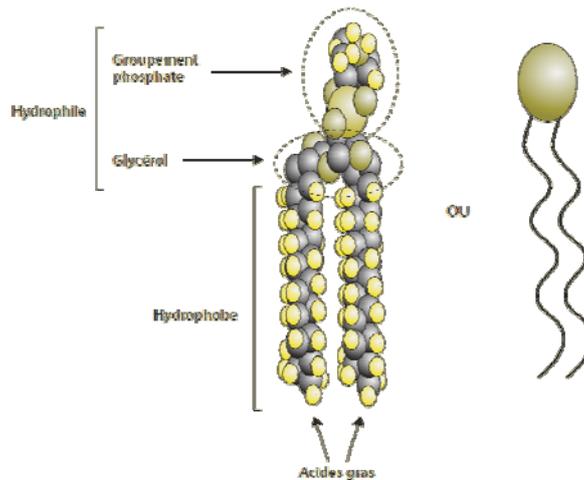


Figure 24. Structure générale et représentation schématique de la structure d'un phospholipide [61]

Les phospholipides sont donc des molécules *amphiphiles* (Fig. 25) [91], constituées :

- d'une **« tête » polaire hydrophile** (surface moyenne de 50 Å², contenant les groupements carboxyles -COOH qui ont une forte affinité pour l'eau) composée de trois éléments qui sont un *glycérol*, un *phosphate* et un *group alcool spécifique* à chaque type de phospholipide. Ce groupe polaire spécifique peut être ionique (chargé positif ou négatif), zwitterionique (deux charges opposées), ou neutre.
- de deux **« queues » hydrophobes** (notés *sn-1* et *sn-2*) sont composées chacune d'un acide gras à long chaîne (en général *saturé* en position *sn-1* et/ou *insaturé* en position *sn-2*).

Etant donné que les glycérophospholipides portent le nom des groupements alcooliques présents dans leur structure, selon le type d'alcool, on distingue les classes suivantes de phospholipides (Fig. 26):

- le *phosphatidylcholine* (alcool = choline), PC ;
- le *phosphatidyléthanolamine* (alcool = éthanol amine), PE ;
- le *phosphatidylsérine* (alcool = sérine), PS ;
- le *phosphatidylinositol* (alcool = inositol), PI.

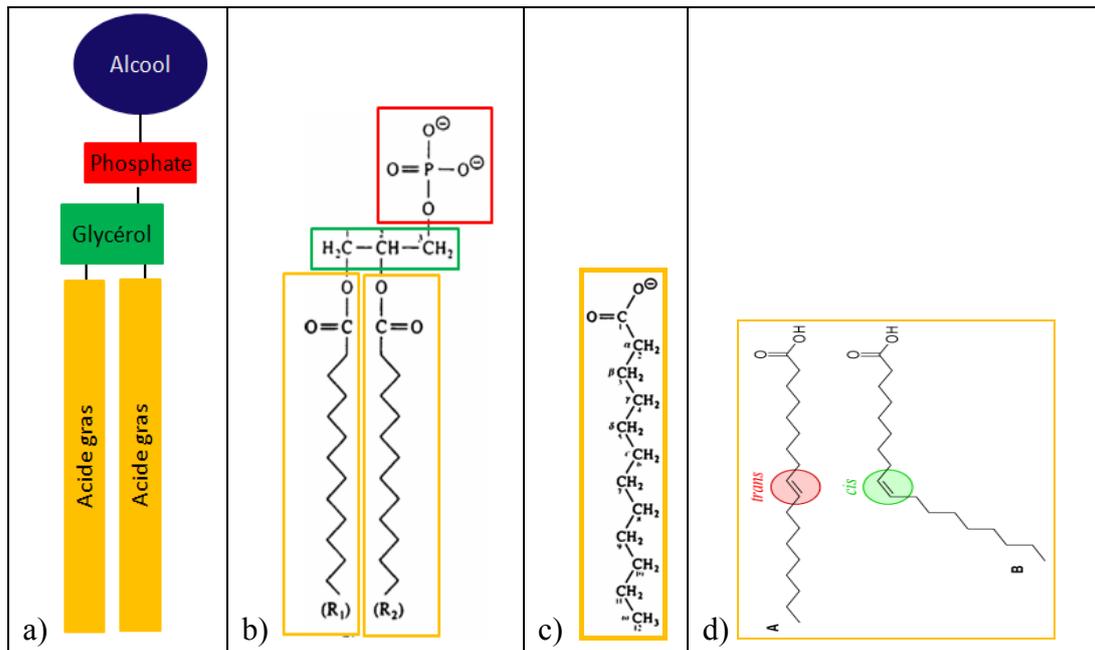


Figure 25. Représentation schématique de la structure d'un phospholipide.

- (a) Schéma de la structure complexe d'un phospholipide ;
 - (b) détail « chimique » de la structure ;
- Chaîne acyle saturée (c) et insaturée (d), composée d'acide gras et formant les « queues » des phospholipides.

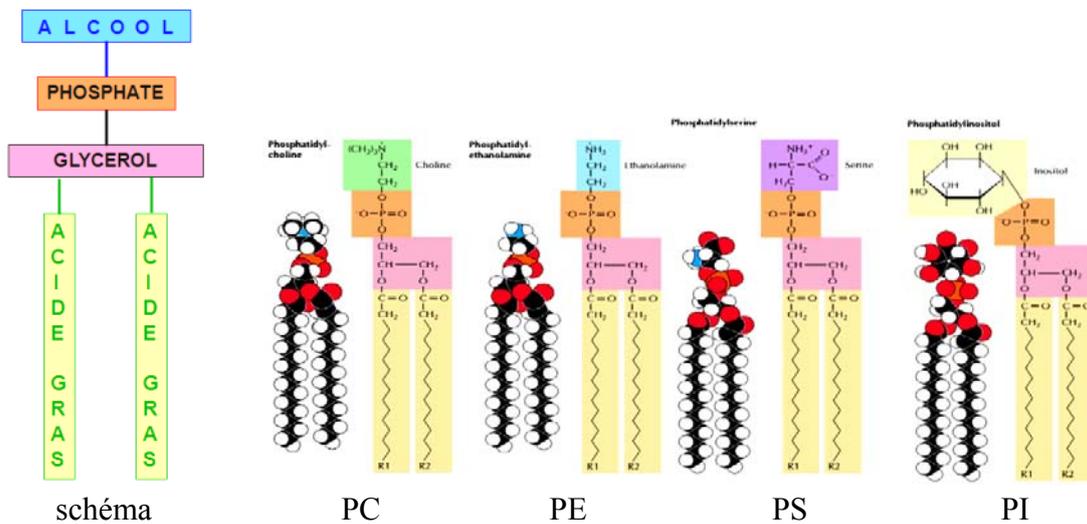


Figure 26. Différents types de PLs en fonction de la structure des têtes polaires (C – choline, E – éthanol amine, S – sérine, I – inositol)

Au pH physiologique^{*}, le PI et le PS sont chargé négativement, tandis que le PE est zwitterionique ou très faiblement anionique et le PC zwitterionique (Fig. 27) [98].

^{*} pH physiologique : le pH de sang à l'intérieur des artères, ayant une valeur de 7,41.

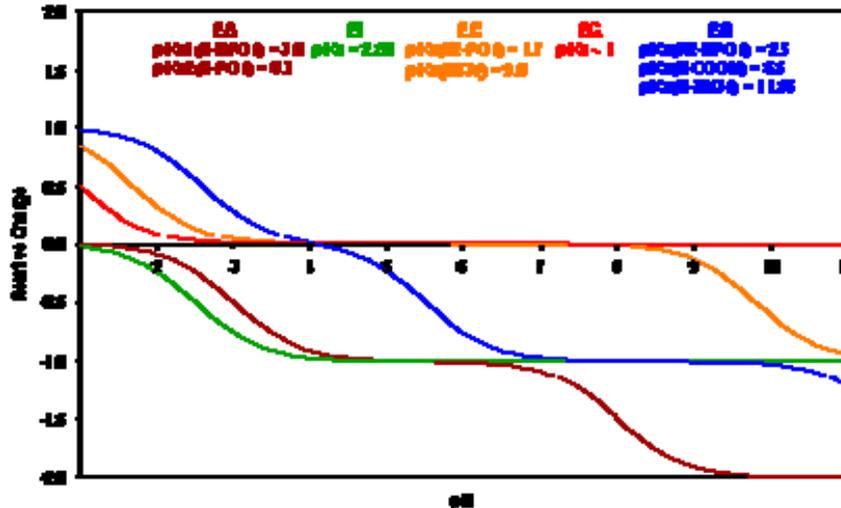


Figure 27. Evolution de la charge relative des PLs en fonction de la variation de pH [3]

De manière plus générale, les queues non polaires de la majorité des phospholipides sont constituées de molécules d'**acides gras** à longues chaînes. Les acides gras varient entre eux selon la longueur de leur chaîne d'atomes de carbone (de 4 à 22) et le nombre de doubles liaisons entre atomes de carbone qu'ils contiennent. A titre d'exemple, l'acide butyrique (C4:0), l'acide palmitique (C16:0) et l'acide arachidique (C20:0) comportent respectivement une chaîne de 4, 16 et 20 atomes de carbone. La plupart des acides gras, comprennent 12 à 24 atomes de carbone (*la nomenclature et la liste d'acides gras les plus courants sont détaillées en annexe*), tandis que dans le milieu vivant, les acides gras composant les phospholipides ont principalement 16 et 18 carbones.

Plus en détail, une des deux chaînes d'acides gras (en général en position *sn-2*) est insaturée. (Fig. 25d). Ainsi, un des phospholipides prédominants dans le milieu vivant serait le POPC (palmitoyl-oléoyl-phosphatidyl-choline, 16:0–18:1 PC) composé d'une chaîne *sn-1* saturée (dérivée de l'acide palmitique, C16:0) et la chaîne *sn-2* insaturée, avec une double liaison (dérivée de l'acide oléique, C18:1) [19,57,78].

De plus, des études sur la distribution des espèces de PC dans le cerveau de rat [1,65] ont identifié le 16:0–18:1 PC comme l'une des espèces les plus abondantes [92]. En effet, plus de 90% de contenu en acides gras insaturés dans la structure des PLs dans les tissus de mammifères a une composition en acides gras contenant majoritairement les acides oléique (18:1n-9), linoléique (18:2n-6), arachidonique (20:4n-6, AA) et docosahexaénoïc (22:6n-3, DHA)* [18,64,108].

B.2.1. Comportement des lipides dans l'eau

Les phospholipides sont des **molécules amphiphiles**, comme la plupart des autres lipides membranaires. Le **pôle hydrophobe** inclut les deux chaînes aliphatiques d'acides gras. On le

* Pour la nomenclature des acides gras voir annexe.

désigne souvent comme une "**queue**" **apolaire** et on le représente schématiquement par des lignes en *zig-zag*. Le **pôle hydrophile** est un ion dipolaire (un **zwitterion**).

Au pH physiologique (pH = 7.41), dans le cas des cholines, le résidu *phosphoryle* est chargé négativement et *l'ammonium quaternaire* de la choline est chargé positivement. Ces groupes interagissent avec l'eau par interactions charge/dipôle et liaisons de hydrogène et rendent compte du caractère hydrophile de la structure à laquelle ils appartiennent. Le pôle hydrophile est souvent désigné comme la **tête polaire** de la molécule, symbolisée par un rond ou un ovale (Fig. 24).

La présence des acides gras insaturés fait que ces lipides ne résistent pas à un milieu oxydant. De plus, en phase aqueuse, les lipides ont une tendance naturelle à adopter plusieurs types de phases et cette propriété est appelée le **polymorphisme** lipidique. Ainsi, l'amphipolarité leur confère des possibilités d'auto-organisation en milieu aqueux et de former spontanément des nombreuses phases de morphologie différentes : micelles, liposomes, bicouches lipidiques etc. (Fig. 28) [52,63]. Toutes ces phases ont en commun la mise en contact des parties hydrophiles avec l'eau tout en empêchant le contact des chaînes hydrophobes avec l'eau [63].

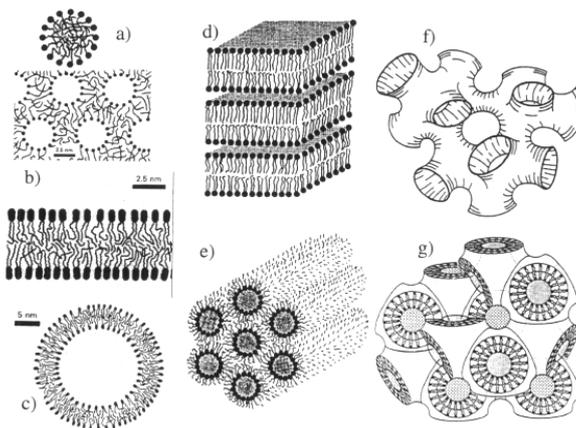


Figure 28. Exemple de phases possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux [90]: (A) micelles et micelles inverses, (B) bicouches, (C) vésicules, (D) phase lamellaire, (E) phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), (F) phase éponge, (G) phase cubique inverse bicontinue.

Les structures que les PLs peuvent former dans un milieu aqueux dépendent de leur organisation supramoléculaire (Fig. 29) et notamment du paramètre d'assemblage (engl. *packing parameter, PP*) :

$$PP = V / a * L_c ,$$

où

- L_c = longueur de la chaîne hydrophobe ;
- a = aire occupée par la tête hydrophile du PLs ;
- V = volume de la partie hydrophobe.

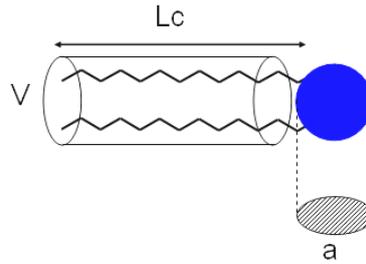


Figure 29. Organisation supramoléculaire des phospholipides (molécules amphiphiles)

Les PLs s'organisent en structures spécifiques dont les deux plus importantes sont les **micelles** et les **bicouches**. La formation de ces structures dépend largement de l'**encombrement stérique** des molécules amphiphiles, c'est à dire de la manière dont elles occupent l'espace tridimensionnel (Fig. 30).

FORMES	P.P.	ASSEMBLAGE	MOLECULES
 Cône (base polaire)	$< \frac{1}{2}$	 Micelle	Acides gras détergents, lysophospholipides
 Cylindre	~ 1	 Bicouche	PC, PE, PS + Ca^{2+}
 Cône tronqué (base polaire)	$\frac{1}{2} - 1$	 Vésicules lamellaires	PC, PS, PI, Sph
 Cône tronqué (base hydrophobe)	> 1	 Micelles inverses	PC, PE (unsat), PS (pH<4)

Figure 30. Types d'assemblages formés par les molécules amphiphiles (détergents, phospholipides)

B.2.2. Propriétés des bicouches phospholipidiques

Plusieurs facteurs peuvent influencer le comportement des lipides dans une membrane lipidique et donc influencer la membrane lipidique elle-même. La température est un facteur important. En effet, chaque lipide pur possède une **température de transition de phase** qui correspond au passage réversible d'un état figé/solide L_β vers un état fluide L_α (Fig. 31) [83].

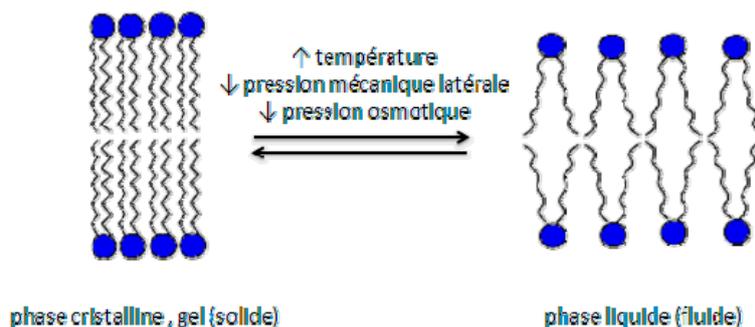


Figure 31. Schéma de la transition de phase d'une bicouche phospholipidique

Le passage de la phase solide à la phase fluide est une transition qui s'effectue à la température de fusion T_m des lipides. Cette température dépend de la longueur des chaînes carbonées ainsi que de leur degré d'insaturation. L'état L_β est favorisé par des chaînes d'acides gras saturées (la température T_m étant alors plus élevée), alors que l'état L_α est favorisé par l'existence d'une ou plusieurs doubles liaisons dans la chaîne carbonée (T_m est alors plus basse). Ainsi, celle-ci varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras [13,15]. Ainsi, les différents phospholipides sont caractérisés par des températures de fusion pouvant aller de -22°C pour la 1,2-dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC, phospholipide avec des chaînes symétriques d'acides gras possédant 18 atomes de carbone et une *insaturation*, 18:1 PC) à environ 45°C pour la 1,2-dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC, phospholipide avec des chaînes symétriques d'acides gras *saturées* et possédant 16 atomes de carbone, 16:0 PC). Contrairement aux phases solides, les chaînes carbonées des lipides en phase fluide sont désordonnées, une plus haute température permettant le passage aisé d'une conformation à une autre et ainsi des mouvements des lipides au sein de la bicouche en phase fluide (Fig. 32).

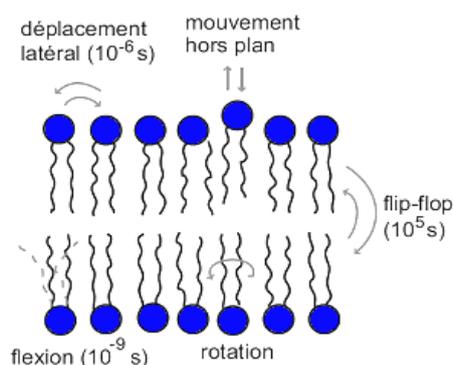


Figure 32. Mouvements des phospholipides au sein d'une bicouche phospholipidique

Concernant ces mouvements des PLs au sein d'une bicouche, on distingue :

- la *diffusion rotationnelle* de la molécule lipidique autour de son axe principal approximativement perpendiculaire au plan de la bicouche (la normale à la bicouche) et l'*oscillation* (ou en anglais "wobble") de cet axe rotationnel ; ces deux mouvements sont caractérisés par des temps de corrélation, de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-11} s.
- la *diffusion latérale* des phospholipides dans le plan de la membrane caractérisée par

un temps de corrélation, de 10^{-6} à 10^{-7} s. Le coefficient de diffusion latérale est de l'ordre de 10^{-7} - 10^{-8} cm²/s [24,76].

- *la diffusion transversale (bascule)* qui est un mouvement extrêmement lent, avec un temps de corrélation de l'ordre de l'heure (voir du jour) selon la nature du phospholipide considéré. En effet, le passage d'un phospholipide d'une couche à l'autre apparaît énergétiquement non favorable puisque la tête polaire hydrophile doit traverser le cœur hydrophobe de la membrane. De plus, cela « casse » la fluidité membranaire. En effet, les PLs ne bougent pas spontanément à travers la bicouche. Ainsi, un mouvement rapide trans-bicouche des phospholipides (phénomène ayant un temps de corrélation de l'ordre des minutes ou moins) se réalise par une médiation protéique, dans un processus dépendant d'énergie [47]. La protéine nécessaire à ce mouvement est la *flipase* (d'où le nom de ce mouvement, qui est aussi appelé *flip-flop*) [16,69,99].

En plus de l'effet **thermique**, **la transition de phase** (Fig. 31) peut être induite par effet :

- **chimique** : l'augmentation de la différence de pression osmotique d'une coté et de l'autre de la couche lipidique favorise la phase cristalline, transition qui augmente la perméabilité de l'eau à travers la bicouche ;
- **mécanique** : l'application d'une pression latérale sur la couche lipidique favorise la phase cristalline (*exp.* la compression latérale d'une monocouche lipidique à la surface de l'eau).

B.2.3. Réaction d'oxydation des lipides

Les principaux facteurs déterminant la durée de vie des lipides sont les **réactions d'oxydation** qui peuvent être classées, selon leur mécanisme (milieu et agent initiateur), en : **auto oxydation** (catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres), **photo oxydation** (initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs) et **oxydation enzymatique** (initiée par la lipoxygénase et la cyclooxygénase) [50].

Les substrats des réactions d'oxydation sont principalement les acides gras insaturés. Ils s'oxydent en général plus vite lorsqu'ils sont libres et plus insaturés. Les acides gras saturés ne s'oxydent qu'à une température supérieure à 60°C, tandis que les acides poly insaturés s'oxydent même lors de l'entreposage des produits à l'état congelé. Le principal problème posé par ces réactions réside dans la formation de composés volatils d'odeur désagréable (**rancissement**) et la formation des **peroxydes** qui sont des molécules cancérigènes.

Au niveau des organismes vivants, il existe de mécanismes naturels de contrôle de l'oxydation afin de prévenir la destruction oxydative des lipides membranaires ou présents dans d'autres structures. La balance entre les facteurs impliqués dans le métabolisme lipidique (réactions d'oxydation) est maintenue par la régularisation *in vivo* réalisée par les systèmes pro-oxydants et ceux anti-oxydants. Le problème principal lié à l'oxydation des lipides est la dégradation de leurs propriétés biochimiques [94].

En présence de l'oxygène (l'air étant un milieu oxydant) les doubles liaisons contenues dans la structure des chaînes acyle constituant les phospholipides se transforment en un cycle oxyrane suite à la fixation d'un atome d'oxygène, puis en présence de l'eau, forme un diol (double groupe -OH), hydrophile, modifiant ainsi le caractère hydrophobe de la chaîne acyle (Fig. 33).

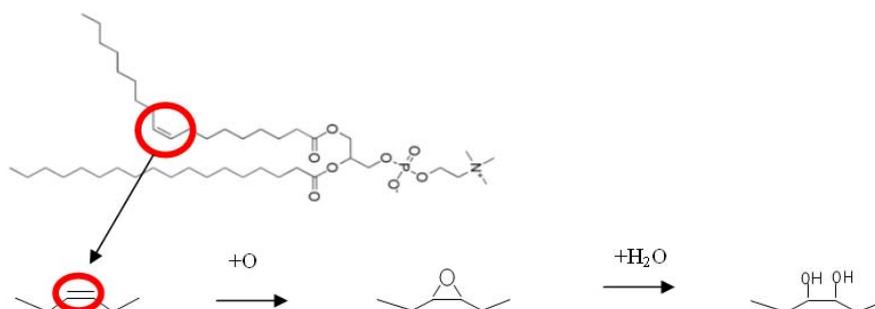


Figure 33. Oxydation des lipides insaturés [22]

En ce qui concerne l'oxydation enzymatique des PLs, la lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé (format les chaînes acyle des PLs) selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés et donc son activité est souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases (Fig. 34).

B.2.4. Action des phospholipases sur les phospholipides

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les PLs [28,71]. Selon le site d'action de l'enzyme au niveau de la structure des phospholipides on distingue (Fig. 34) :

- **Phospholipase A₁**, enlève l'acide gras lié à la fonction alcool primaire du glycérol (position *sn-1*), libérant un acide gras et un lysophospholipide ;
- **Phospholipase A₂**, enlève l'acide gras lié à la fonction alcool secondaire du glycérol (position *sn-2*), libérant un acide gras et un **lysophospholipide** ;

Ainsi, suite à l'action hydrolytique de la PLA₂ sur la PC (Fig. 35) [75], on obtient la lysophosphatidylcholine (LPC), qui joue un rôle important dans l'inflammation [28,88], en agissant comme un facteur chimiotactique sur les sites de l'inflammation et favorisant ainsi la **réaction inflammatoire locale** [88] (Fig. 34). L'enzyme de faible PM (environ 14kDa) a une structure 3D rigide, maintenue par des liaisons bisulfite (-S-S-) [17,57]. Pour son action catalytique, l'enzyme a absolument besoin de la présence de Ca²⁺ [17,101]. La structure de l'enzyme ainsi que le complexe d'interaction au niveau moléculaire entre l'enzyme et le phospholipide sont présentées dans la figure 36;

- **Phospholipase B**, enlève les deux acides gras liés aux fonctions alcool primaire et secondaire du glycérol, libérant deux acides gras et un glycérophosphorylalcool ;
- **Phospholipase C**, intervient sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate, libérant un diglycéride et un phosphoalcool ;

- **Phospholipase D**, lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un phosphatidate et un alcool.

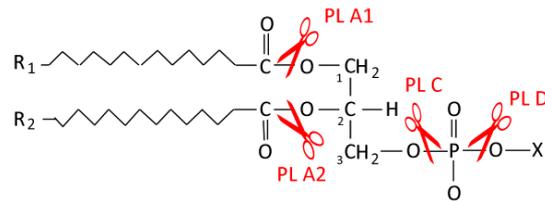


Figure 34. Sites d'action des phospholipases [105]

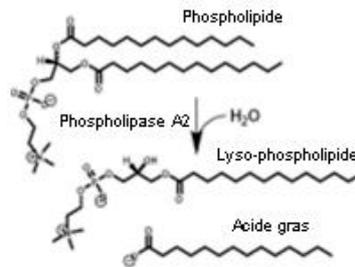


Figure 35. Action oxydative de la PLA₂ sur les phospholipides avec libération d'un lysophospholipide et d'une chaîne d'acide gras [28]

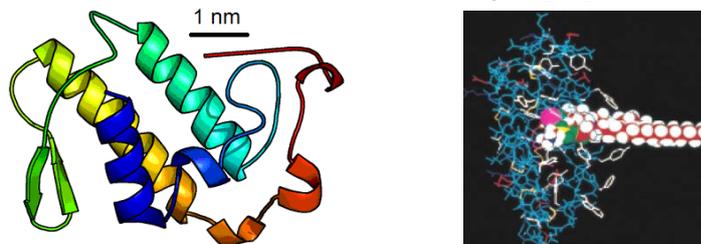


Figure 36. Structure de PLA₂ (gauche) et interactions moléculaires enzyme-PL (droite) [10]

La réaction inflammatoire se caractérise par une augmentation du flux sanguin et de la perméabilité des parois vasculaires, par des migrations cellulaires, par une libération locale de médiateurs et enfin par une phase de résolution. Au cours de ces événements, les médiateurs de l'inflammation libérés (suite à la dégradation enzymatique des produits résultants de l'action des phospholipases sur les PLs) vont agir sur des récepteurs spécifiques. De nombreux travaux [41,58,79] suggèrent que les métabolites de l'acide arachidonique (AA) (eicosanoïdes) comme les prostanoides, les leucotriènes et les lipoxines jouent un rôle important au cours de ces différentes phases de la réaction inflammatoire (Fig. 37).

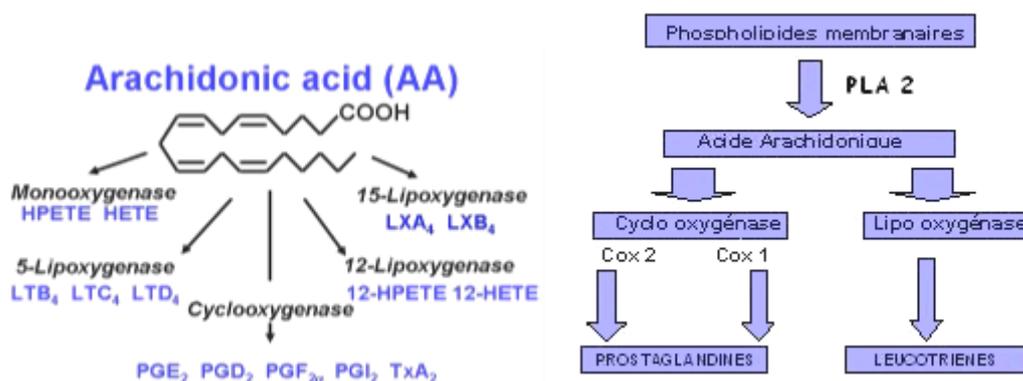


Figure 37. Métabolisme de l'AA vers la libération des marqueurs d'inflammation (LTB₄, HETE) [62]

Les effets biologiques de l'AA sont dus essentiellement à sa conversion en de nombreux métabolites. La libération de ces médiateurs lipidiques varie en fonction du type cellulaire stimulé. Souvent, la synthèse de ces médiateurs nécessite des interactions entre différents types cellulaires. Un type cellulaire peut fournir le substrat qui sera métabolisé par un autre type cellulaire possédant un enzyme spécifique pour la synthèse d'un eicosanoïde. Plusieurs voies métaboliques comme celles des cyclooxygénases ($C_{OX}1$, $C_{OX}2$) et des lipoxygénases sont responsables de la formation de la majorité des eicosanoïdes. A partir de l'acide arachidonique les C_{OX} vont permettre la production de prostaglandines et thromboxane tandis que les lipoxygénases vont synthétiser les leucotriènes, les lipoxines et les acides eicosatétraénoïques (HETE, HPETE). Enfin, ces eicosanoïdes vont activer des récepteurs qui sont pour la plupart clonés, ils peuvent être membranaires, cytosoliques ou nucléaires. Ils ont comme précurseurs l'acide arachidonique, acide gras en C20 avec 4 double liaisons (20:4n-6). L'acide arachidonique est produit après hydrolyse d'un phospholipide membranaire par une phospholipase (PLA_2) (Fig. 37) [26,37,102]. Les médicaments très courants comme l'aspirine ou l'ibuprofène qui ont une action antalgique et anti-inflammatoire agissent sur la production des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique (AA).

Suite à l'action enzymatique de la PLA_2 , en rapport avec les caractéristiques des molécules amphiphiles, les lysophospholipides libérés ont plutôt la tendance à s'associer en micelles (Fig. 30 et Fig. 38) tandis que la chaîne acyle d'acide gras peut elle-même subir des réactions d'oxydation changeant ainsi son caractère hydrophobe vers des propriétés plus hydrophiles (Fig. 33).

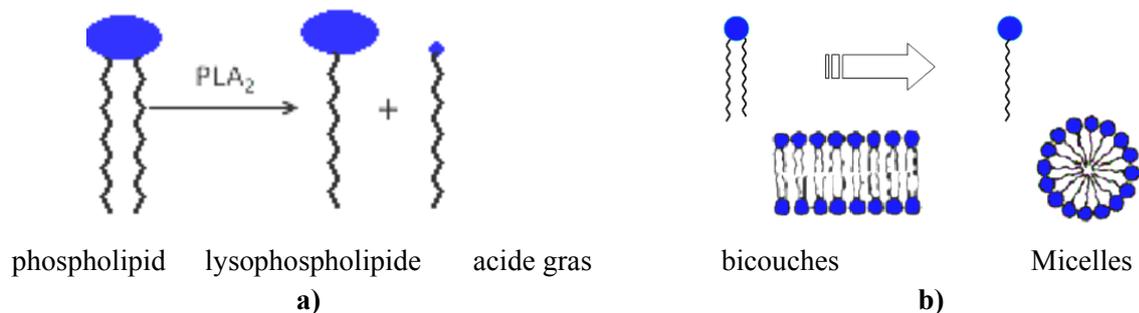


Figure 38. (a) Oxydation enzymatique des PLs et (b) conséquences sur la structure et les assemblages de phospholipides

Dans ce contexte mais surtout dans le cas d'une pathologie favorisant ces réactions, suite aux réactions d'oxydation des phospholipides (enzymatique et milieu oxydant), la structure du FS (Fig. 9) serait modifiée. Par conséquent, suite à l'oxydation des couches lipidiques du FS, celles-ci sont solubilisées dans le milieu aqueux, d'où sa destruction et son inefficacité tribologique lors des pathologies articulaires.

B.3. Analyse des FS pathologiques - Méthodologie

Les recherches de ces dernières années ont émis différentes hypothèses [4,31,42,44,68,73,97] quant à la substance responsable (seule ou ayant une action synergique) de la lubrification au niveau des articulations synoviales, caractérisées par un frottement bas et une usure réduite du cartilage comme nous l'avons expliqué au chapitre A. Parmi ces substances, les interfaces du FS constituées de molécules de phospholipides font l'objet d'études dans le cadre des recherches contenues dans ce manuscrit.

De plus, en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM), Hills avait conclu que la phosphatidylcholine (PC) est le plus abondant phospholipide qu'on trouve sur la surface du cartilage articulaire en y formant des structures empilées. Les phospholipides sont synthétisés au niveau du fluide synovial par les synoviocytes [97].

Comme nous l'avons expliqué au chapitre A, en tant que fluide biologique, le FS est un ultrafiltrat de plasma, concentré à travers la membrane synoviale. Ainsi, c'est l'homéostasie* entre la production des composants de fluide synovial et leur filtration au niveau de la membrane synoviale qui assure le comportement tribologique remarquable des articulations saines : une usure réduite et un frottement très bas au niveau du contact articulaire [60].

Pourtant, dans le cas des pathologies articulaires (l'arthrite, l'arthrose ainsi que le remplacement d'une articulation non fonctionnelle par un implant articulaire) on constate une augmentation du frottement au niveau du contact articulaire ainsi qu'une usure des surfaces de cartilage, accompagnées d'une altération des caractéristiques biochimiques du fluide synovial, notamment de sa composition lipidique.

Dans le cas de l'arthrose, l'usure des cartilages a été corrélée entre autres avec des dysfonctionnements biologiques dus à l'activation de la PLA₂ qui modifie la structure macromoléculaire du fluide synovial en détruisant ses assemblages lipidiques. Cela modifie le comportement mécanique des assemblages lipidiques du FS et par conséquent celui de l'articulation synoviale.

D'autres marqueurs des dysfonctionnements biologiques (ex. les **leucotriènes**[†] comme le LTB₄, les **prostaglandines**[‡] (PGE₂ et PGD₂) et les **acides gras mono hydroxylés** (HETE) dans les cas d'inflammation) ont été identifiés dans l'articulation arthrosique.

* L'**homéostasie** (du grec *homoios* = similaire et *histēmi* = immobile) représente la capacité que peut avoir un système quelconque, ouvert ou fermé, à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures (Initialement élaborée et définie par Claude Bernard) ;

Dans le milieu vivant, « l'**homéostasie** est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie ». (Walter Bradford Cannon), elle est la maintenance de l'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'organisme qui doivent rester relativement constants (glycémie, température, taux de sel dans le sang, etc.).

[†] **Leucotriènes** = le produit de l'action de lipoxigénases sur l'acide arachidonique ; le LTB₄ a un rôle chimiotactique pour les leucocytes sur les sites de l'inflammation.

[‡] **Prostaglandines** = des métabolites de l'acide arachidonique, obtenu à partir de phospholipides membranaires par action de phospholipases ;

Même si les études ont montré que les phospholipides sont les composants majeurs contribuant à la lubrification au niveau du cartilage articulaire [4,33], il n'y a pas beaucoup d'études s'intéressant à la nature des différentes classes de phospholipides présents au niveau des articulations synoviales (liées à la surface du cartilage articulaire ou bien dans la composition du fluide synovial).

L'objectif de cette étude a été donc d'analyser les différentes classes de fluides synoviaux pour identifier les phospholipides présents.

Le principe du protocole appliqué à l'analyse des fluides synoviaux est schématiquement présenté dans la figure 39 [12] (*les détails du protocole expérimental sont présentés dans l'annexe*).

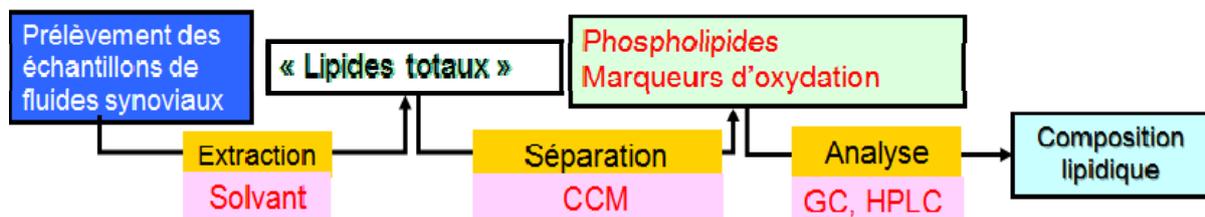


Figure 39. Protocole d'analyse lipidomique appliqué aux échantillons de FS (lipides totaux = quantité totale des lipides présents dans l'échantillon analysé)

*CCM = chromatographie sur couche mince ; GC = chromatographie gazeuse,
HPLC = chromatographie liquide à haute performance*

Ainsi, les lipides dites « totaux » sont extraits puis séparés par une technique chromatographique [5] afin d'obtenir les composants d'intérêt : les phospholipides et les marqueurs d'oxydation caractérisant un état articulaire inflammatoire.

Les lipides sont extraits des échantillons biologiques à l'aide de solvants organiques. Nous avons employé un mélange éthanol/chloroforme (2:1, v/v) et séparé les lipides des résidus non solubilisés par centrifugation.

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

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

échantillons (les différentes classes de PLs) ainsi que leur composition en acides gras (saturés, mono- et poly- insaturés) composant les chaînes acyles.

En complément du profil des phospholipides contenus dans les échantillons du FS analysés, la présence de marqueurs de l'inflammation (LTB₄ et 5-HETE) a été mise en évidence par *chromatographie liquide à haute performance* (HPLC).

Les principes et la description des techniques chromatographiques utilisés dans les protocoles expérimentaux sont présentés en annexe.

B.4. Résultats & discussions

B.4.1. Précautions et limites expérimentales

- A. Il faut souligner dès le début de cette partie présentant les résultats d'analyse lipidomique de différents fluides synoviaux (FS) que, pour ces études, *nous n'avons pas pu avoir accès à des échantillons de FS sains d'origine humaine*, et cela pour deux raisons [89] :
- pour des raisons **d'éthique médicale** ;
 - du fait des **faibles quantités de FS** dans une **articulation synoviale saine**,

Les échantillons de FS pathologiques ont été prélevés au bloc opératoire du Service Orthopédie Adulte d'Hôpital Edouard Herriot – Lyon, avec l'accord préalable des patients et du chirurgien effectuant l'intervention chirurgicale.

Un échantillon de fluide synovial sain *de chien*, obtenu auprès de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL, Lyon), en accord avec les instructions du comité d'éthique pour la protection des animaux et en accord avec la législation CE pour ce type d'étude. Cet échantillon, bien que n'étant pas d'origine humaine, a toutefois été analysé, pour déterminer le profil des phospholipides dans l'hypothèse* qu'il n'y aurait pas de grosses différences au niveau du profil lipidique du fluide synovial [84]. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de *Fuchs et al* [27] qui ont montré que la composition en PLs des FS et du sérum de cheval et chien est comparable à celle des fluides humains (FS, sang), avec une seule différence (entre les résultats pour cheval et ceux pour chien et homme), expliquée par les habitudes alimentaires différentes des uns (herbivores) et des autres (carnivores/omnivores). Dans la littérature, les résultats concernant l'analyse de phospholipides dans les articulations synoviales ont été obtenus suite à des analyses effectuées sur des cartilages bovins ou porcins [35,49]

- B. Certaines **précautions** s'imposent au moment du **prélèvement des échantillons FS** :
- l'utilisation impérative de *réipients en verre*, le plastique risquant de contaminer les

* Il faut faire toujours attention que les échantillons sains et pathologiques analysés soient de la même espèce (*réunion Lipotribo, Jacques Bodennec, Michel Guichardant, Michel Lagarde*) ; la bibliographie indique : « *there is little or no species variability of phospholipid class distribution of organs and most subcellular particulates* » [*G Rouser et al, 1969*].

- prélèvements suite à l'action du chloroforme sur les matériaux polymériques ;
- la *mesure du pH* des échantillons (les arthroses des articulations synoviales se caractérisent par un pH d'environ 8.4 du fluide synovial) ;
 - la *solubilisation du fluide synovial* « sur place » dans des éprouvettes en verre contenant chacune : 1 ml d'échantillon de fluide synovial auquel on ajoute 3 ml éthanol, 0.15 ml de déféroxamine (chélateur des ions de fer, soit 15 μ mol dans la solution) et 0.5 ml de hydroxytoluène butylé (BHT, antioxydant, soit 5mmol dans la solution finale) ;
 - le *transport* des échantillons au laboratoire dans une boîte de glace carbonique (-20°C) ;
 - au laboratoire, la *fermeture sous azote et le stockage à -20°C* jusqu'à la poursuite du protocole expérimental d'extraction et de quantification des lipides.

C. Présence des traces de sang dans les prélèvements

Les prélèvements étant réalisés dans un centre chirurgical pendant différentes interventions chirurgicales au niveau articulaire (par exemple le cas d'une mise en place ou d'un remplacement d'une prothèse), il est quasiment impossible d'obtenir des échantillons de FS **sans traces de sang**.

Pour limiter le plus possible la contamination de l'échantillon par les globules rouges sanguins on ajoute de la *déféroxamine* qui est un agent chélateur* des ions Fe²⁺. Celle-ci permet de limiter le risque de peroxydation† induit par le fer libéré dans le cas d'une hémolyse‡.

De plus, avant de commencer tout protocole d'extraction et de séparation/quantification des lipides dans les échantillons de fluide synovial, une centrifugation (1200g, 10 min, 25°C) permet d'éliminer les cellules en récupérant le surnageant. De plus, cette centrifugation préliminaire indique :

- pour un *surnageant limpide*, l'absence de phénomènes d'hémolyse liés à la présence de traces de sang dans les prélèvements, donc l'absence du risque de peroxydation.
- dans le cas d'un *surnageant rougeâtre* (signe d'une hémolyse) il faut tenir compte de fait que les profils lipidiques obtenus suite aux analyses soient influencés par la peroxydation induit par le fer libéré des globules rouges hémolysés.

L'ignorance de ces aspects pratiques (la contamination d'échantillons avec des lipides contenus dans le sang et surtout l'influence des ions de Fe²⁺ libérés suite à l'hémolyse) pourrait aussi expliquer les profils lipidiques très proches présentés dans la littérature pour les fluides synoviaux pathologiques (arthrosiques) et le sang [7].

* La **chélation** (prononcer *kélassion*, du grec *khêlê* : « pince ») est un processus physico-chimique au cours duquel est formé un complexe, le chélate, entre un ligand, dit chélateur (ou chélatant), et un cation (ou atome) métallique, alors complexé, dit chélaté [<http://fr.wikipedia.org/wiki/Ch%C3%A9lation>].

† La **peroxydation** induit une perte des acides gras polyinsaturés, donc un profil lipidomique modifié par rapport à la réalité *in vivo* [*communication personnelle M. Guichardant*];

‡ L'**hémolyse** = destruction des globules rouges du sang par éclatement (hém- : du grec *haima* - relatif au sang ; lyse : du grec *luisis* - dissolution) [<http://georges.dolisi.free.fr>]

B.4.2. Echantillons analysés

Au cours de cette thèse, deux séries d'analyse lipidomique sur des prélèvements de fluide synoviaux ont été réalisées. Les analyses des phospholipides présents dans les fluides synoviaux (sains et pathologiques) ont été réalisées à l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL), INSA de Lyon sous la coordination de M. Michel Lagarde et de M. Michel Guichardant.

Dans un premier temps, 4 types de prélèvements* de fluides synoviaux pathologiques ont été obtenus et analysés :

- 2 ml de FS suite à l'intervention de reprise d'une prothèse totale de genou (PTG), *noté « AI » (arthrose+implant)*
- 1ml de FS dans le cas d'implantation d'une prothèse dans une articulation de hanche, *noté « ALI » (arthrose localisée + infection locale)* parce que l'articulation était atteinte d'une coxarthrose progressive invalidante accompagnée des signes cliniques d'une infection locale ; ce prélèvement était fortement contaminé par du sang ;
- 4 ml de FS suite à la remise d'une prothèse totale de hanche (PTH), *noté « AL » (arthrose localisée)*;
- 4 ml de FS à l'occasion de la mise en place d'une PTH chez un patient ayant déjà une arthrose « généralisée » (car d'autres prothèses articulaires étaient déjà mises en place), *noté « AG » (arthrose généralisée)* ; 3 échantillons ont été analysés de suite et le 4^{ème} est restée en conservation à -20°C en vue d'une prochaine utilisation.

L'analyse lipidomique de ces échantillons nous a permis :

- de mettre en évidence la présence de marqueurs d'inflammation (le LTB₄ et le 5-HETE) suite à l'action enzymatique de 5-lypoxgénase ;
- d'obtenir une séparation « partielle » des classes de phospholipides (3 bandes de séparation : PC, PE et PI plus le PS) avec une bonne caractérisation par GC de leurs composition en acides gras ;

Ces analyses ont été répétées avec un protocole (P₂) permettant une meilleure séparation de différents phospholipides présents dans les échantillons de FS. Pour cela on a utilisé un mélange de solvants différent par rapport au protocole initial (*détails des protocoles expérimentaux dans l'annexe*).

Ce nouveau protocole expérimental (P₂) a été utilisé pour analyser :

- le 4^{ème} échantillon du prélèvement « AG », conservé à -20°C ;
- 2 échantillons, de 1 ml chacun, correspondants à 2 prélèvements de FS obtenus suite à la mise en place des PTG dans le cas des articulations atteinte d'arthrose, *noté « AL₁ » et respectivement, « AL₂ » (arthrose localisée)*;
- 1 échantillon de 1 ml de fluide synovial de chien, *noté « S » (sain)*, d'ailleurs le seul

* Pour un prélèvement de FS on peut avoir différentes quantités de liquide. Sachant que pour une analyse on utilise un échantillon de 1 ml FS, donc **un prélèvement = 1 ou plusieurs échantillons à analyser.**

échantillon « sain » qu'on a pu avoir, pour les raisons d'éthique médicale énoncées dans le § B4.1.

Malgré cette nouvelle technique, on n'a pas obtenu une séparation complète des classes de PLs étudiées (PC, PE, PI, PS, Sph). En effet, cette fois-ci on a obtenu la séparation de 4 bandes de phospholipides : PC, PE, PS et PI plus Sph. La GC a été maintenue comme technique pour la caractérisation des chaînes acyles (nous permettant de quantifier leur composition en différents acides gras).

Quelles perspectives vers une meilleure séparation des PLs par l'analyse lipidomique des FS sains et pathologiques ?

Dans le cadre du stage d'échange Socrates-Erasmus de Constantin Matei [66], une nouvelle méthodologie de séparation chromatographique des phospholipides contenus dans le FS par une technique de chromatographie **bidimensionnelle** sur couche mince (CCM 2D) a été appliquée, technique qui donne d'excellents résultats de séparation ; ainsi, les différentes classes de phospholipides se sont séparées complètement et on a pu déterminer en utilisant le P_{lip}^* la quantité d'un phospholipide donné par rapport aux phospholipides totaux contenus dans l'échantillon analysé (*détails sur cette méthode de séparation et quantification des phospholipides dans l'annexe*). Le seul *inconvenient* de cette technique de séparation par CCM est qu'il faudrait l'adapter de façon qu'elle puisse permettre un couplage avec la transmethylation des PLs séparées sur plaque afin d'aboutir à une analyse par GC des chaînes acyles pour chaque PL identifié et encore plus, arriver à appliquer une technique permettant une identification des espèces moléculaires (cet à dire, savoir quelle type de chaînes acyles se trouvent en position *sn-1* et respectivement *sn-2* pour un PL donné).

B.4.3. Synthèse de résultats

B.4.3.1. Présence des lipides médiateurs de l'inflammation

L'infiltration des leucocytes au niveau de l'articulation atteinte d'un état pathologique entraîne la formation de leucotriènes et en particulier de leucotriènes B₄ (LTB₄) formé à partir de l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6). Ce dernier est libéré par l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) lors de l'inflammation et est converti par l'enzyme 5-lipoxygénase en leucotriènes et en acides gras monohydroxylés, en particulier en acide 15-hydroxy-eicosatétraénoïque (5-HETE) (fig. 37).

Le LTB₄ et le 5-HETE ont été extraits du fluide synovial, puis mis en évidence par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). *A noter que la présence de ces marqueurs a été mise en évidence **uniquement** dans le cas des prélèvements de FS pathologique.* Ainsi, leur présence dans les échantillons de FS pathologiques analysés est

* P_{lip} = phosphore lipidique (la quantité de phosphore présente dans un PL donné) sachant que : $M_{PL} \approx 27 * M_{P_{lip}}$

indiquée par l'obtention sur le chromatogramme (Fig. 40) des pics d'absorbance spécifique (270 nm pour le LTB₄ et 235 nm pour 5-HETE).

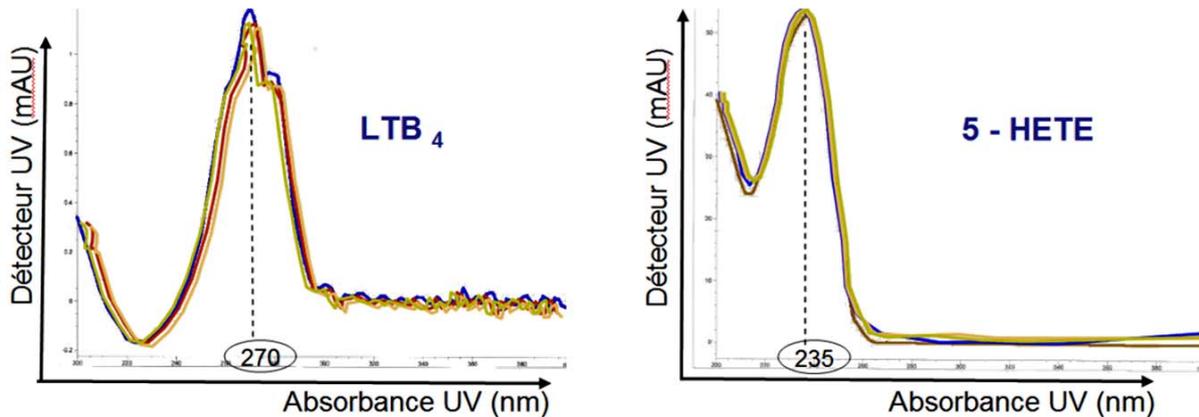


Figure 40. Présence des médiateurs lipidiques d'inflammation (LTB₄ & 5-HETE) dans les FS pathologiques analysés (technique d'analyse : HPLC, pics caractéristiques d'adsorption)

Ces deux marqueurs spécifiques pour une réaction inflammatoire caractérisant un état « pathologique » local ont été validés dans de nombreux autres modèles inflammatoires [9,33,39]. Dans ce contexte, l'analyse de la présence de ces marqueurs dans le cas d'une articulation implantée, permettrait par exemple de déterminer dans les études cliniques si la prothèse est bien acceptée par l'organisme du patient.

De plus, ces marqueurs pourraient aussi être utilisés pour vérifier l'efficacité de divers médicaments anti-inflammatoires. Ceux-ci ont pour rôle principal de « bloquer » le métabolisme de l'acide arachidonique libéré suite à l'action de PLA₂ sur les phospholipides, vers la synthèse *in vivo* des produits « pro-inflammation » de type leucotriènes [36] et ainsi limiter l'évolution de la pathologie.

B.4.3.2. Profil et composition des phospholipides

L'analyse des profils et de la composition de différents types de phospholipides présents dans les FS analysés a permis à la fois une analyse :

- **quantitative** (composition en nano moles et % pour différents phospholipides)
- **qualitative** (% des acides gras saturés/non saturés* constituant les chaînes acyles des phospholipides).

A. Calcul des erreurs

Comme cela a été décrit, on a eu accès à un nombre limité de prélèvements d'échantillons de FS. Cela fait que le nombre des échantillons disponibles pour l'analyse d'un même prélèvement[†] a varié : on a eu des prélèvements pour lesquels on a pu faire plusieurs analyses et des cas où seulement 1 ml de FS a pu être prélevé, donc un seul échantillon à analyser (voir §B.4.2). Cela a été dû d'un côté à la quantité relative réduite de FS présente en général dans la

* Les résultats pour les acides gras non saturés présenteront de manière distincte les « mono » et les « poly insaturés »

† Pour chaque analyse complète du profil des phospholipides on doit utiliser 1 ml de FS.

cavité articulaire et de l'autre à l'obtention de l'accord de l'équipe chirurgicale et du consentement du patient pour effectuer ces prélèvements.

Dans ce contexte, le nombre limité d'échantillons analysés ne nous a pas permis de faire une évaluation « statistique » de l'erreur au niveau des résultats.

Néanmoins, pour une meilleure perception des résultats obtenus, il est indispensable d'évaluer de manière objective *l'erreur relative* intervenue dans les calculs effectués. Pour ce faire, on a utilisé *plusieurs critères de calcul et d'évaluation* de la reproductibilité de la méthode employée dans ces analyses:

- on a calculé l'erreur relative pour les prélèvements « AL » et « AG ».

Le choix de ces deux prélèvements est dû au fait que ceux-ci sont considérés comme étant « proches » par rapport à plusieurs critères (le prélèvement, la maladie, le protocole d'analyse, le nombre suffisant d'échantillons) ;

On a calculé la **valeur moyenne** ($\langle x \rangle$) ainsi que l'**écart type** (σ) pour les résultats d'analyse de différents types d'acides gras composant les chaînes acyles des 2 types de phospholipides (PE et PC) qu'on a pu séparés par CCM en appliquant le premier protocole d'analyse pour chaque prélèvement (4 échantillons « AL » et les 3 échantillons « AG »).

Ensuite, l'**incertitude relative** (**% erreur** = $\sigma(x) / \langle x \rangle * 100$) a été calculé, ce qui permettra par la suite la représentation des résultats sous la forme $x = \langle x \rangle \pm \%$, où % est l'erreur relative pour ces expérimentations. Pour le prélèvement « AL » de FS on a pu déterminer une **erreur relative moyenne d'environ 8%**, respectivement 6% pour les calculs concernant le contenu en PE et 10% pour l'analyse de contenu en PC (Tableaux 4 et 5).

De la même façon on a calculé l'**erreur relative** correspondants aux résultats obtenus suite aux analyses d'échantillons du prélèvement « AG » : 13% pour le contenu en PE et 12% pour le contenu en PC (Tableaux 6 et 7).

- on a calculé une erreur relative en rapportant les résultats concernant le contenu en acides gras de PC et PE pour le cas de ces deux prélèvements (« AL » et « AG »).

Pour le calcul d'erreur relative (Tableau 8) caractérisant les résultats obtenus pour ces deux prélèvements de FS (à savoir « AL » et « AG ») on a utilisé les formules :

$$\frac{|\langle x \rangle_{AL} - \langle x \rangle_{AG}|}{\langle x \rangle_{AG}} \times 100, \text{ pour l'erreur relative « AL » en rapport avec « AG » (AL/AG),}$$

$$\frac{|\langle x \rangle_{AG} - \langle x \rangle_{AL}|}{\langle x \rangle_{AL}} \times 100, \text{ pour l'erreur relative « AG » en rapport avec « AL » (AG/AL),}$$

où $\langle x \rangle_{AL}$ et $\langle x \rangle_{AG}$ représentent les valeurs moyennes calculées pour le cas de différents acides gras composants les chaînes acyles de PE et PC pour les deux prélèvements analysés,

respectivement « AL » et « AG ».

Tableau 4. Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PE (prélèvement « AL »)

%mol = quantité des AG en moles déterminée suite calcul des spectres GC.

G*	% mol				Moyenne <x>	SD <σ>	incertitude relative %	moyenne %
	ech 1	ech 2	ech 3	ech 4				
16:0	13,1	12,1	12,81	11,73	12,43	0,63	5,08	6,07
16:1	0,56	0,52	0,54	0,53	0,54	0,02	3,15	
18:0	13,54	12,6	12,68	12,87	12,92	0,43	3,3	
18:1n-9	13,61	12	14,35	12,11	13,02	1,15	8,84	
18:2n-6	6,29	6,1	5,84	6,03	6,07	0,18	3,04	
20:1n-9	0,32	0,3	0,34	0,26	0,3	0,04	11,72	
20:3n-6	1,34	1,4	1,24	1,29	1,32	0,07	5,09	
20:4n-6	23,96	24,7	25,52	23,7	24,47	0,82	3,34	
20:5n-3	0,74	0,6	0,68	0,6	0,66	0,07	10,89	
22:4n-6	4,32	4,5	4,97	5,33	4,78	0,46	9,57	
22:5n-3	2,7	2,5	2,58	2,38	2,54	0,13	5,27	
22:6n-3	6,65	6,2	6,41	6,16	6,35	0,22	3,52	

* détails sur la nomenclature des AG dans l'annexe ;

Tableau 5. Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PC (prélèvement « AL »)

AG*	% mol				Moyenne <x>	SD <σ>	incertitude relative %	moyenne %
	ech 1	ech 2	ech 3	ech 4				
16:0	34,14	33,12	31,48	30,79	32,38	1,53	4,72	9,93
16:1	1,33	1,47	1,11	1,6	1,38	0,21	15,07	
18:0	13,71	12,73	15,73	13,86	14,01	1,25	8,95	
18:1n-9	14,52	15,35	13,07	14,07	14,25	0,95	6,65	
18:2n-6	16,83	17,61	15,76	16,17	16,59	0,81	4,87	
20:1n-9	0,23	0,2	0,22	0,24	0,22	0,02	6,97	
20:3n-6	3,61	3,73	3,95	4,04	3,83	0,2	5,17	
20:4n-6	9,55	8,89	11,68	11,85	10,49	1,5	14,25	
20:5n-3	0,39	0,37	0,32	0,35	0,36	0,03	7,95	
22:4n-6	0,62	0,48	0,51	0,67	0,57	0,09	15,98	
22:5n-3	0,63	0,49	0,72	0,74	0,65	0,11	17,81	
22:6n-3	2,37	2,14	2,69	2,68	2,47	0,27	10,78	

* détails sur la nomenclature des AG dans l'annexe

Tableau 6. Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PE (prélèvement « AG »)

AG*	% mol			Moyenne <x>	SD <σ>	incertitude relative %	moyenne %
	ech 1	ech 2	ech 3				
16:0	9,5	9,68	9,5	9,57	0,1	1	13.12
16:1	0,6	0,64	0,6	0,62	0,02	3,34	
18:0	11	12,75	11,6	11,77	0,91	7,7	
18:1n-9	11,6	12,54	12,9	12,35	0,67	5,44	
18:2n-6	7,9	7,34	6,84	7,37	0,54	7,34	
20:1n-9	0,2	0,15	0,5	0,3	0,18	60,41	
20:3n-6	1,3	1,24	0,9	1,14	0,2	18	
20:4n-6	21,7	21,36	24,5	22,52	1,73	7,66	
20:5n-3	1	0,96	0,9	0,96	0,06	5,84	
22:4n-6	4,4	4,35	5,38	4,7	0,59	12,61	
22:5n-3	2,7	2,29	3	2,66	0,36	13,45	
22:6n-3	6,7	5,13	5,4	5,74	0,84	14,68	

* détails sur la nomenclature des AG dans l'annexe

Tableau 7. Calcul de l'erreur relative - analyse de contenu en PC (prélèvement « AG »)

AG*	% mol PC - prelevement AG			Moyenne <x>	SD <σ>	incertitude relative %	moyenne %
	ech 1	ech 2	ech 3				
16:0	25,34	27,25	27,02	26,54	1,04	3,93	11.66
16:1	0,98	1,03	0,81	0,94	0,11	12,15	
18:0	14,24	12,62	14,32	13,73	0,96	6,98	
18:1n-9	14,88	18,68	16,14	16,57	1,94	11,69	
18:2n-6	22,53	20,47	20,08	21,03	1,32	6,27	
20:1n-9	0,34	0,31	0,2	0,28	0,07	25,83	
20:3n-6	3,99	4,21	3,52	3,91	0,35	8,97	
20:4n-6	8,82	7,2	9,46	8,49	1,16	13,7	
20:5n-3	0,69	0,72	0,75	0,72	0,03	4,07	
22:4n-6	0,75	0,62	0,64	0,67	0,07	10,6	
22:5n-3	0,77	0,56	0,8	0,71	0,13	18,41	
22:6n-3	3,18	2,37	3,33	2,96	0,51	17,38	

* détails sur la nomenclature des AG dans l'annexe

Tableau 8. Calcul de l'erreur relative des prélèvements analysés

AG*	PE AL	PE AG	erreur relative % (AL/AG)	erreur relative % (AG/AL)	PC AL	PC AG	erreur relative % (AL/AG)	erreur relative % (AG/AL)
	<x>	<x>			<x>	<x>		
16:0	12,43	9,57	29,89	23,01	32,38	26,54	22	18,04
16:1	0,54	0,62	12,9	14,81	1,38	0,94	46,81	31,88
18:0	12,92	11,77	9,77	8,9	14,01	13,73	2,04	2
18:1n-9	13,02	12,35	5,43	5,15	14,25	16,57	14	16,28
18:2n-6	6,07	7,37	17,64	21,42	16,59	21,03	21,11	26,76
20:1n-9	0,3	0,3	0	0	0,22	0,28	21,43	27,27
20:3n-6	1,32	1,14	15,79	13,64	3,83	3,91	2,05	2,09
20:4n-6	24,47	22,52	8,66	7,97	10,49	8,49	23,56	19,07
20:5n-3	0,66	0,96	31,25	45,45	0,36	0,72	0	0
22:4n-6	4,78	4,7	1,7	1,67	0,57	0,67	14,93	17,54
22:5n-3	2,54	2,66	4,51	4,72	0,65	0,71	8,45	9,23
22:6n-3	6,35	5,74	10,63	9,61	2,47	2,96	16,55	19,84
Moyenne			12,35	13,03			16,08	15,83
Erreur Globale			14,32					

* détails sur la nomenclature des AG dans l'annexe

Dans ce contexte, les résultats obtenus seront présentés dorénavant en utilisant une barre d'erreur correspondant à 12% (moyenne de toutes les erreurs relatives calculées dans les tableaux 4 à 8).

Vu que les analyses lipidomiques ont été réalisées par le même opérateur, dans le même laboratoire de recherche, employant la même méthodologie, on peut supposer que pour les autres échantillons analysés (des fois 1 seul, donc pas de possibilité de calculer l'erreur) l'erreur resterait du même ordre de grandeur.

Pour valider cette hypothèse :

- on a comparé les résultats obtenus suite à l'analyse lipidomique des échantillons provenant de même prélèvement en utilisant deux protocoles de séparation différentes avant l'analyse par GC

Cette démarche a été possible pour le cas du prélèvement « AG » dont on a eu plusieurs échantillons disponibles pour l'analyse (voir §B.4.2). Les analyses de la composition en acides gras des chaînes de PLs ont été effectuées suite à la séparation par CCM de différentes classes de PLs contenues dans les échantillons par deux protocoles différentes (en ce qui concerne le mélange d'éluant de séparation utilisé), P₁ et respectivement P₂ (*détails des protocoles dans l'annexe*).

Les valeurs moyennes <x>, correspondants aux calculs de quantités (% mol) de différents acides gras composants les chaînes acyles des phospholipides de type PE et PC séparés dans

les échantillons analysés du prélèvement « AG », sont présentées de manière synthétique dans le tableau 9 et comparative dans la figure 41.

Tableau 9. Prélèvement « AG » : vue comparative de la composition en acides gras (% mol) des phospholipides de type PC et PE obtenue suite à application de deux protocoles de séparation chromatographique sur couche mince (P₁ & P₂)

AG*	<x> PE		<x> PC	
	P1	P2	P1	P2
16:0	9,57	14,81	26,54	28,35
16:1	0,62	2,02	0,94	0,97
18:0	11,77	10,84	13,73	15,26
18:1n-9	12,35	14,63	16,57	15,66
18:2n-6	7,37	7,45	21,03	19,6
20:1n-9	0,3	0,45	0,28	0,18
20:3n-6	1,14	0,76	3,91	2,69
20:4n-6	22,52	18,62	8,49	7,15
20:5n-3	0,96	1,12	0,72	0,53
22:4n-6	4,7	6,23	0,67	0,41
22:5n-3	2,66	1,75	0,71	0,34
22:6n-3	5,74	5,21	2,96	2,51

* détails sur la nomenclature des AG dans l'annexe

Ces résultats montrent que la technique de séparation chromatographique sur couche mince (CCM) n'influence pas de manière significative la quantification avec l'analyse GC (nous permettant de déterminer la composition en acides gras des chaînes acyle pour les différents groupes de phospholipides séparés qui sont présents dans les échantillons de FS analysés). Ainsi, les valeurs similaires obtenues (sauf pour le cas de 16:1 PE, Tableau 9) en utilisant les deux protocoles de séparation, indiquent une fois de plus que l'utilisation de deux techniques de séparation différentes ne devrait pas influencer les résultats finaux, ce changement ayant pour seul objectif une meilleure séparation des PLs sur la plaque de CCM.

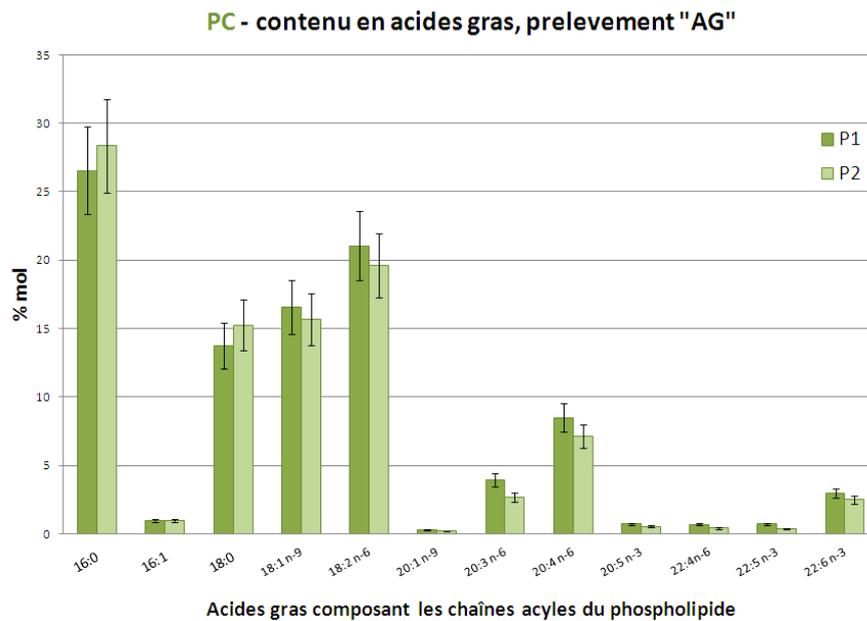
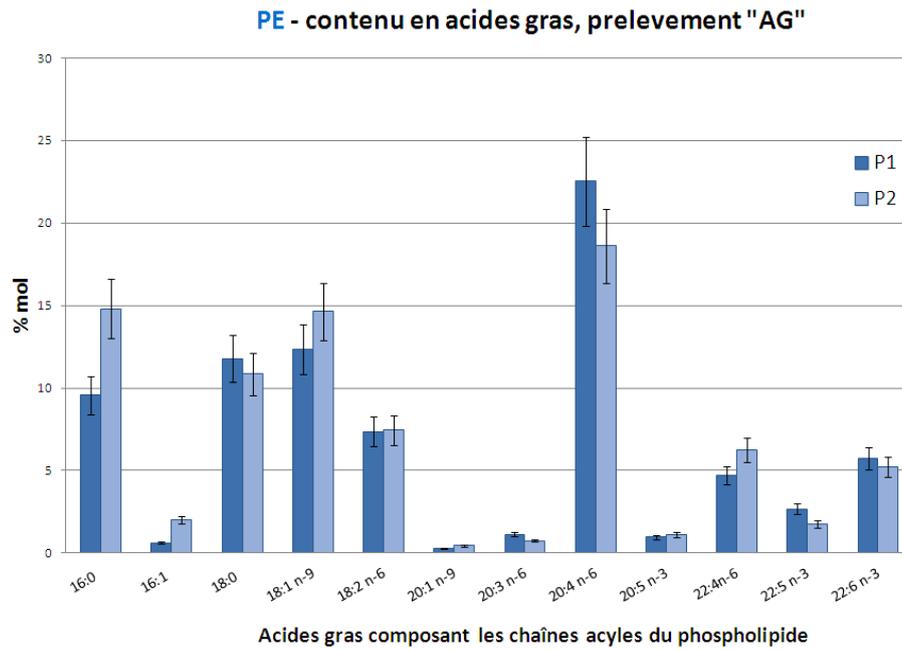


Figure 41. Représentation comparative des résultats d'analyse du contenu en acides gras des chaînes acyles pour PE (en haut) et PC (en bas), obtenus en utilisant deux protocoles de séparation (P₁ et P₂) pour le prélèvement « AG »

B. Composition en phospholipides des échantillons analysés

La composition en phospholipides (nanomoles et % par rapport à la quantité de phospholipides totaux, PLT) de différents échantillons de FS (sain et pathologiques) analysés a été déterminée par une analyse lipidomique **quantitative**.

De manière synthétique, les résultats sont présentés dans les figures 42 et 43. Ces résultats représentent la moyenne générale qui tient compte des valeurs obtenues dans les deux campagnes d'analyse effectuées pour les échantillons de FS et de l'erreur calculée.

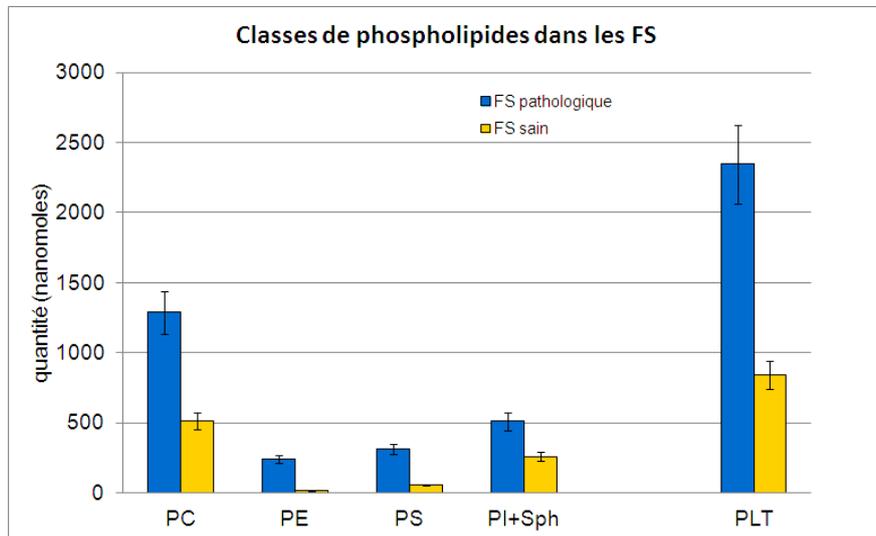


Figure 42. Analyse quantitative (nanomoles) des FS sains et pathologiques. PLT = phospholipides totaux, barres d'erreurs à 12%.

Les résultats dans la figure 43 indiquent la présence d'une quantité plus grande de phospholipides dans les échantillons de FS pathologiques comparatif à celle déterminée pour le FS sain (colonne des résultats « PLT » indiquant la quantité globale de phospholipides déterminés dans les échantillons analysés, pour un même volume de 1ml).

En rapportant la quantité de chaque type de PLs à la quantité totale déterminée (PLT), on obtient le profil quantitatif (en %) de différentes classes de phospholipides décellées dans les échantillons analysés (Fig. 44).

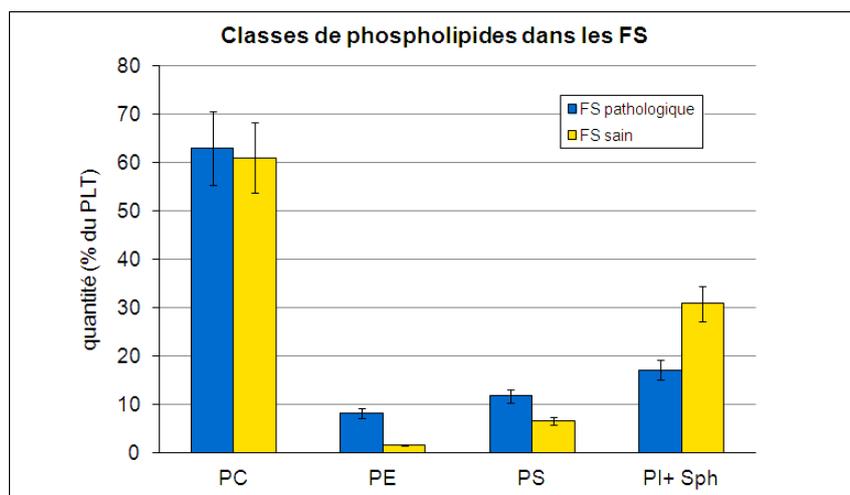


Figure 43. Quantités (en % par rapport aux PLT) des phospholipides contenus dans les FS sains et pathologiques ; PLT = phospholipides totaux, barres d'erreurs à 12%

Les résultats présentés dans les figures 43 et 44 indiquent:

- une différence nette entre le contenu en PE et PS du FS sain et celui pathologique, notamment une quantité très basse de PE et de PS pour le cas du FS sain. Comme le PS est un marqueur de processus d'apoptose*, ceci explique sa présence en quantité plus grande dans les FS pathologiques.
- le PC est le phospholipide prédominant dans les échantillons de FS analysées, que celui-ci soit sain ou pathologique, mais en quantité plus élevée dans ceux pathologiques.

Comme mentionné dans le paragraphe §B.4.2. *Methodologie*, le protocole de séparation par CCM des PLT ne nous a pas permis d'obtenir une séparation complète de différentes classes de PLs sur la plaque chromatographique, ce qui fait que le contenu en PI et Sph est représenté comme l'ensemble des deux dans l'analyse des résultats (Fig. 42 et Fig. 43). Ce contenu PI+Sph est plus important dans le cas sain.

Dans ce contexte, plus récemment [66] un nouveau protocole d'analyse a été utilisé, qui permet la séparation de différentes classes de phospholipides par une CCM en 2D [6]. En utilisant ce protocole on a analysé 3 échantillons : 2 ml d'un FS pathologique, prélevé à l'occasion d'une intervention chirurgicale pour la mise en place d'une prothèse suite à une arthrose avancée et 1 ml de FS sain de chien (les mêmes types de prélèvements que ceux analysés par le protocole présenté auparavant).

Les résultats (% de phospholipides par rapport à la quantité de PLT) sont présentés dans la figure 44.

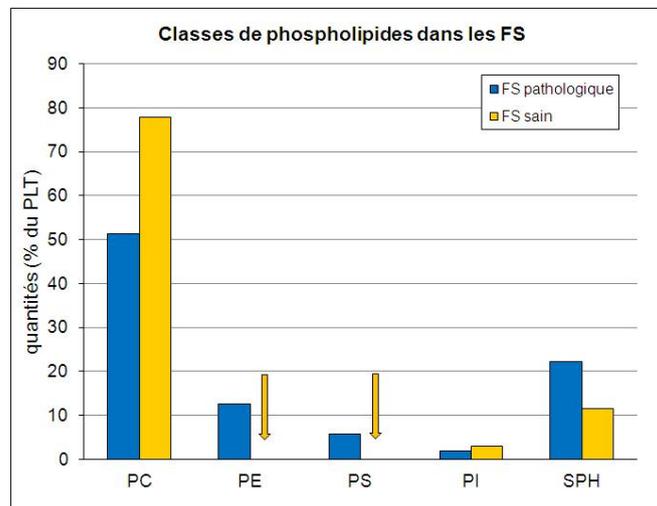


Figure 44. Profil des phospholipides (% par rapport aux PLT) contenus dans le FS sain et pathologique analysés suite à une séparation CCM 2D [66]; *PLT = phospholipides totaux*. Les flèches indiquent l'absence dans les échantillons étudiés d'une quantité quantifiable par la méthode utilisée, pour le contenu en PE et PS de FS sain

* **L'apoptose** implique une altération de la membrane plasmique de sorte que la PS, présent normalement dans la couche interne de la membrane, s'externalise par translocation au niveau de la bicouche lipidique, ce qui crée des complexes de surface reconnus par les macrophages qui initialisent ainsi la phagocytose (Fadok VA et al, Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblast, J Biol Chem, 276, 1071-1077, 2001 ; Domingues MRM, Reis A, Domingues P, Mass spectroscopy analysis of oxidized lipids, Chemistry and Physics of lipids, 156, 2008, 1-12)

En analysant ces résultats (Fig. 45) on constate la séparation de toutes les classes de phospholipides (PE, PC, PS, PI, Sph) ; par contre, en comparant avec les résultats présentés dans la figure 44, on constate l'absence de PE et de PS pour le FS sain (flèches jaunes dans la Fig. 44) [66], tandis que l'autre méthode utilisée a permis de mettre en évidence (bien qu'en quantités très faibles) la présence de ces phospholipides dans le FS sain. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que lorsque le protocole expérimental a été appliqué (*voir détails en annexe*) il a été utilisé une quantité « insuffisante » de FS sain par rapport aux conditions limites imposées par la technique, ce qui a fait que les spots correspondant à ces phospholipides n'ont pas été mises en évidence suite à la séparation par CCM 2D [2].

De plus, le nombre insuffisant d'échantillons utilisés pour ce protocole expérimental n'a pas permis de calculer une erreur. Par contre les résultats obtenus encouragent une application future de cette technique en vue de la très bonne séparation des phospholipides par CCM 2D. Par contre, ce protocole devra être amélioré, afin qu'il permette un couplage avec l'analyse en GC des chaînes acyles des phospholipides séparés. Ceci est en effet un des objectifs de la thèse en cours concernant l'analyse de la composition et de la structure des fluides synoviaux pathologiques en vue de proposer des traitements ciblés pour différentes pathologies articulaires [67]

En ce qui concerne les quantités de phospholipides déterminées pour le cas des FS pathologique, en gardant à l'esprit que ces échantillons ont été prélevés durant différentes interventions chirurgicales (ce qui suppose la présence du sang dans le prélèvement), on serait amené à supposer que les quantités élevées de phospholipides dans ces échantillons seraient dues à leur contamination par les lipides présentes dans le sang contaminant. Par contre, dans la littérature [7] on mentionne que le profil en phospholipide des FS pathologiques est très proche de celui du sang. En effet, lors de l'évolution pathologique articulaire, l'accentuation de la réaction inflammatoire locale détermine une augmentation de la diffusion à travers la membrane synoviale [8,14,38,85,96,100] ce qui explique un profil lipidique du FS proche du sanguin (Fig. 45).

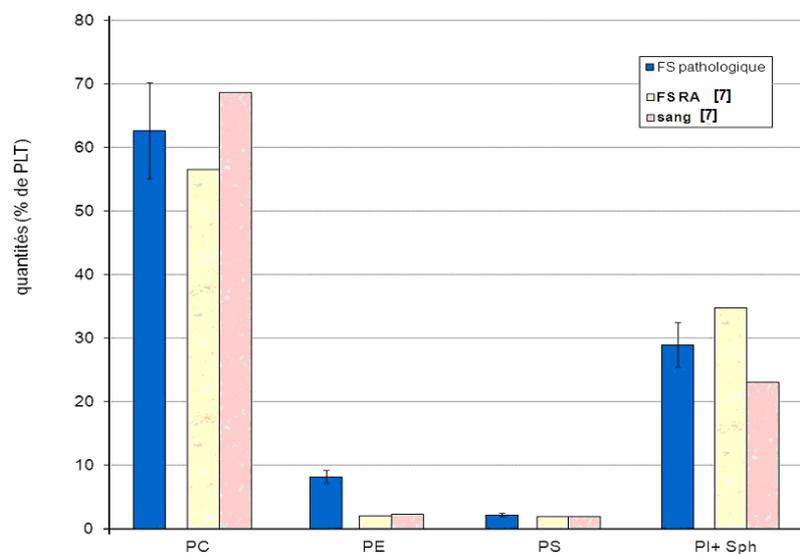


Figure 45. Comparatif des résultats (% de PLT) pour les FS pathologiques analysés et les résultats de la bibliographie (pour le FS pathologique et le sang, [7]).

BILAN :

A travers l'analyse des profils des phospholipides présents dans les FS analysés on a pu remarquer que mise à part la quantité plus grande de phospholipides dans le cas pathologique, leur profil phospholipidique est similaire (FS sain et pathologique).

Partant des résultats obtenus suite aux différentes analyses effectuées, on peut considérer un **profil de phospholipides des FS pathologiques** comprenant environ **60% PC, 8% PE, 12% PS et 20% PI+ Sph**. Cette composition a été utilisée par la suite dans le modèle tribologique articulaire *ex vivo* pathologique (*partie C*), afin de permettre (à l'aide des essais de frottement) d'étudier le rôle de différents types de phospholipides caractérisant les FS pathologiques dans le fonctionnement tribologique articulaire, en fonction du pH du milieu lubrifiant et en présence des enzymes caractérisant ces pathologies articulaires.

C. Composition en acides gras des chaînes acyles des PLs dans les FS analysés

Dans cette section nous allons présenter l'analyse du profil en acides gras (saturés et non-saturés), des chaînes acyles composant les différentes classes de phospholipides présentes dans les FS analysés.

Dans le **tableau 10**, les résultats présentent une comparaison de la variation de la composition en acides gras (% mol) des chaînes acyles saturées et insaturées des PLs contenus dans les FS sains et pathologiques analysés :

- **pour le cas de FS sain:**
 - o les AG saturés sont plus abondants (~60%, dont les principaux sont l'acide palmitique (16:0, ~25%) et l'acide stéarique (18:0, 34%), considérés comme les acides gras saturés naturels les plus abondants [34]), tandis que dans le cas des FS pathologiques analysés on a environ 44% AG saturés, dont ~25% d'acide palmitique (16:0) ;
 - o les **AG insaturés** sont plus abondants dans les FS pathologiques (~57 % dont, 24% mono-insaturés et 33% poly-insaturés) tandis que dans le cas du FS sain on ~40% d'AG insaturés, dont beaucoup moins d'AG mono-insaturés (~9%) et une quantité similaire d'AG poly-insaturés (~31%). Le plus abondant AG insaturé contenue dans les FS pathologiques est l'acide oléique (18:1, ~20%).
- **pour le cas de FS pathologique** on obtient en moyenne une quantité plus grande d'acides gras insaturés (~57%, dont 24% mono-insaturés et 33% poly-insaturés) par rapport à ceux saturés (~44%) ;
 - o le plus abondant acide gras saturé est l'acide palmitique (16:0), ~25% en moyenne,
 - o pour les acides gras (AG) insaturés on distingue :
 - Le plus abondant « mono-insaturé » est l'acide oléique (18:1), ~20 % en moyenne ;
 - Le plus abondant des AG « poly-insaturés » est l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6), ~14% en moyenne, précurseur des prostaglandines et autres marqueurs d'inflammation,
 - En quantités importantes on trouve aussi l'acide linoléique (LA, 18:2n-6), ~10% en moyenne et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6n-3), ~3% en moyenne.

Tableau 10. Variation de la composition en acides gras (% mol) des chaînes acyle des PLs contenus dans les FS sain et pathologiques analysés

Acides gras (AG)*	FS pathologiques	FS sain
12:0	0,00	0,00
14:0	1,01	1,16
16:0	24,73	25,28
18:0	16,53	33,77
20:0	0,27	0,00
22:0	0,67	0,00
24:0	0,23	0,00
Σ saturés	43,45	60,20
16:1	1,16	0,00
18:1 n-9	20,65	8,61
18:1 n-7	0,00	0,00
20:1 n-9	0,16	0,00
22:1	0,03	0,00
24:1 n-9	1,58	0,00
Σ mono-insaturés	23,58	8,61
18:2 n-6	9,86	11,81
20:2n-6	0,00	0,00
22:2n-6	0,00	0,00
18:3 n-6	0,00	0,00
18:3 n-3	0,13	0,00
20:3n-9	0,00	0,00
20:3 n-6	1,65	0,69
20:4 n-6	13,56	14,05
20:5 n-3	0,33	0,00
22:4n-6	3,19	0,66
22:5n-6	1,12	2,31
22:5 n-3	0,00	0,00
22:6 n-3	3,13	1,66
Σ poly-insaturés	32,97	31,19
TOTAL SATURES	43	60
TOTAL INSATURES	57	40

* détails sur la nomenclature des AG dans l'annexe

BILAN

Les AG insaturés augmentent dans les pathologies : les acides oléique (18:1) et linoléique (C18:2) sont les plus abondants dans la totalité des acides gras. Le rapport % des AG polyinsaturés/monoinsaturés/saturés, de 33/23/44 pour les FS pathologiques et de 31/8/60 pour le FS sain, nous permet de déterminer le rapport « saturés/insaturés », d'environ 0.78 (FS pathologique) et respectivement 1,5 (FS sain) ce qui indique une augmentation des insaturés dans le cas des FS pathologiques.

Les résultats obtenus indiquent aussi la présence en quantité importante de l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) dans le FS des articulations synoviales atteintes de divers pathologies, ce qui expliquerait l'augmentation de la synthèse d'eicosanoïdes au niveau des chondrocytes sachant que l'AA est le substrat pour l'activité des phospholipases et des oxygénases [64].

B.4.4. Discussions

Le rôle des SAPLs insaturés a commencé à être étudié récemment [11, 103] et on a pu mettre en évidence que, contrairement au surfactant pulmonaire (où le DPPC est l'espèce SAPL prédominante, les autres lubrifiants dans le corps humain (donc y compris le FS présent dans les articulations synoviales) contiennent principalement des SAPLs insaturés [43,70].

Pourtant, une analyse très complète des espèces moléculaires composant les SAPLs des lubrifiants biologiques n'a pas encore été réalisée dans la littérature, mis à part les études de Sarma [86], qui essaya de déterminer les quantités de différentes classes de PLs indirectement à partir du contenu en acides gras des échantillons analysés. Les résultats de l'étude de Sarma suggèrent fortement que le PC insaturé pourrait être l'espèce prédominante de PL dans l'articulation synoviale.

En utilisant les techniques de l'analyse lipidomique, nos objectifs étaient de déterminer :

- la présence des marqueurs d'oxydation/d'action enzymatique (LTB₄ et HETE) dans le FS pathologiques analysés ;
- les quantités de différentes classes de phospholipides (PC, PE, PI, PS, Sph) présentes dans les FS sain et pathologiques analysés (profil en nanomoles et % de PLT) ;
- la composition en acides gras (saturés et mono – et poly – insaturés) des chaînes acyles des phospholipides (profil %).

Pour se faire on a utilisé :

- la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour mettre en évidence les médiateurs lipidiques de l'inflammation présents dans le fluide synovial (LTB₄, HETE).
- la séparation des classes de PLs par chromatographie sur couche mince (CCM) et leur analyse par chromatographie gazeuse (GC). Les résultats qu'on a obtenu ont montré que les multicouches lipidiques présentes dans le FS sain sont plutôt en phase solide

(60 % saturées et 40% insaturées, dont majoritairement des phosphatidylcholines (PC), environ 60% des PLT), tandis que pour les FS pathologiques les PLs sont plutôt en phase fluide (43% saturés et 57% insaturés) avec le PC comme classe prédominante (> 60% de PLT).

En accord avec ce qui a été présenté dans le paragraphe « *action des enzymes sur les phospholipides* » (voir aussi fig. 38), la présence de ces marqueurs (résultants des réactions d'oxydation enzymatique des phospholipides contenus dans le FS) peut être aussi un indicateur du possible changement de la structure du FS par rapport à l'état sain du fait de la réorganisation des structures lipidiques résultantes en fonction de l'évolution locale de la pathologie (Fig. 46).

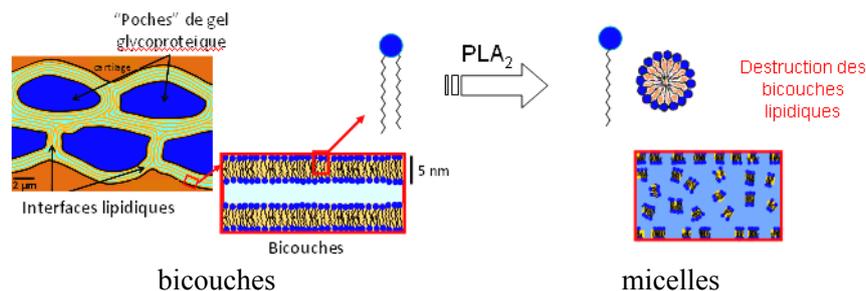


Figure 46. Modification de la structure et de l'organisation des interfaces phospholipidiques du FS suite à l'action de la PLA₂ sur les bicouches lipidiques

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux présentés dans la littérature [104], dont ceux de Chen *et al.* [54,107] qui ont montré que les PC insaturés sont les plus abondants sur la surface des cartilages articulaires par rapport aux espèces saturées. Indépendamment de leur degré de saturation, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre A, les SAPLs sont des « bons » lubrifiants, réduisant fortement les coefficients de frottement au niveau du contact articulaire [45-46,54].

Alors que le FS sain contient de petites quantités de PLs, le FS pathologique contient des quantités nettement accrues de phospholipides, en accord avec la bibliographie [7,80-81,93].

Le profil de répartition des acides gras à partir d'extraits de lipides totaux montre que les acides gras prédominants sont : l'acide palmitique (16:0) pour les AG saturés, puis, l'acide oléique (18:1) et les acides linoléique (18:2), arachidonique (20:4) et docosahéxaénoïque (22:6) pour les AG (poly-) insaturés. Ces acides représentant dans l'ensemble environ 70 % de la teneur en acides gras totaux des PLT déterminés dans les échantillons de FS analysés.

Les résultats de la quantification des acides gras des phospholipides, en tenant compte que :

- le PC est le plus abondant des PL déterminé dans les échantillons analysés ;
- l'acide palmitique (16:0) est le plus abondant acide gras saturé dans les échantillons analysés, le plus souvent en position *sn-1* des PLs [27] ;
- dans le milieu vivant on a en général des phospholipides composés d'un acide gras saturé en position *sn-1* et l'autre insaturé en position *sn-2*.

on peut considérer comme phospholipides prédominantes présentes dans les FS analysés (en accord avec les travaux de Hulbert *et al.* [49]) : le DPPC (16:0/16:0) ; le DOPC (18:1/18:1), le PLPC (16:0/18:2), le POPC (16:0/18:1), le PAPC (16:0/20:4) et le PDHAPC (16:0/22:6), dont les structures sont détaillées dans la figure 47.

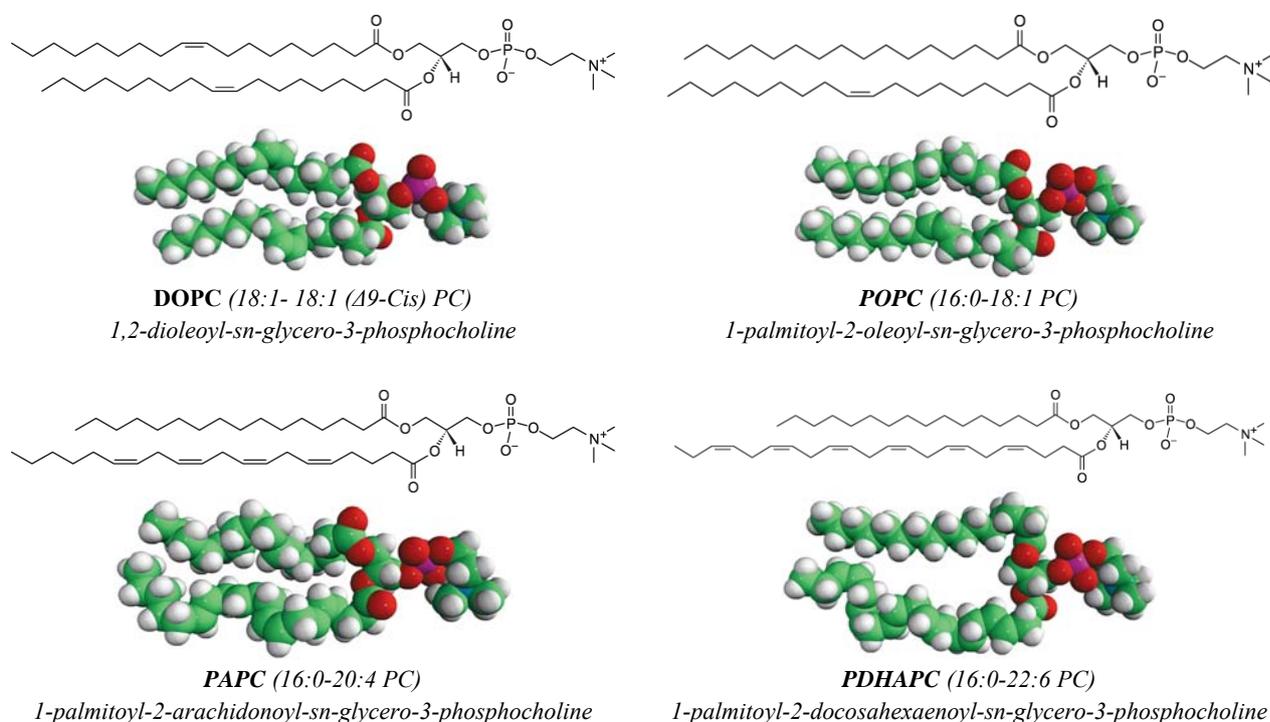
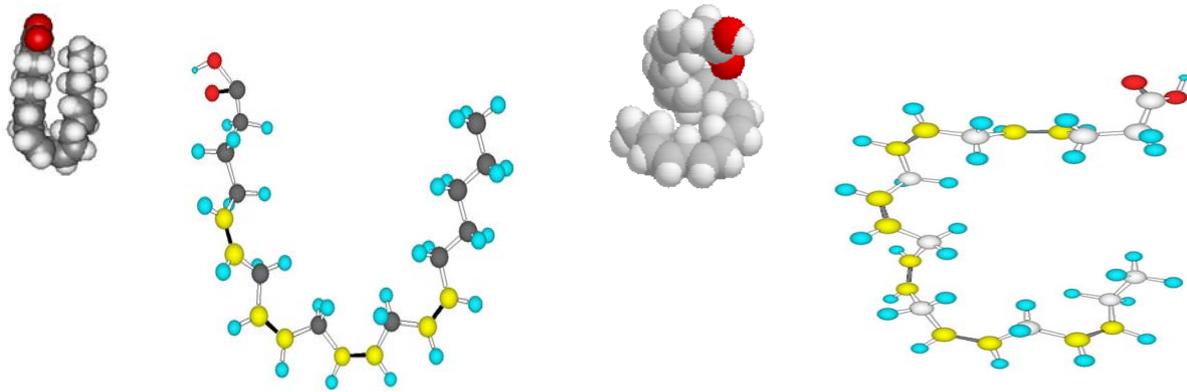


Figure 47. Types de phospholipides qui peuvent être prédominants dans les FS analysés (structures moléculaires d’après *Avanti Polar Lipids*)

D’un point de vue conformationnel, les plus « intéressants » de ces phospholipides sont ceux contenant en position *sn*-2 les acides gras AA (20:4n-6) et DHA (22:6n-3), des acides gras poly-insaturés qui contiennent respectivement 4 et 6 doubles liaisons C=C, en conformation « *cis* », ce qui leur confère un profil 3D de type « tire-bouchon » au niveau des « queues » phospholipidiques (Fig. 48). Cette conformation pourrait certainement avoir une influence sur le comportement tribologique des bicouches contenant ce type de PL (Fig.49).

Des études expérimentales et numériques [20,23,25,51] ont montré que la chaîne acyle de **DHA** est extrêmement flexible, caractérisée par un degré élevé de « désordre moléculaire » et a la possibilité de faire des changements très rapides entre divers états conformationnels. Cela est dû à une barrière d’énergie réduite pour l’isomérisation de rotation autour des liaisons simples C-C qui séparent les atomes de carbones insaturés dans la structure des acides gras de type poly-insaturés (AGPI*).

* AGPI = acides gras poly insaturés (exp. DHA, 22:6n-3 ; AA, 20:4n-6) [*Thèse Ping CHEN, 2009*]



Acide arachidonique (AA, 20:4n-6)

Acide docosahéaénoïque (DHA, 22-6n-3)

Figure 48. Structure des acides gras poly-insaturés contenus dans les PLs des FS analysés

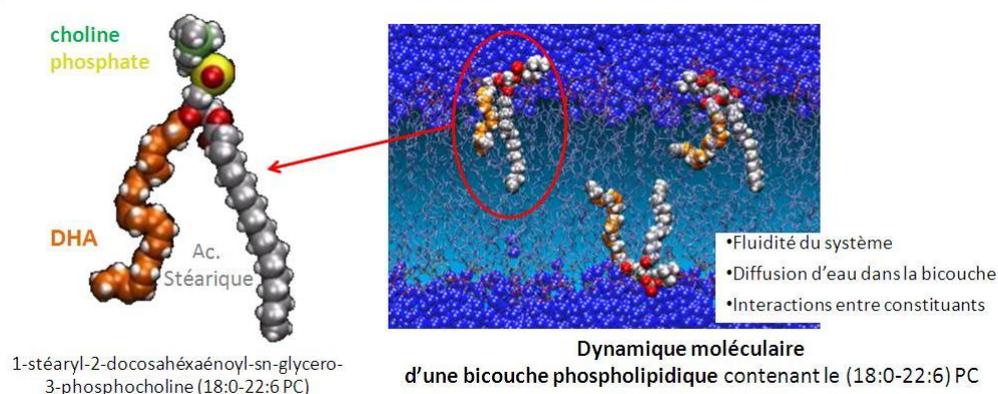


Figure 49. Présence d'un phospholipide contenant le DHA (22 :6) dans une bicouche lipidique – effet sur ses propriétés (d'après [32])

En raison de cette flexibilité la chaîne insaturée peut réorganiser sa position dans la monocouche dans une plus large mesure qu'une chaîne saturée et à la fois des données expérimentales et simulées montrent que le DHA peut même atteindre les régions polaires/apolaire cadre de l'interface de la membrane [20].

De plus, l'ordre conformationnel de la chaîne saturée adjacente (en position *sn-1*) est réduit par la présence de l'AGPI dans la position *sn-2* de la structure lipidique. Ainsi, l'ensemble des propriétés des membranes (la température de transition de phase – T_m , la dynamique des lipides, le comportement des phases lipidiques, la compressibilité élastique, la perméabilité, la fusion, et le flip-flop etc. sont influencées par l'introduction d'AGPI de type DHA dans les membranes modèles utilisés pour divers études [95].

B.5. Conclusions

Plusieurs causes des pathologies articulaires sont liées à la structure et le rôle du fluide synovial dans le fonctionnement articulaire. Comme présenté dans la partie A, le fluide synovial a une structure complexe qui fait apparaître des interfaces phospholipidiques au niveau de l'interface cartilage articulaire-fluide synovial.

Donc, les causes précoces de l'usure de la surface du cartilage articulaire sont liées à la perturbation des interfaces phospholipidiques. Cette perturbation implique l'évolution biochimique des composants et de la structure d'interfaces phospholipidiques que l'on a étudiée à l'aide de l'analyse lipidomique. Ainsi, en utilisant les techniques de l'analyse lipidomique, pour des FS sains et pathologiques, on a mis en évidence :

- les quantités de différentes classes de phospholipides (PC, PE, PI, PS, Sph). Les résultats montrent que le PC est le phospholipide prédominant,
- le contenu en acides gras (saturés et mono – et poly – insaturés). Les résultats obtenus montrent que les chaînes acyles insaturés des phospholipides (donc en phase fluide) sont les plus abondantes dans le cas de FS pathologiques,
- l'action enzymatique inflammatoire sur les structures phospholipidiques, qui a été étudiée pour l'identification de la présence des marqueurs (LTB₄ et HETE) d'action enzymatique de la PLA₂ dans le cas des pathologies et des conséquences de cette action : formation de lyso-PC. Les résultats obtenus montrent la présence du lyso-PC et de LTB₄ et HETE dans la composition des FS pathologiques analysés.

Ainsi, connaître la composition en phospholipides des FS pathologiques et leur comportement suite à l'action des enzymes caractérisant les pathologies articulaires nous permet la reproduction par des bicouches phospholipidiques dans le modèle tribologique *ex vivo* des articulations synoviales (détails dans la *Partie C*) afin d'étudier l'évolution tribologique des bicouches dans des conditions similaires à celles caractérisant les articulations et le FS pathologique :

- des variations de la composition et des propriétés des phospholipides, en termes de composition chimique de la tête polaire, des chaînes acyle composant les « queues » phospholipidiques,
- de l'action d'enzymes sur les molécules de phospholipides ce qui génère la destruction d'assemblages lipidiques contenus dans les FS.

La synthèse de tous ces paramètres est présentée dans la figure 50.

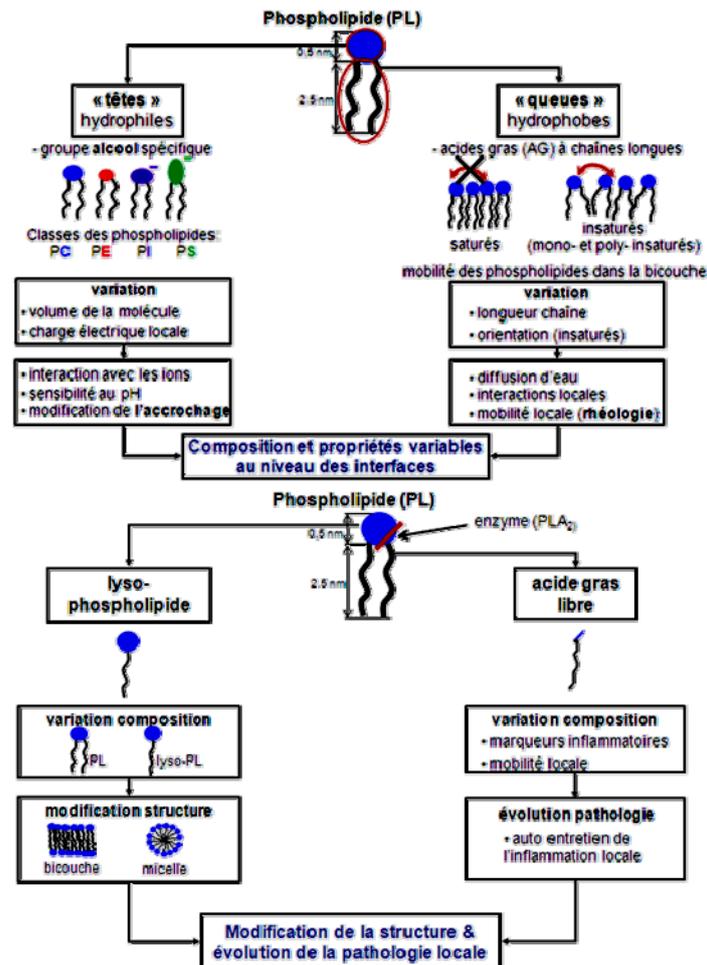


Figure 50. Schéma synthétique concernant la composition, la structure et les propriétés des phospholipides

Coté perspectives, afin d'améliorer la méthodologie appliquée pour l'analyse lipidomique des FS pathologiques il serait nécessaire est important de faire attention :

- au **stockage** des prélèvements (car il peut intervenir un processus d'oxydation des espèces moléculaires poly-insaturés suite à un stockage prolongé [109] (détails dans *l'annexe concernant le stockage et la péremption des lipides*),
- à une éventuelle **contamination des échantillons** par le **développement des bactéries** lors du stockage ; pour éviter, il est indiqué de rajouter dans les échantillons à analyser un agent antibactérien de type *sodium azide** (concentration 0.02 à 0,3%wt, [48,87]) ;
- à un éventuel **perfectionnement des protocoles de dosage** et surtout, dans la mesure de possible, d'utiliser dans les analyses des FS issues des cultures cellulaires de synoviocytes de type surnageants [67], évitant ainsi les contaminations du sang, inévitables dans le cadre d'un prélèvement d'échantillons intra opératoire.

Pour compléter les résultats obtenus, il serait souhaitable de développer le protocole d'analyse lipidomique afin de prévoir :

- le dosage [56] et l'étude de l'influence du **cholestérol** dans les assemblages de FS, surtout son

* Le "sodium azide" est un réactif utile, mutagène, et conservateur. Dans les hôpitaux et les laboratoires, il est un biocide, il est particulièrement important dans les réactifs « en vrac » et les solutions stock qui peut si les conditions de stockage sont favorables, soutenir la croissance bactérienne, où le « sodium azide » agit comme un bactériostatique par inhibition de la cytochrome oxydase dans les bactéries gram-négatives; à savoir que les bacteries Gram-positives (streptocoques, pneumocoques, lactobacilles) sont résistants à l'action de sodium azide, une caractéristique similaire à la résistance aux antibiotiques (http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_azide#Biochemistry_and_biomedical_uses)

influence sur la mobilité/fluidité des bicouches mono- et bi- insaturées [53] ;

- le dosage des espèces « lyso- » des phospholipides contenues dans les FS pathologiques ; ces molécules sont des vrais « détergents naturels » qui déterminent des modifications dans la structure des FS lors de pathologies articulaires suite à l'action de différentes enzymes et à l'inflammation locale.
- d'analyses détaillées des compositions lipidiques, en principal en ce qui concerne les espèces moléculaires individuelles en plus d'une composition en acides gras des chaînes acyle des phospholipides, à l'aide d'une analyse ESI-MS (electrospray ionisation mass spectroscopy [78]).

De plus, la littérature indique des profils similaires pour le plasma et le FS*, ce qui encourage à faire cliniquement plutôt une évaluation du profil des PLs en utilisant le plasma à la place du FS, car les échantillons de plasma sont plus accessibles et permettent d'avoir des prélèvements en quantités suffisantes afin de faire les analyses [28].

* « body fluids provide very similar results for PC/LPC ratio (...). Earlier studies have also evidenced that the LPC content of a given body fluid is an important disease marker and correlates with the severity of disease and may also reflect the success of therapy » (*Fuchs et al, 2005*) :

Partie C.

Partie expérimentale – Comportement tribologique des interfaces phospholipidiques pathologiques

Comme nous l'avons discuté dans la partie A, des études récentes ont mis en évidence la présence des bicouches lipidiques adsorbées sur les surfaces frottantes des cartilages articulaires et dans le volume du fluide synovial (FS). Comme montré dans la partie B, les composants majoritaires de ces bicouches sont les **phospholipides**. Ceci a généré dernièrement plusieurs études qui considèrent que les bicouches lipidiques jouent un rôle dans la lubrification des articulations et la réduction des forces de frottement entre les surfaces biologiques [19,29,30,33,44,45].

L'objectif des travaux de cette partie a été l'étude du comportement tribologique des interfaces phospholipidiques modèles et plus particulièrement leur rôle dans la biolubrification articulaire saine / pathologique.

Pour se faire, nous avons étudié conjointement la **stabilité mécanique** des bicouches phospholipidiques supportées à travers leur résistance à l'indentation de la pointe AFM (thèse Fairouz Dekkiche, 2011) et le **comportement tribologique**, plus particulièrement leur influence sur l'accommodation de la vitesse et leur capacité de maintenir un coefficient de frottement faible et stable au niveau du contact pendant le frottement.

Pour ce faire, cette partie du travail de recherche comprend 4 sous parties:

1. **l'adaptation du modèle tribologique** ex vivo du cas sain (antérieurement mis au point [49]) pour le cas des pathologies articulaires, afin d'étudier le rôle des interfaces phospholipidiques dans la lubrification pathologique ;
2. **l'influence sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques** :
 - a. de la **variation des paramètres mécaniques** : la rugosité de la surface ;
 - b. de la **variation des caractéristiques physico-chimiques** (stabilité, variation du pH et de la concentration ionique) du milieu aqueux présent entre les bicouches lipidiques ;
 - c. des **caractéristiques biologiques des interfaces pathologiques** (composition chimique et comportement sous l'action des enzymes).

C1. ADAPTATION DU MODELE TRIBOLOGIQUE EX VIVO DU CAS SAIN POUR L'ETUDE DES PATHOLOGIES ARTICULAIRE	83
C1.1. Choix des corps en contact (1 ^{ers} corps).....	84
C1.2. Choix du lubrifiant (3 ^{ème} corps).....	85
C1.2.1. Lubrifiant - Interfaces phospholipidiques.....	86
C1.2.1.1. Méthodes générales pour la formation des bicouches phospholipidiques ...	87
C1.2.1.2. Caractérisation des interfaces phospholipidiques	89

C1.2.2. Lubrifiant – la couche aqueuse	100
C1.3. Choix du mécanisme tribologique – dispositif expérimental	101
C1.4. Discussions et conclusions	106
C2. EFFET DE LA RUGOSITE DU SUBSTRAT SUR LES PROPRIETES TRIBOLOGIQUES DES BICOUCHES LIPIDIQUES	107
C2.1. Rugosité « macroscopique » de la surface de 1 ^{er} corps	107
C2.2. Rugosité « moléculaire » des interfaces phospholipidiques	112
C2.3. Discussions et conclusions	115
C3. SIMULATION DES MODIFICATIONS PHYSICO-CHIMIQUES ASSOCIEES AUX PATHOLOGIES ...	116
C3.1. Paramètres expérimentaux étudiés.....	116
C3.2. Milieu tamponné (solution buffer).....	116
C3.3. Résultats.....	118
C3.3.1. Piégeage ou non de la couche aqueuse par les bicouches lipidiques	118
C3.3.2. Rôle du milieu tampon (stabilisateur du pH) et de la présence des ions	121
C3.3.3. Rôle du type de molécule tampon.....	125
C3.3.4. Rôle de la variation du pH (dans un même type de milieu tamponné).....	128
C3.4. Discussions et conclusions	130
C4. SIMULATIONS DES MODIFICATIONS BIOLOGIQUES ASSOCIEES AUX PATHOLOGIES	133
C4.1. Paramètres expérimentaux étudiés.....	133
C4.2. Influence de la variation en composition chimique des « têtes » phospholipidiques pathologiques	133
C4.3. Action des enzymes	136
C4.4. Discussions et conclusions	141
C5. CONCLUSIONS.....	143

C1. Adaptation du modèle tribologique *ex vivo* du cas sain pour l'étude des pathologies articulaire

Tout d'abord il est indispensable de revenir aux détails du modèle tribologique *ex vivo* (initialement conçu pour le cas « sain » [47,49]) qui se doit de reproduire les principaux caractéristiques du *triplet tribologique* d'une articulation synoviale.

Les recherches récentes ont montré que les études sur le fonctionnement des articulations synoviales (qu'elles soient saines, pathologiques ou bien remplacées par un implant articulaire) doivent être réalisées *ex vivo* avec beaucoup de prudence à cause des spécificités et des interactions biologiques, physico-chimiques et tribologiques qui caractérisent le fonctionnement articulaire *in vivo*. Ainsi :

- du point de vue **biologique**, les résultats des études expérimentales employant des tissus vivants dépendent spécifiquement des propriétés physico-chimiques du milieu où ces essais sont réalisés.
- du point du vue **tribologique**, le comportement d'un contact (vivant ou pas), dépend à la fois des propriétés du système mécanique qui le soutient et des propriétés des matériaux en contact.

Par conséquent, une étude tribologique *ex vivo* réaliste doit prendre en compte l'ensemble du triplet tribologique [4] constitué du *mécanisme* (qui impose les sollicitations locales), des *1^{er} corps* (qui forment le contact) et du *3^{ème} corps* qui sépare les premiers corps. Les éléments du triplet tribologique pour le cas d'une articulation synoviale (saine et respectivement atteinte de pathologies tel que l'arthrite ou l'arthrose) sont présentés dans la figure 51.

On y distingue les deux *premiers corps* représentés par les surfaces du cartilage articulaire (arthritique ou arthrosique en cas de pathologie articulaire) et le *troisième corps* constitué par le fluide synovial. Pour que le triplet tribologique soit complet, il faut tenir compte aussi du système musculo-ligamentaire (non représenté dans ces schémas) qui joue le rôle de *mécanisme*. Le choix des composants du triplet tribologique articulaire sera détaillé par la suite.

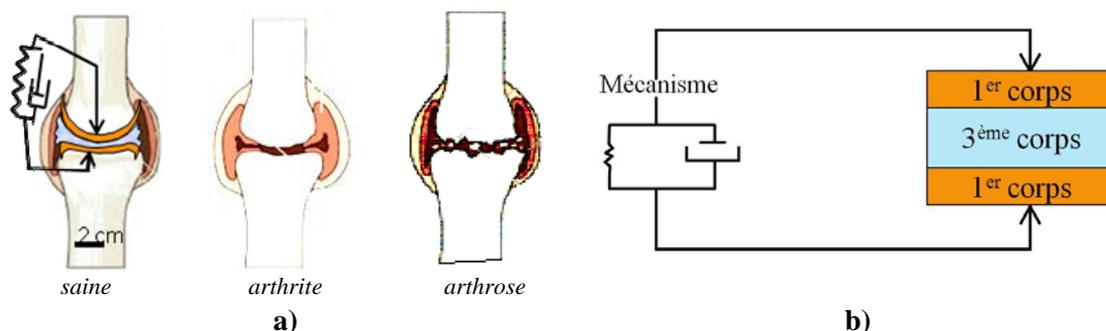


Figure 51. Articulation synoviale : (a) coupe anatomique ; (b) triplet tribologique articulaire

C1.1. Choix des corps en contact (1^{ers} corps)

Afin de visualiser *in situ* le contact lors des essais de frottement nous permettant l'étude du comportement tribologique des interfaces phospholipidiques pathologiques, nous avons été emmenés à utiliser deux types de premiers corps dans le modèle *ex vivo* :

1. un matériau modèle pour le cartilage articulaire ;
2. une contre face en verre transparent.

C1.1.1. Modèle *ex vivo* pour le cartilage articulaire [7,8,20,49]

Comme déjà indiqué dans la section §A.3.2., pour simuler les propriétés mécaniques du cartilage articulaire, notre choix s'est porté sur l'hydrogel HEMA. Ainsi, les premiers corps utilisés comme modèles sont des ébauches des lentilles cornéennes en HEMA (*Corneal Industrie*) hydratées 48h avant utilisation dans les essais tribologiques visant l'étude de différents paramètres caractérisant l'évolution des pathologies articulaires. La rugosité de la surface frottante de la lentille HEMA est très faible (quelques nanomètres RMS) [49].

NB : il faut faire attention au milieu d'hydratation de HEMA (car ce matériaux change ses propriétés mécaniques une fois laissé pour 48 heures dans un milieu aqueux donné).

C1.1.2. Verre borosilicate

Afin d'assurer la visualisation *in situ* du contact pendant les essais de frottement, on a utilisé une contre face transparente en verre borosilicate (*Pignat*, Vaulx-en-Velin, France et *CVI Melles Griot*, Voisins Le Bretonneaux, France).

Avant leur utilisation dans les essais tribologiques effectués, les plans de verre sont d'abord lavés grossièrement à la main puis immergés dans un mélange d'eau ultra pure et d'un savon spécifique au verre (Microson, Fisher-Bioblock, France) dans une cuve à ultrasons à 60°C pendant 20 minutes. L'eau ultra pure utilisée est obtenue par osmose inversée (système Millipore Direct- QTM3) et passée à travers un filtre de 0,22µm. Sa résistivité est de 18,2 MΩ.cm. Les surfaces sont ensuite rincées à l'eau ultra pure pendant 5 minutes, et nettoyées à nouveau pendant 20 minutes aux ultrasons à 60°C dans le détergent. La même procédure est répétée avec l'eau ultra pure. Les plans en verre sont rincés pendant 5 minutes à l'eau ultra pure et ensuite sont gardés dans l'eau ultra pure pour éviter toute possible contamination des surfaces avec diverses impuretés. Pour cela, nous contrôlons systématiquement la propreté du plan par une observation directe du front de démouillage de l'eau sur la surface. Si la surface est propre, le front est droit et régulier. En présence de défauts (ou impuretés), le front s'y accroche. De telles surfaces ne seront pas utilisées dans nos expériences en état, mais seulement si l'application à nouveau de la procédure de lavage permet d'obtenir des surfaces propres. L'état de surface des plans a été aussi vérifié par des mesures d'AFM [19].

L'état de propreté et de rugosité des surfaces constitue un facteur essentiel à la réussite des manipulations, donc la préparation du substrat sur lequel on va déposer les bicouches est très minutieusement contrôlée (Fig. 52).

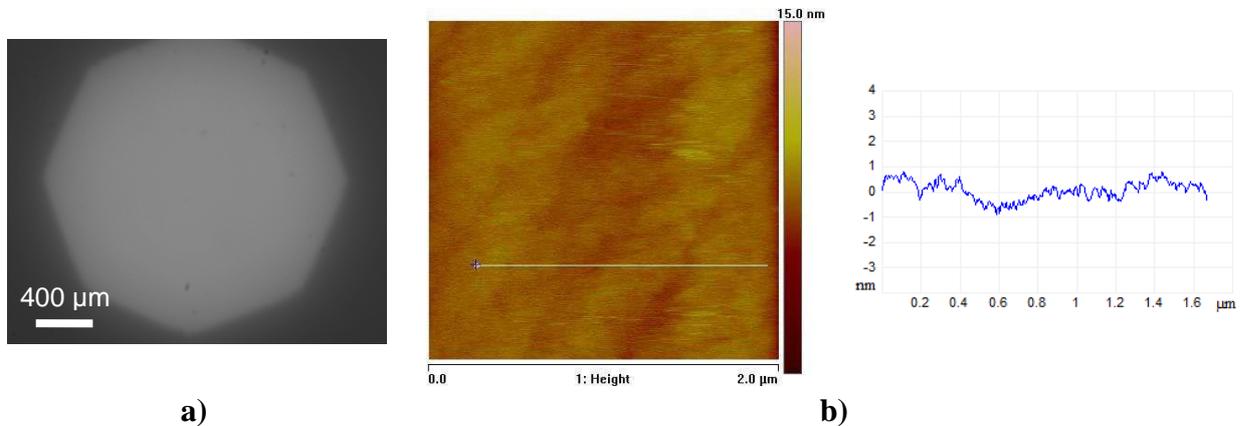


Figure 52. Vérification de la propreté des surfaces : (a) microscopie optique ; (b) analyse AFM de la topographie de la surface du verre propre (avec profil en z selon la ligne indiquée) [19]

Le protocole de nettoyage des surfaces du verre peut affecter :

- l'accrochage des phospholipides sur les surfaces pendant le dépôt des interfaces phospholipidiques de type « bicouches phospholipidiques supportées » si l'hydrophilie est insuffisante ;
- la rugosité de la surface et ainsi peut influencer/modifier la variation de μ pendant les essais.

C1.2. Choix du lubrifiant (3^{ème} corps)

Comme nous l'avons déjà présenté dans la section §A.3.3., en rapport avec la structure discontinue du FS et les objectifs de cette thèse, nous avons choisi comme modèle pour le 3^{ème} corps (Fig. 53) :

- à l'interface avec le 1^{er} corps : les bicouches phospholipidiques supportées par les surfaces de HEMA ou de verre
- dans le volume : une couche aqueuse piégée entre deux bicouches lipidiques, constituée par différentes solutions salines du pH contrôlé ou pas.

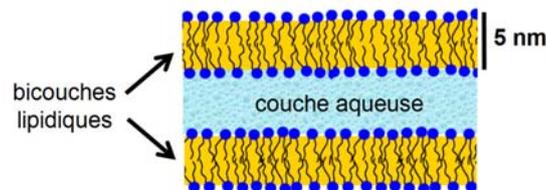


Figure 53. Schéma du 3^{ème} corps modèle (bicouches phospholipidiques et couche aqueuse)

C1.2.1. Lubrifiant - Interfaces phospholipidiques

Les interfaces phospholipidiques de type « bicouches phospholipidiques supportées » (Fig. 54) sont des systèmes modèles biomimétiques facilement accessibles à des techniques de caractérisation de surface qui permettent l'étude des processus biologiques ou physico-chimiques qui se produisent au niveau moléculaire. L'épaisseur d'une bicouche est d'environ 40Å [47] et varie en fonction de type de lipide qui la constitue. La fluidité est maintenue par une couche d'eau de 10 Å qui se trouve entre le substrat et la bicouche [10].

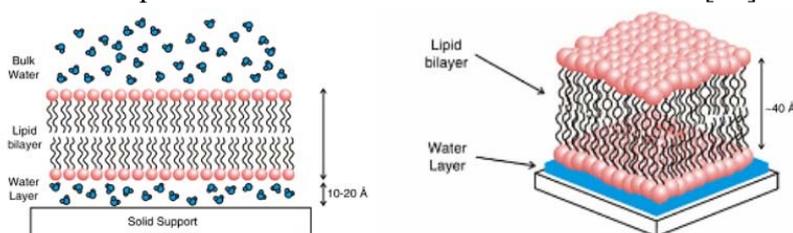


Figure 54. Schéma d'une bicouche phospholipidique supportée [14,38].

Afin d'obtenir une interface phospholipidique déposée de haut qualité (ayant peu ou pas de défauts) la surface du support doit être hydrophile, lisse et propre. Ainsi, les meilleurs substrats pour le dépôt des bicouches supportées sont celles en silice fusionnée [46], de verre borosilicate [15,46], de mica [54] et d'oxyde de silicium [46].

Les premières études sur le modèle bio-tribologique *ex vivo* (thèse AM Sfarghiu, 2006) ont été réalisées en utilisant principalement comme phospholipide le DPPC*. Comme le suggèrent les résultats d'analyse lipidomique (Partie B) les phospholipides des fluides synoviaux pathologiques sont principalement de type PC et plutôt en phase fluide (en plus d'acides gras poly-insaturés, l'acide oléique et l'acide gras mono-insaturé prédominant au niveau des queues des phospholipides). De plus, il est connu que le principal phospholipide caractérisant le milieu vivant est le POPC†, mais c'est un phospholipide asymétrique (une chaîne acyle saturée et la deuxième insaturée, voir fig. 25 - Partie B) et cette caractéristique pourrait perturber les interprétations physiques à l'échelle nanométrique. Pour cela, on a choisi d'utiliser le DOPC‡, phospholipide symétrique (comme le DPPC utilisé auparavant), mais en phase fluide. Ces deux phospholipides possèdent deux chaînes carbonées symétriques, cet-à-dire identiques. Leur structure moléculaire est présentée dans la figure 55.

Le DPPC (16:0 PC) est un phospholipide dont les chaînes carbonées (acyle) sont saturées (il n'y a pas de liaisons covalentes multiples dans leur structure) ; chaque chaîne aliphatique contient 16 atomes de carbones. En utilisant le DPPC, les bicouches lipidiques qu'on obtient sont en phase gel (solide) à la température ambiante (afin d'obtenir une transition de la bicouche vers une phase fluide il faut augmenter la température au delà de sa température de transition de phase, $T_m \text{ DPPC} = 41^\circ\text{C}$).

* DPPC = 1,2 - dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PC 16:0, 16:0 ;

† POPC = 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PC 16:0,18:1 ;

‡ DOPC = 1,2 - dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PC 18:1, 18:1 ;

Le DOPC (18:1 PC) est un phospholipide dont les chaînes aliphatiques présentent une instauration (c'est-à-dire il y a une double liaison dans chacune des chaînes, qui comptent 18 atomes de carbones, 18 :1, acide oléique). La présence de la double liaison empêche que la molécule puisse se compacter en phase ordonnée ce qui « garantit » que les bicouches de DOPC restent en phase fluide à la température ambiante ($T_{m \text{ DOPC}} = - 22^{\circ}\text{C}$).

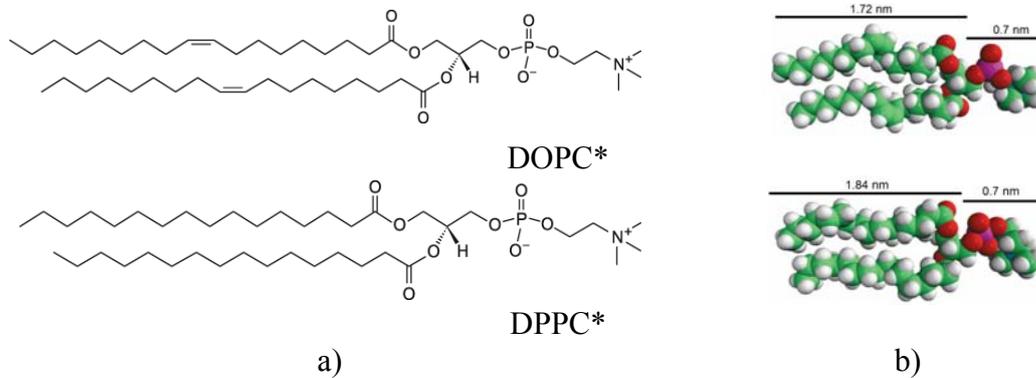


Figure 55. (a) Structure chimique et (b) vue 3D des molécules de DOPC et DPPC (* source : *Avanti Polar Lipids* ; taille des molécules dans *JMol*[®])

C1.2.1.1. Méthodes générales pour la formation des bicouches phospholipidiques

Il existe plusieurs méthodes générales pour la formation des bicouches :

- **la méthode Langmuir Blodgett** : la méthode la plus contrôlée du point de vue de la structure de la bicouche mais non utilisée dans cette thèse à cause des difficultés de mise en œuvre du dépôt sur la surface poro-élastique du HEMA ;
- **l'éclatement de vésicules lipidiques** [selon 2,41,43], bien contrôlée du point de vue physico-chimique mais trop coûteuse par rapport à la quantité de lipides nécessaires ;
- **la co-adsorption des micelles complexes « lipide/détergent »** [selon 26], avec une mise en œuvre plus difficile du point de vue physico-chimique mais moins coûteuse par rapport à la quantité de lipides nécessaires.

Pour les études décrites dans cette thèse nous avons utilisé la méthode d'éclatement de vésicules et celle de co-adsorption de micelles (*protocoles d'obtention décrits en détail dans l'annexe*) :

a) La formation de bicouche supportée par **éclatement de vésicules lipidiques** (Fig. 56a)

Cette technique consiste en l'adsorption et la fusion des vésicules lipidiques à partir d'une suspension aqueuse à la surface du substrat. Cette technique permet de réaliser le dépôt de bicouches sur les surfaces hydrophiles ou hydrophobes, mais parfois les vésicules n'éclatent pas et sont adsorbées intactes sur la surface de support. Les bicouches contenant du DOPC obtenues avec cette méthode seront appelées dans la suite du présent manuscrit, **DOPC_v**.

b) La **co-adsorption des micelles mixtes lipide/détergent** (Fig. 56b)

Cette technique utilise un détergent non-ionique (dodecyl-maltoside, DDM) pour solubiliser

les lipides et former ainsi des micelles mixtes. La technique comporte deux **étapes** :

- *L'incubation* (5min) des surfaces propres des 1^{ers} corps (verre, HEMA) dans la solution de micelles, en présence de Ca^{2+} (20mM) pour que les micelles puissent s'accrocher sur la surface.
- *Le rinçage* des surfaces (Fig. 57) : par dilution lente (~1h30) pour éliminer le détergent et le surplus de lipides. Après cette étape de rinçage, des surfactants DDM sont toutefois susceptibles d'être restés dans la bicouche à l'état de traces.

Cette technique est facile à réaliser et peu coûteuse car elle ne nécessite pas de dispositifs spéciaux, et elle utilise une quantité très faible de lipides.

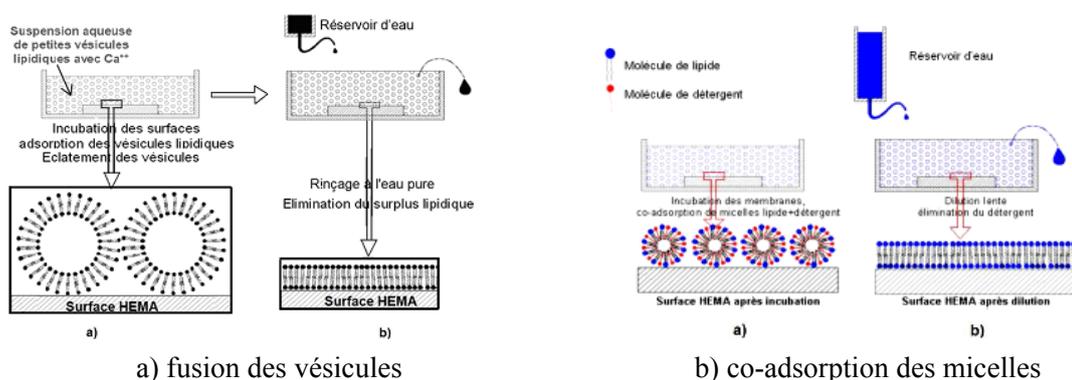


Figure 56. Méthodes d'obtention des bicouches phospholipidiques supportées

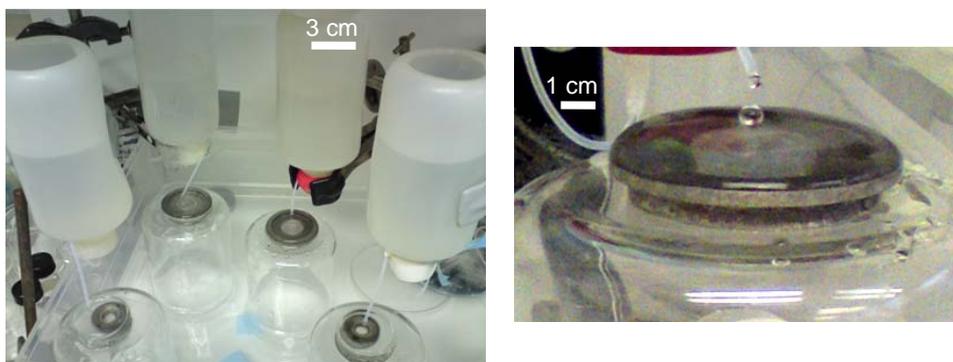


Figure 57. Montage expérimental pour le rinçage (« goutte à goutte ») des interfaces phospholipidiques après incubation

Pour obtenir un dépôt lipidique plus compact, on peut réaliser une deuxième incubation / dilution lente, mais cela avec une solution d'incubation dix fois plus diluée (donc avec 0,0114 mg/ml de micelles). Le taux de dilution (débit de dilution Q_d /volume de dilution V_d) est un paramètre crucial pour contrôler l'intégrité et la densité des bicouches lipidiques obtenues et donc leurs propriétés nano-mécaniques et tribologiques comme nous le verrons par la suite

Les bicouches contenant du DOPC obtenues avec cette méthode seront appelées dans la suite du présent manuscrit, **DOPC_m**.

C1.2.1.2. Caractérisation des interfaces phospholipidiques

Les bicouches phospholipidiques sont des structures instables qui sont facilement mises hors équilibre par des variations des paramètres mécaniques ou physico-chimiques. De plus, leur qualité structurale dépend du contrôle des paramètres caractérisant les techniques du dépôt.

Ainsi, pour vérifier la qualité structurale et mécanique des bicouches lipidiques on a utilisé :

- la microscopie à épi-fluorescence afin de **vérifier l'homogénéité macroscopique** ;
- la microscopie à force atomique afin de vérifier **l'homogénéité à l'échelle micrométrique** et par spectroscopie de force atomique pour tester **la stabilité mécanique**.

a) Homogénéité macroscopique des interfaces lipidiques

L'homogénéité (l'intégrité) des interfaces phospholipidiques obtenues est systématiquement vérifiée en microscopie de fluorescence (Fig. 59). Pour ce faire, nous avons ajouté préalablement dans la solution lipidique 1% de lipides fluorescents* (marqueurs moléculaires spécifiques). Un marqueur fluorescent (fluorophore ou fluorochrome) est une molécule qui possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer sous forme d'énergie de fluorescence (lumière d'émission). Pour pouvoir séparer et détecter la lumière de fluorescence en microscopie de fluorescence il est essentiel que les deux longueurs d'onde, d'émission et d'excitation soient assez différentes. Au cours de nos manipulations nous avons utilisé deux types de lipides fluorescents (Fig. 58) :

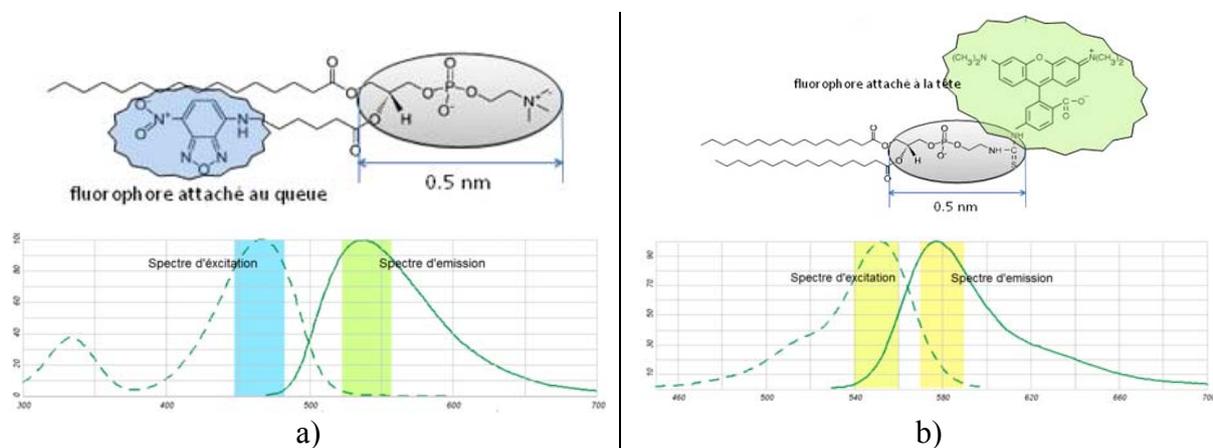


Figure 58. Structure chimique et spectres d'excitation (partie gauche de chaque spectre) et d'émission (partie droite de chaque spectre) des lipides fluorescents **(a)** NBD-PC et **(b)** TRITC DHPE

- le NBD-PC (810131P, *Avanti Polars Lipids*) dont la partie fluorescente (NBD) est liée chimiquement à l'une des queues lipidiques. Ce lipide est excité par une

* Un marqueur fluorescent (fluorophore ou fluorochrome) est une molécule qui possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer sous forme d'énergie de fluorescence (lumière d'émission). Pour pouvoir séparer et détecter la lumière de fluorescence en microscopie de fluorescence il est essentiel que les deux longueurs d'onde, d'émission et d'excitation soient différentes.

lumière bleue (465 nm) et cette excitation le fait émettre une lumière verte (535 nm).

- le TRITC-DHPE (T-1391, *Molecular Probes*), lipide dont la partie fluorescente (rhodamine) est accrochée sur la tête polaire ; ce lipide est excité par une lumière verte (540 nm) et cette excitation le fait émettre une lumière orange (566 nm).

Technique de visualisation en microscopie optique de fluorescence

La source de lumière du microscope optique de fluorescence est une lampe à vapeur de mercure qui émet une large gamme de longueurs d'onde du visible (400 à 800 nm). Le faisceau lumineux divergent, émis par la source, est transformé en un faisceau parallèle qui est réfléchi par un miroir dichroïque vers l'objectif (*Fig. 133, en annexes*). L'objectif du microscope transforme le faisceau parallèle en un faisceau convergent qui est focalisé sur l'objet analysé. La réflexion de ce faisceau sur l'objet est transmise par l'intermédiaire du miroir dichroïque à l'oculaire ou à la caméra de fluorescence. Le diaphragme de champ d'ouverture nous aide à réaliser la mise au point du microscope et à focaliser le faisceau sur la surface d'un objet transparent (par exemple : surface de verre ou surface HEMA). La mise au point est bien réalisée quand on obtient une image nette de la projection du contour octogonal du diaphragme de champ du microscope sur la surface transparente (*Fig. 52*). Ce réglage est ensuite conservé lors des visualisations en fluorescence. Ensuite la caméra de fluorescence enregistre les images issues du microscope en les transformant en nuances de gris : les zones plus claires correspondant à des détails plus fluorescents, par rapport aux zones sombres qui ont moins de fluorescence. Il est important, pour comparer les images prises avec le même objectif du microscope, de maintenir constants les paramètres principaux de la caméra, qui sont le temps d'exposition, le gain, le minimum et le maximum de l'échelle enregistrée des niveaux de gris.

En employant cette méthode pour la visualisation en fluorescence des bicouches lipidiques (lumière bleue ou verte en fonction du marqueur fluorescent utilisé), plusieurs situations se présentent (*Fig. 59*) :

- si la surface analysée ne contient pas d'éléments le diaphragme n'apparaît pas dans l'image. C'est par exemple le cas d'une surface de verre sans bicouche lipidique (*Fig. 59B*) ;
- si la surface analysée contient des éléments fluorescents, les images obtenues en fluorescence sont constituées d'une zone claire limitée par l'octogone du diaphragme ; cette zone claire peut être :
 - uniforme, comme dans le cas d'une surface de verre avec bicouche lipidique intacte (*Fig. 59C* qui montre une bicouche de DOPC préparée par la technique des micelles du premier jour, la surface étant dense et homogène) ;
 - ou révéler des détails, comme dans le cas d'une bicouche non homogène présentant des vésicules lipidiques non éclatées de quelques dizaines de micromètres (*Fig. 59D*) ; dans ce cas le dépôt n'étant pas homogène, de telles bicouches seront exclues des études tribologiques et/ou AFM.

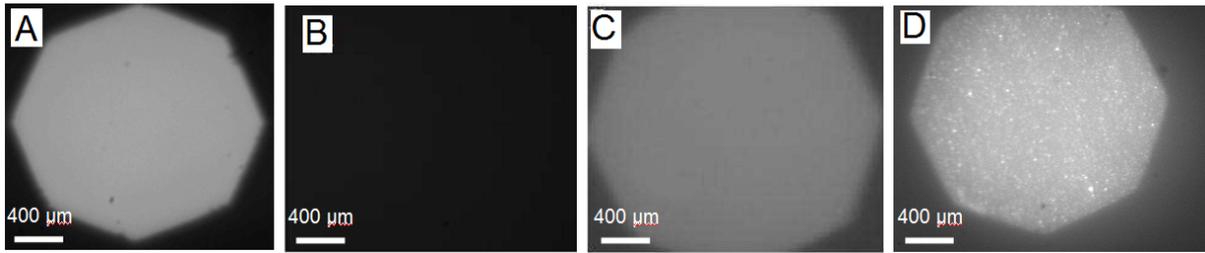


Figure 59. Microscopie optique - exemples d'images qui peuvent être obtenus suite au dépôt des interfaces phospholipidiques sur les surfaces des 1^{ers} corps

(A) Surface vue en lumière blanche ; (B-D) Images par microscopie en fluorescence* : (B) surface de verre nue (sans dépôt lipidique) ; (C) Dépôt homogène d'une bicouche de DOPC-NBDPC fraîchement préparée ; (D) Dépôt non homogène d'une bicouche de DOPC-NBDPC fraîchement préparée (surface avec des points plus lumineux que d'autres à cause de vésicules non éclatées).

Ces observations en fluorescence permettent de détecter d'éventuels défauts dans la bicouche lipidique ou au niveau du contact, de l'ordre de quelques μm . Cette résolution est suffisante pour détecter au cours des essais tribologiques des phénomènes d'usure des bicouches continues à grande échelles, mais, comme on verra par la suite, des caractérisations à plus grande résolution (par microscopie AFM) ont été nécessaires afin d'expliquer des résultats très différents pour des essais tribologiques qui montrent pourtant des interfaces uniformes à grande échelle.

Par rapport à ces visualisations en fluorescence, on a détecté une nette évolution de l'intensité de fluorescence, qui a été analysée à partir de visualisations en microscopie de fluorescence faites juste après leur dépôt et le lendemain (Fig. 60). Afin d'empêcher tout effet de photoblanchiment naturel dû à l'action de la lumière sur les marqueurs fluorescents, les bicouches ont été gardées jusqu'au lendemain dans le milieu aqueux et dans le noir (les récipients contenant les dépôts ont été couverts par du papier aluminium).

Les résultats en microscopie en fluorescence (Fig. 60) indiquent après une journée en solution la baisse de l'intensité en fluorescence du dépôt (dans le milieu aqueux utilisé dans les essais), à l'échelle optique des images en fluorescence (objectif x20, résolution de quelques μm).

* La taille de la zone observée lors de l'acquisition de ces images en fluorescence est typiquement d'environ $400 \times 400 \mu\text{m}$.

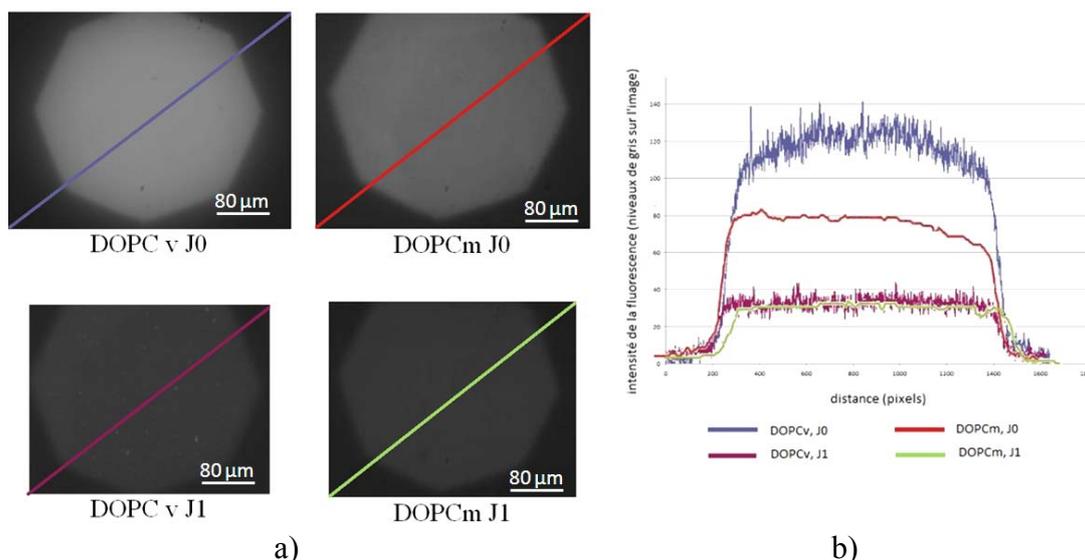


Figure 60. Photoblanchiment des interfaces phospholipidiques DOPC

(a) image en fluorescence des DOPC_v et DOPC_m le jour du dépôt (en haut) et le 2^{ème} jour (en bas) indiquant la ligne de fluorescence analysée; (b) Analyse de l'intensité lumineuse sur verre avec le logiciel d'analyse d'image *ImageJ*.

Comme on a évité les effets de photoblanchiment, ces résultats pourraient signifier qu'il y a possiblement un effet d'oxydation de ces bicouches. Si l'oxydation des phospholipides composant les bicouches DOPC se produit, des espèces de type lyso-PC peuvent être mis en évidence (Fig. 61). Ainsi, par une analyse qualitative (séparation chromatographique sur plaque, Fig. 61, voir fig. 122 en annexe pour le principe de séparation) on a pu mettre en évidence la formation des espèces lyso-PC au niveau des bicouches DOPC_m après leur maintien prolongé dans le milieu aqueux (Fig. 61a) par rapport au cas d'une bicouche fraîchement préparée (Fig. 61b).

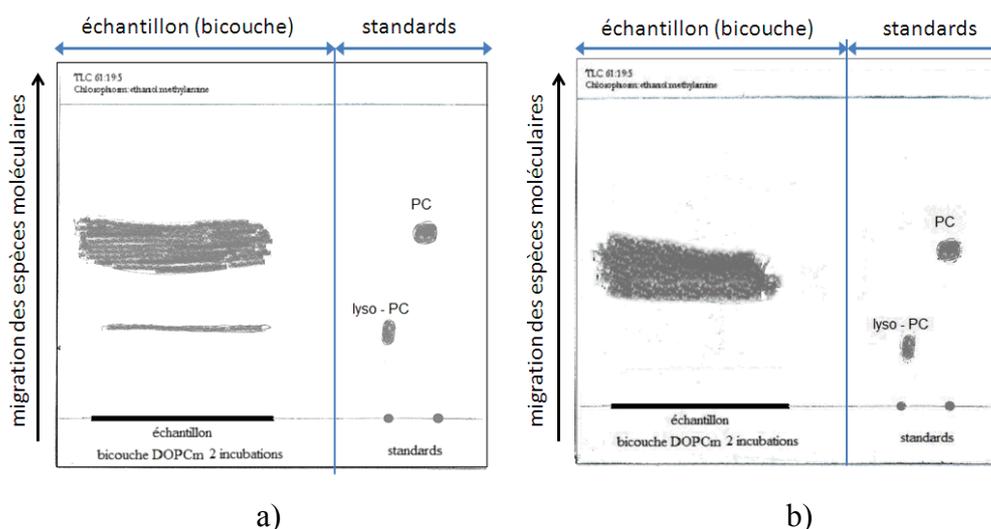


Figure 61. (a) Présence des traces de lyso-PC au niveau des bicouches DOPC_m (2 jours de maintien dans le milieu aqueux) et (b) absence dans le cas d'une bicouche DOPC_m fraîchement préparée. Analyse qualitative chromatographique (séparation CCM, sur plaque) selon la même technique que celle utilisée dans la partie B pour la séparation des lipides contenus dans les échantillons de FS analysés. Les détails de la technique sont présentés en annexe.

b) Homogénéité à l'échelle micrométrique et stabilité mécanique des interfaces lipidiques

Bien que les bicouches observées soient homogènes à l'échelle macroscopique (en fluorescence) on s'est rendu compte que la qualité structurale à l'échelle micrométrique de la bicouche dépendait des paramètres caractérisant la technique du dépôt spécialement pour le dépôt par la méthode de co-adsorption des micelles, pour laquelle les paramètres ne sont pas encore bien définis. Afin de définir ces paramètres, nous avons étudié:

- **l'influence de nombre d'incubations** (1 ou 2) lors du dépôt* des bicouches DOPC_m ;
- **l'influence de taux de dilution** lors du rinçage du surplus lipidiques qui pourrait permettre l'existence d'éventuelles traces de molécules de détergent DDM, utilisé dans la préparation de la solution de micelles, dans les interfaces phospholipidiques obtenues par cette méthode.

En ce qui concerne la stabilité mécanique des interfaces phospholipidiques, on a testé leur résistance nano-mécanique par des essais d'indentation jusqu'à la rupture de la bicouche. Ceci ont été réalisés avec un AFM commercial (Multimode NanoScope III, Veeco Instruments, Santa Barbara, CA), en utilisant une pointe en nitrure de silicium (Si_3N_4), de forme pyramidale, ayant un rayon de courbure de 10nm en tête de la pyramide (Fig. 62), supportée par un levier de forme triangulaire avec une constante de raideur k d'environ 0,08 N /m, calibrée par la méthode du bruit thermique (largement utilisée pour calibrer la raideur des leviers [18,19,48,58]). La calibration a été réalisée avant utilisation en utilisant la méthode de bruit thermique sur un AFM avec un microscope Asylum MFP-3D Stand Alone AFM (*en collaboration avec A. Piednoir, LPMCN, UCBL*).

Le principe de fonctionnement du microscope à force atomique est détaillé dans les annexes.

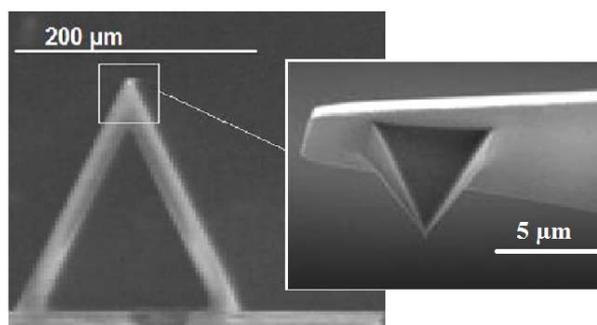


Figure 62. Le levier et la pointe pyramidale AFM - image en microscopie électronique [32]

De même que l'homogénéité structurale à l'échelle microscopique, la stabilité mécanique des bicouches lipidiques a été étudiée en fonction des paramètres du dépôt :

- influence de nombre d'incubations
- influence de taux de dilution.

* Les détails de protocole d'obtention des bicouches DOPC_m sont présentés en annexe.

Les résultats de caractérisation nano-mécanique par AFM des interfaces DOPC_m ont été obtenus lors des études expérimentales effectuées dans le cadre de la thèse de F. Dekkiche (soutenue en 2011) et complétés lors du stage de B. Munteanu (Projet de fin d'étude, INSA de Lyon, 2010).

- Influence du nombre d'incubations

L'imagerie AFM nous a permis de mettre en évidence l'influence du nombre d'incubations lors de dépôt des bicouches DOPC_m sur l'homogénéité structurale (Fig. 63).

Les images AFM obtenues dans la journée du dépôt (Fig. 63a) ne montre pas de différences entre 1 et 2 incubations. Ainsi, dans la figure 63a on retrouve la rugosité de la surface en verre en dessous de la bicouche, pour l'imagerie AFM des deux types de bicouches.

Les images AFM de deuxième jour de la surface avec le dépôt DOPC_m (pour des bicouches gardées ~24h à 4°C et à l'abri de la lumière) pour le cas d'une seule incubation (Fig. 63b) montrent une bicouche discontinue sous forme d'îlots avec une rugosité pic à pic d'environ 5nm (une seule bicouche lipidique), tandis que pour le cas de deux incubations (Fig. 63c) la bicouche est plus compacte avec une densité lipidique plus grande mais des trous d'environ 5nm de profondeur (une épaisseur de bicouche) peuvent y être mis en évidence.

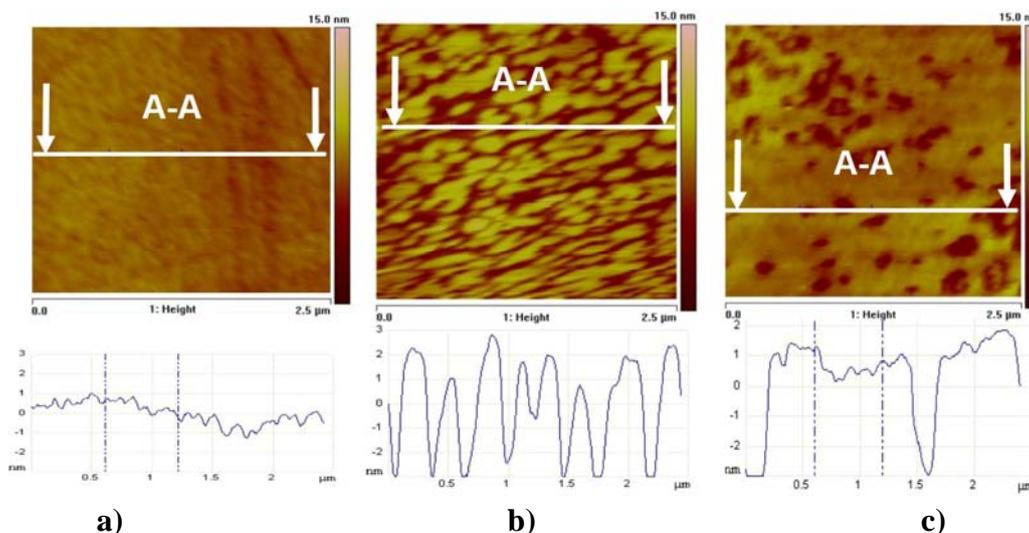


Figure 63. Imagerie en microscopie de force atomique des bicouches de DOPC_m préparées par la méthode de co-adsorption des micelles: (a) homogénéité de la bicouche le 1^{er} jour (après dépôt) ; (b) îlots dans la bicouche à 1 incubation (le 2^{ème} jour) ; (c) trous dans la bicouche à 2 incubations (le 2^{ème} jour)

Ces valeurs se corrèlent bien avec les épaisseurs des bicouches de DOPC obtenues dans la littérature par Tiberg *et al.* [47,51] qui ont mesuré par ellipsométrie et par réflexion de neutrons une épaisseur de 4.3 nm sur des surfaces en silicium avec des bicouches préparées avec la même méthode. Ainsi, on peut déduire que dans ce cas, les bicouches s'oxydent après une période prolongée dans un milieu aqueux (contenant donc de l'oxygène) et perdent ainsi leur intégrité en format des trous. En effet, suite à l'oxydation des bicouches (*Partie B*), des

espèces lyso-phospholipides se forment au niveau de la bicouche. Celles-ci sont considérés comme de très puissants détergents naturels et la formation de trous au niveau des bicouches DOPC_m 2 incubations et semblable à celle dans le cas des bicouches 1 incubation contenant des traces de DDM.

Ces résultats suggèrent qu'il reste des molécules de détergent dans la bicouche, molécules qui sortent pendant les 24h de repos et qui déterminent l'apparition des trous et des îlots. Pour confirmer cette hypothèse, on a fait :

- des dosages biochimiques ;
- des mesures du coefficient de diffusion.

Pour les dosages on a pu faire seulement une estimation qualitative à partir des chromatographies sur couches minces (CCM, Fig. 64). Ces résultats montrent la présence des traces de DDM dans la bicouche 1 incubation (Fig. 64a) et l'absence des traces pour les bicouches obtenus après 2 incubations (Fig. 64b). L'absence des traces de détergent pour le cas des bicouches à 2 incubations pourrait aussi être due à l'existence d'une très faible quantité non décelable par la technique utilisée, comparable avec celle pour le cas des bicouches à 1 incubation. Il conviendrait donc d'améliorer la technique et de faire en plus d'une estimation qualitative aussi une détermination quantitative du détergent qui resterait dans les bicouches lipidiques.

Ces résultats confirme les observations de Grant et Tiberg [26] qui ont montré que le détergent DDM reste présent dans la bicouche fraîchement déposée après une seule incubation et qu'il ne peut être complètement éliminé qu'en veillant à un rinçage suffisamment étendue et à long temps d'équilibrage suffisant entre les différentes étapes d'adsorption [51].

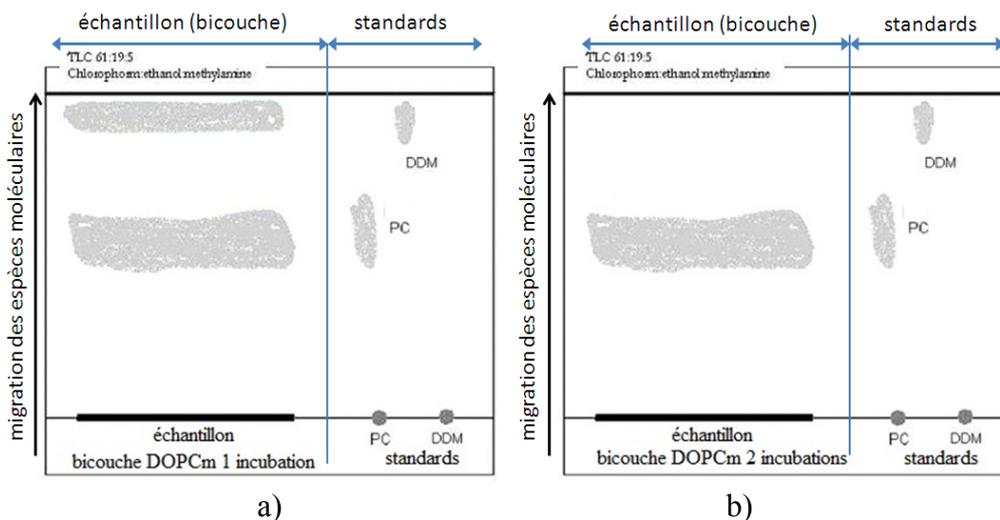


Figure 64. (a) Présence des traces de détergent DDM au niveau des bicouches DOPC_m à 1 incubation et (b) absence dans le cas d'une bicouche DOPC_m à 2 incubations

Analyse qualitative chromatographique (séparation CCM, sur plaque) selon la même technique que celle utilisée dans la partie B pour la séparation des lipides contenus dans les échantillons de FS analysés Les détails de la technique sont présentés en annexe.

Il est fort probable que la présence des molécules du détergent au niveau de la bicouche lipidique la rend plus fluide. Pour cela, des études complémentaires ont été faites afin de déterminer le coefficient de diffusion intramoléculaire au niveau des bicouches DOPC_m, le jour de leur obtention et après 24h.

Pour cela on a utilisé la *technique du FRAPP* (Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching, *détails en annexe*) qui mesure la mobilité des molécules lipidiques fluorescentes à l'intérieur de la bicouche lipidique. Cette mobilité est calculée à partir de la mesure du temps nécessaire au recouvrement de la fluorescence après le photoblanchiment des franges de 27μm d'épaisseur à l'aide d'un faisceau laser (Fig. 65).

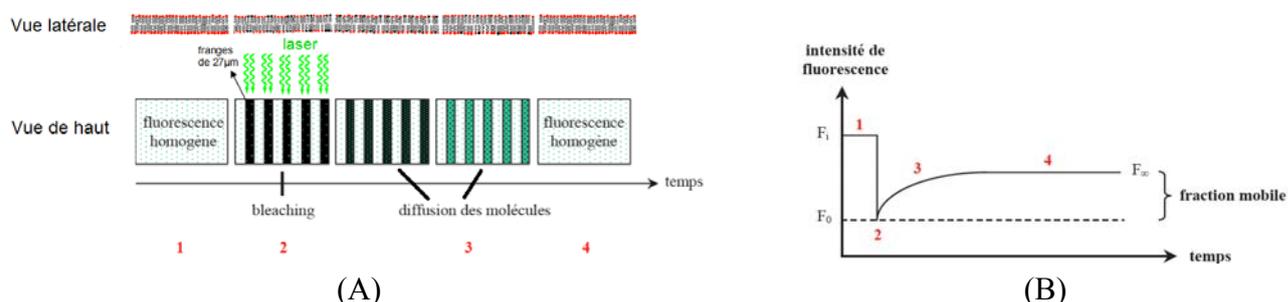


Figure 65. (A) Principe du retour de fluorescence après photoblanchissement et (B) courbe de la remontée de fluorescence

Il faut préciser que les résultats d'analyse FRAPP inclus dans ce manuscrit, sont des résultats préliminaires [Pfe B Munteanu, 2010] et que pour une compréhension plus approfondie d'autres études sont en cours [thèse B Munteanu, en cours].

Ainsi, les premiers résultats (Fig. 66) pour le cas de la bicouche contenant des traces de détergent (1 incubation) indiquent une diminution du coefficient de diffusion le 2^{ème} jour par rapport au 1^{er} (mesuré dans 40% des cas). Dans le reste de 60 % on n'a pas pu mesurer le coefficient de diffusion car la fluorescence n'a pas été récupérée après le photoblanchiment. Cela suggère que la bicouche DOPC à 1 incubation est donc discontinue à l'échelle de 27 μm (épaisseur des franges), ayant des régions connectées (40%) et des régions discontinues (formées seulement par des îlots, dans 60% des cas).

Le coefficient de diffusion des bicouches DOPC_m à 2 incubations est nettement plus fiable que celui des bicouches à 1 incubation le 1^{er} jour, et il ne change pas au cours de temps (Fig. 66). Ces bicouches sont considérées plus compactes, avec une distribution uniforme des lipides et ne présente que peu de traces de détergent.

Les résultats obtenus confirment notre hypothèse qui considère que pendant le maintien dans le milieu aqueux, les molécules de détergent adsorbées au niveau de la bicouche déposée par une seule incubation, s'échappent en solution générant ainsi la formation des discontinuités au niveau du dépôt lipidique (Fig. 63b).

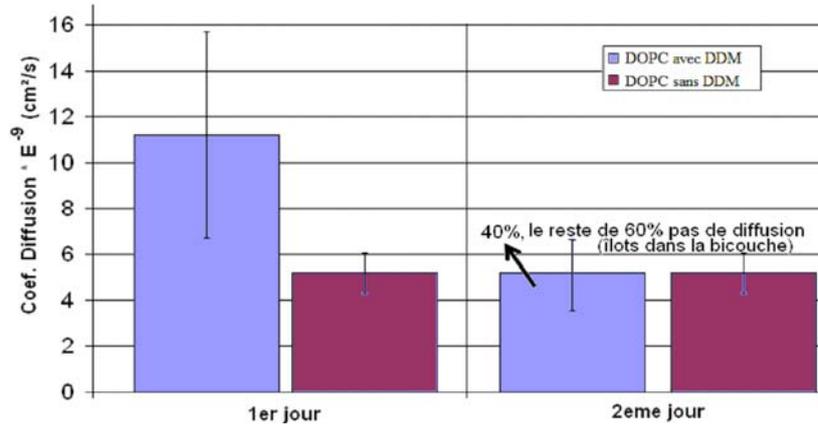


Figure 66. Vieillesse des interfaces phospholipidiques de type DOPC_m avec des traces importantes (1 incubation) et négligeables (2 incubations) de détergent DDM – analyse par FRAPP [BMunteanu, PFE 2010 & AM Trunfio - communication personnelle]

Les résultats d’analyse de la stabilité mécanique des bicouches lipidiques montrent que *dans l’eau ultra pure*, 100% des bicouches DOPC_m analysées ont été rompues par la pointe, générant une distance de saut entre la pointe et le substrat (surface en verre) d’environ 4.5 nm (Fig. 67B,D) valeur qui correspond à l’épaisseur d’une bicouche phospholipidique déposée sur la surface de verre. Toutefois, on peut noter une nette différence entre les bicouches obtenues suite à une seule incubation et celles après 2 incubations : la répartition des forces de rupture (*noté force de pénétration dans les images*) indique un pic à 0,375 nN dans le cas d’une incubation (Fig. 67A) tandis que ces forces sont plus élevées avec un second pic large entre 1 et 3 nN dans le cas de deux incubations (Fig. 67C).

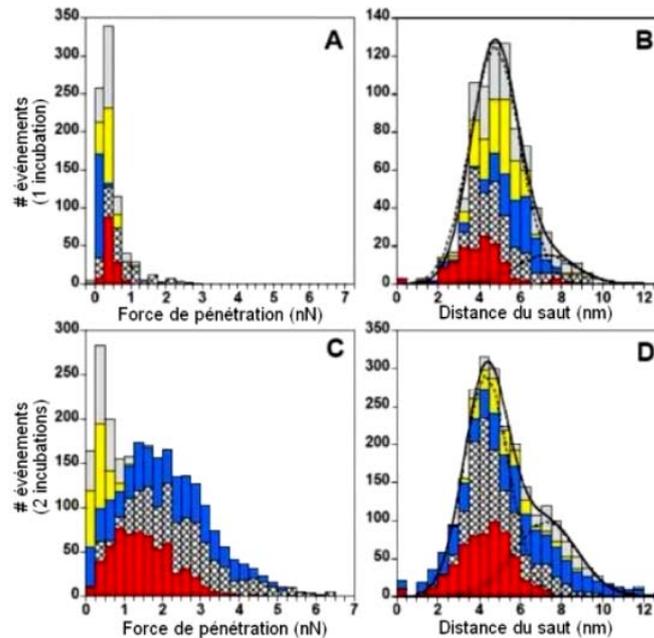


Figure 67. Histogrammes correspondant à la force de pénétration (A,C) et à la distance de saut (B, D) mesurée par AFM pour des bicouches de DOPC_m dans l’eau ultra pure en fonction du nombre d’incubations utilisées pour leur dépôt par la méthode de co-adsorption de micelles. (A-B) une incubation ; (C-D) deux incubations ; Les couleurs correspondent à des expériences différents taux de dilution avec différents échantillons.

Ces résultats suggèrent que les bicouches à 2 incubations sont plus denses et plus résistantes à l'indentation mécanique. C'est pour cela que pour la suite des essais on est resté sur le choix d'utiliser dans le cas de la technique d'adsorption des micelles seulement des bicouches obtenues après 2 incubations.

- Influence de taux de dilution

Pour étudier l'influence du taux de dilution* pour le cas des bicouches DOPC_m à 2 incubations on a fait varier le taux de dilution : très rapide (4 min⁻¹), intermédiaire (1 min⁻¹) et lent (0,7 min⁻¹).

L'imagerie AFM de ces bicouches (Fig. 68) montre une claire corrélation entre le taux de dilution et l'intégrité des bicouches supportées:

- les bicouches obtenues avec un débit rapide (4 min⁻¹, Fig. 68a) sont discontinues et présentent des îlots de diamètre de quelques µm et une hauteur pic à pic d'environ 5 nm. (identique avec les bicouches à 1 incubation, Fig. 63b); La présence des îlots est très probablement due à l'élimination d'une grande quantité des lipides pendant le rinçage ;
- les bicouches obtenues avec un débit intermédiaire (1 min⁻¹, Fig. 68b) sont plus compactes avec des petits trous et une densité de lipides plus élevée ;
- les bicouches obtenues à un débit beaucoup plus faible (0.7 min⁻¹, Fig. 68c) sont intactes avec une répartition uniforme des lipides sur la surface testée.

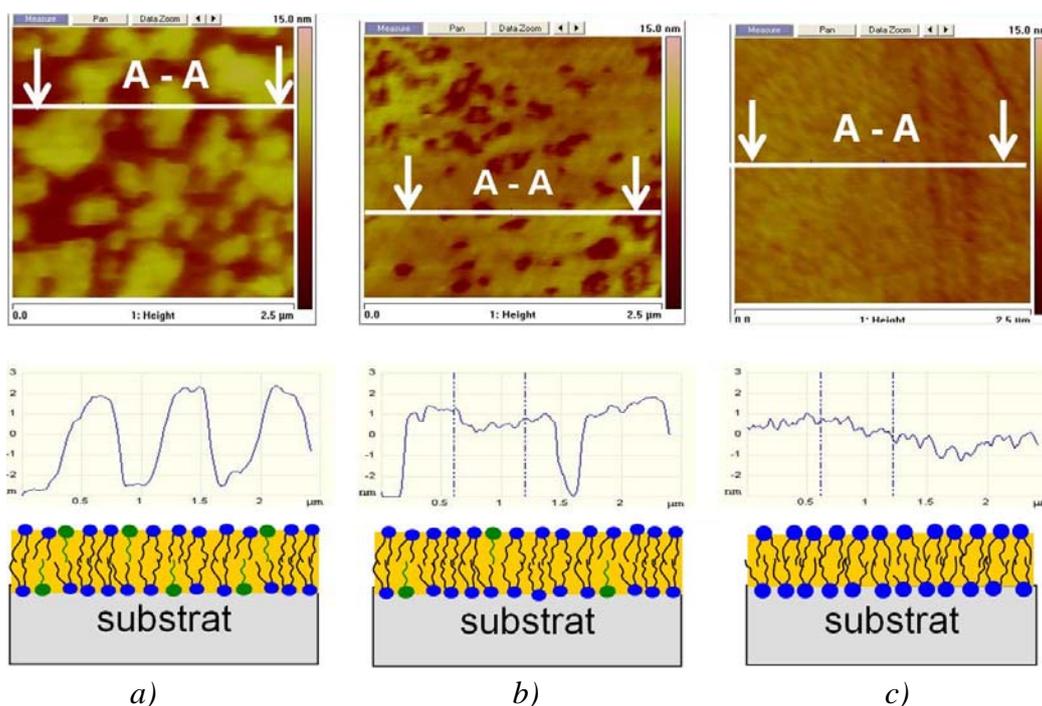


Figure 68. Imagerie AFM des bicouches de DOPC_m après deux incubations (a) dilution rapide (4 min⁻¹), (b) dilution intermédiaire (1 min⁻¹) et (c) dilution lente (0.7 min⁻¹) (B. Munteanu, Pfe 2010):

* Le taux de dilution = débit de dilution (Q_d) / volume de dilution (V_d)

D'un point de vue nano-mécanique, les résultats obtenus pour des bicouches DOPC_m, à 2 incubations, obtenues à des taux de dilution rapide et lente (Fig. 69) montrent :

- une faible résistance à l'indentation pour les bicouches obtenus avec une dilution rapide : 85% des bicouches sont susceptibles d'être rompues par la pointe AFM à une force très faible (environ 0.4 nN) ; on observe aussi que la distance de pénétration correspond plutôt à l'épaisseur de 2 bicouches lipidiques (environ 8nm) ce qui suggère ainsi qu'une partie de la bicouche est adsorbée sur la surfaces de la pointe AFM qui rompt ainsi deux bicouches superposées (schéma sur la Fig. 69) ;
- la résistance mécanique de la bicouche obtenue après une dilution lente est supérieure à celle de la bicouche obtenue en appliquant une dilution rapide : seulement dans 60% des cas les bicouches après dilution lente sont rompues à des forces allant jusqu'à 7nN, avec la longueur du saut correspondant à l'épaisseur d'une seule bicouche (~4,5nm).

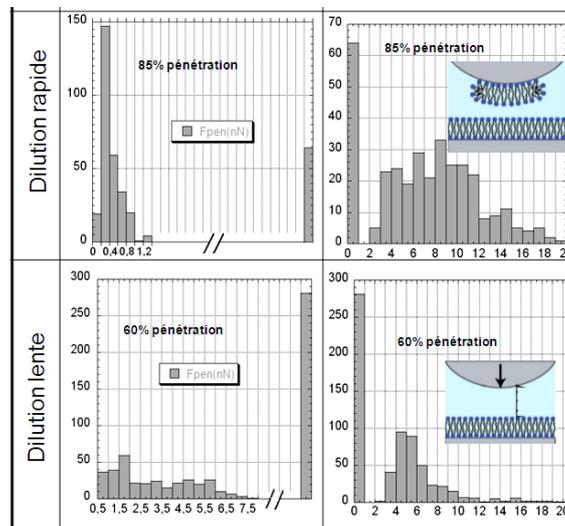


Figure 69. Coefficient de diffusion moléculaire au niveau des bicouches de DOPC_m après **deux incubations**, pour dilution rapide ou lente (B. Munteanu, PFE 2010)

Notons que ces résultats sont légèrement différents de ceux de la fig. 67, mais qu'ils ont été réalisés à deux ans d'intervalle.

En ce qui concerne spécifiquement les bicouches DOPC_m, afin d'obtenir des interfaces phospholipidiques qui soient homogènes, intactes, avec une répartition uniforme des lipides sur la surface testée et utiles dans l'étude tribologique par les essais de frottement, il est nécessaire pour leur dépôt d'appliquer une méthodologie utilisant : 2 incubations et un rinçage « goutte à goutte » utilisant un très faible taux de dilution (0.5 min⁻¹). Ces paramètres sont très importants à prendre en considération pour l'étude des propriétés des membranes phospholipidiques.

C1.2.2. Lubrifiant – la couche aqueuse

Nous avons étudié conjointement le comportement tribologique et la résistance nano-mécanique des interfaces phospholipidiques de type DOPC_m et DOPC_v en présence de différentes couches aqueuses reproduisant la variation de divers paramètres caractérisant les pathologies articulaires :

- {W}, eau ultra pure, pH ~ 5.6, (MilliQ, Millipore, résistivité 18,2MΩ.cm)
- {S}, solution saline, pH 5.8, NaCl 150 mM ;
- {Tm}, solution tamponnée, tampon TRIS maléate pH 5.6 ;
- {Ac}, solution tamponnée, tampon acétate, pH 5.6 ;
- {T}, solution tamponnée, tampon TRIS pH 7.2 ;
- {Ts}, solution saline tamponnée, tampon TRIS pH 7.2, NaCl 150 mM ;
- {Ts}, solution tamponnée, tampon TRIS pH 8.4 ;

Toutes les solutions ont été filtrées avec une membrane de PES (0,20 μm) avant utilisation. La viscosité de ces solutions n'est pas modifiée et elle reste de même ordre de grandeur que la viscosité de l'eau ($1.002 \cdot 10^{-3}$ Pa.s), mais, à des épaisseurs très faibles (quelques nm) on ne connaît pas encore l'effet de ses solutions sur la viscosité.

Les solutions tampon (TRIS/HCl) saline tamponnée (TRIS/HCl, 150mM NaCl) qui permettent de maintenir le pH constant pendant les expériences ont été choisies de telle façon afin d'assurer un pH à une valeur de 7.2 (valeur physiologique) et propice à l'action de la PLA₂ déterminant l'évolution pathologique locale et respectivement de 8.4, un pH alcalin, caractéristique et favorable à l'action de l'enzyme ALP qui agit aussi au niveau articulaire lors des pathologies. Dans ces solutions tampon on a utilisé 150mM NaCl pour obtenir les solutions salines afin de reproduire *ex vivo* la pression osmotique physiologique.

Les caractéristiques différentes (spécifiques à l'évolution pathologique articulaire) de ces milieux aqueux utilisés lors des essais tribologiques nous permirent de mettre en évidence l'influence de la variation de ces paramètres physico-chimiques sur le comportement des interfaces phospholipidiques analysées :

- le rôle du tampon pour le maintien d'un milieu stable à un pH précis ;
- la variation du pH, de milieu tampon et de la pression osmotique.

Ces variations de paramètres sont synthétisées dans la figure 70.

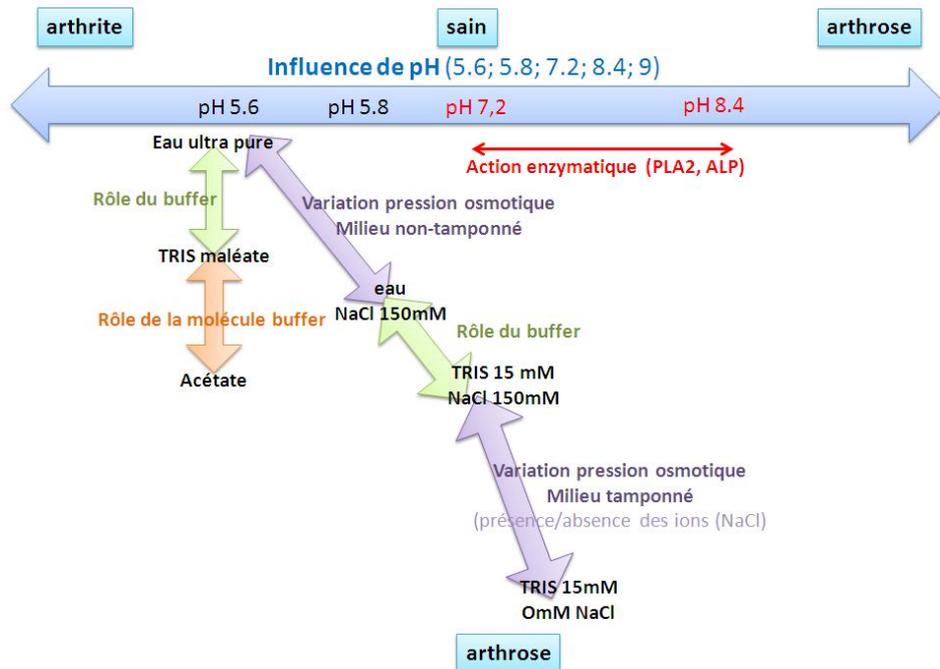


Figure 70. Paramètres utilisés afin d'étudier le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques modèles

C1.3. Choix du mécanisme tribologique – dispositif expérimental

Dans le cas des articulations synoviales, le *mécanisme* met en mouvement les premiers corps du contact (les cartilages articulaires) par l'intermédiaire du système neuromusculaire (générateur du mouvement) et du système ligamentaire (assurant les « liaisons flexibles » entre les premiers corps, liaisons qui limitent et stabilisent les mouvements articulaires, en imposant les degrés de liberté cinématiques qui sont spécifiques de la conformation de l'articulation synoviale).

La bibliographie présente des études de dynamique articulaire qui permettent de connaître les valeurs des sollicitations globales imposées par le mécanisme articulaire au cours de la marche normale [3,56], données globales qui sont ensuite utilisées dans des modèles analytiques (cinématique ou éléments finis) permettant de remonter aux conditions locales du fonctionnement du mécanisme articulaire (pression de contact et vitesses relatives des surfaces articulaires) [12,17,31,37].

Ces caractéristiques locales du mécanisme tribologique du modèle articulaire sont simulées par un **dispositif expérimental** conçu de façon à permettre une analyse tribologique en temps réel du contact, par la visualisation *in situ*, au cours des essais expérimentaux et l'enregistrement de l'évolution du coefficient de frottement.

Ce dispositif expérimental (Fig. 71) permettant la reproduction *ex vivo* des paramètres mécaniques choisis antérieurement pour caractériser le modèle tribologique *ex vivo* a été mis au point en 2006 au LaMCoS, dans le cadre de la thèse d'Ana-Maria Sfarghiu [49].

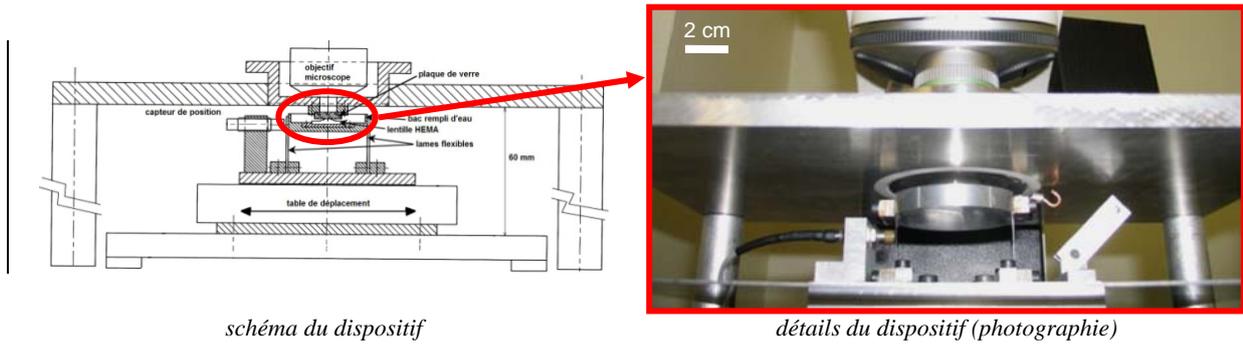


schéma du dispositif

détails du dispositif (photographie)

Figure 71. Dispositif expérimental [49]

Le premier corps modèle de type lentille HEMA (*voir §C1.2*) est fixé au fond d'un bac contenant le troisième corps modèle (*voir §C1.3*). Le bac est relié par l'intermédiaire d'un système de lames flexibles à une table de déplacement qui impose des mouvements de translation alternative.

Une contre face transparente (plaque en verre) forme le contact avec la surface supérieure du premier corps modèle. La charge normale N est appliquée par gravitation à l'aide de masses annulaires. L'observation du contact à travers la contre face en verre se fait *in situ* au cours des essais de frottement à l'aide d'un microscope optique droit en épi-fluorescence (Leica DMLM) équipé d'une camera CCD (Leica DC350F) qui permet une visualisation à la fois en lumière blanche (classique), ou bien verte ou bleue (fluorescence) en fonction des caractéristiques des lipides fluorescents qui ont été utilisés (Fig. 72).

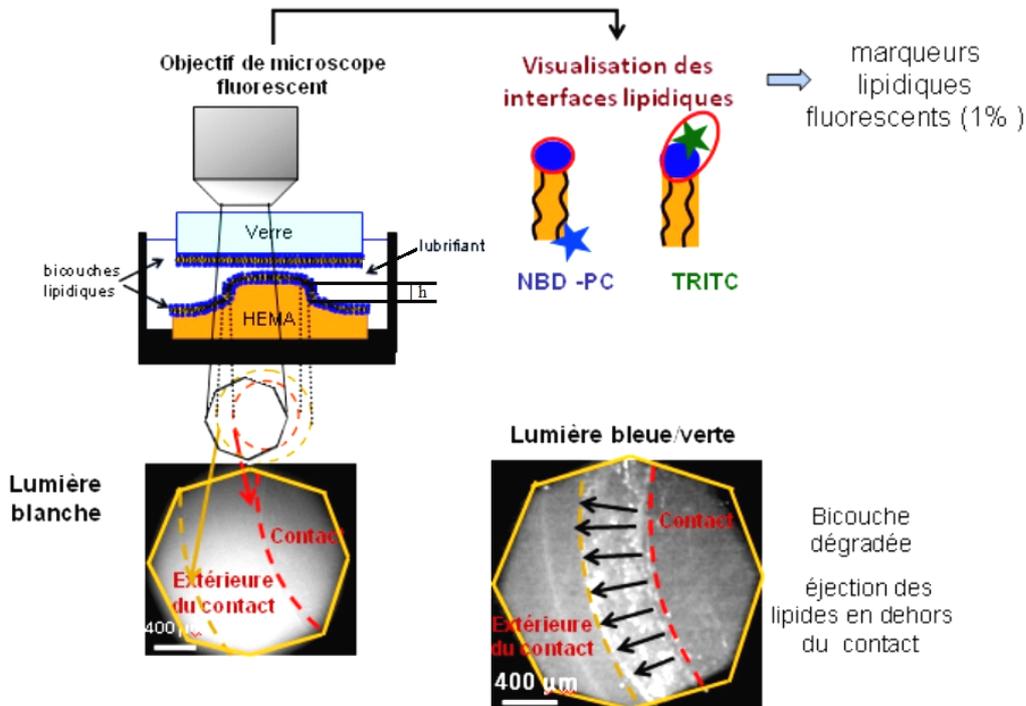


Figure 72. Visualisation *in situ* des interfaces phospholipidiques au niveau du contact

La figure 73 montre le contact modèle, avant frottement, visualisé en microscopie optique classique (lumière blanche) (Fig. 73a) et visualisé en microscopie optique de fluorescence en lumière bleue (Fig. 73b). L'image en lumière blanche permet de repérer le cercle intérieur délimitant le contact (cf. schéma dans la fig.72 et la flèche courte dans la fig. 73a). Ce cercle est invisible dans la visualisation correspondante en fluorescence (Fig. 73b) car avant le frottement les bicouches lipidiques sont intactes et uniformes sur toute la surface frottante, donc dans le contact et hors du contact. Par contre, la visualisation en fluorescence en lumière bleue (Fig. 73b) fait apparaître en plus clair le cercle extérieur délimitant le bord de la partie bombée de la lentille HEMA (flèche dans la fig. 73b). La visualisation de ce cercle est possible car le bord de la lentille HEMA présente une fluorescence plus importante puisqu'elle intègre la fluorescence de la portion verticale de la bicouche qui se trouve sur l'épaisseur de ce bord (« h » dans la fig. 72).

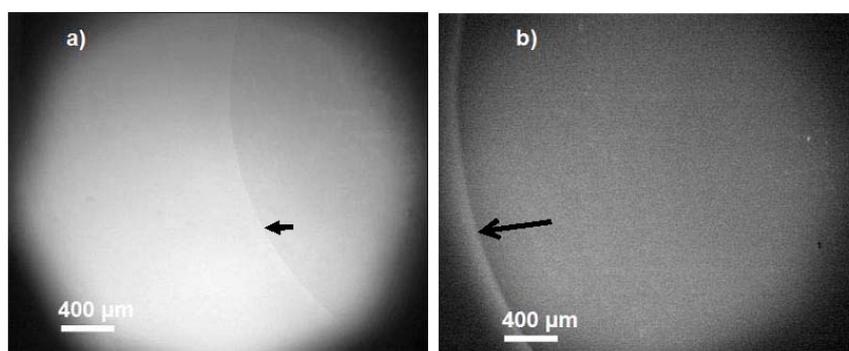


Figure 73. Visualisation du contact modèle articulaire avant frottement en microscopie optique
a) classique (lumière blanche) b) en fluorescence (lumière bleue)

Afin de pouvoir comparer les images du contact obtenues en fluorescence (lumière verte, respectivement bleue) dans le cas de divers essais, les mêmes paramètres d'acquisition de la caméra (gain et exposition) ont été rigoureusement utilisés.

Pour déterminer l'évolution du coefficient de frottement μ lors des essais tribologiques, on déduit d'abord la force tangentielle T . Cette mesure est réalisée en utilisant un capteur de position à courants de Foucault qui délivre une tension proportionnelle à la déformée du système de lames flexibles supportant le bac [49].

Cette déformée élastique est proportionnelle à la force tangentielle. Un étalonnage avec des masses marquées permet d'obtenir la valeur de la constante de proportionnalité (K_e) entre la force et la tension. Cette constante dépend des conditions de démontage et de remontage du dispositif, nécessaires pour son utilisation sous le microscope optique permettant la visualisation du contact au cours des essais. Par conséquent un étalonnage est réalisé en début, puis à la fin de chaque essai (Fig. 74). On obtient ainsi la courbe d'étalonnage (Fig. 75). La sensibilité, la gamme de linéarité, et la position du capteur sont telles que l'incertitude sur les mesures de forces comprise entre -1N et 1N est de 5.10^{-4}N .

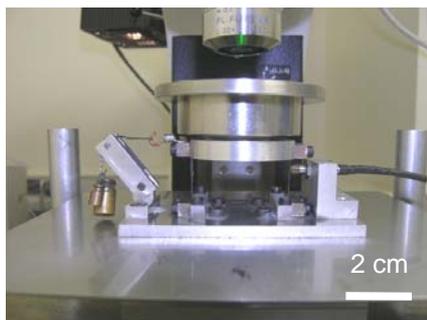


Figure 74. Etalonnage du dispositif expérimental avant/après les mesures de frottement

En rapportant la force normale N (le dispositif expérimental nous permet de l'imposer par gravitation) à la force tangentielle T mesurée à l'aide de capteur, on obtient le coefficient de frottement ($\mu=T/N$). La variation de ce coefficient est enregistrée sur papier pendant les essais, ce qui donne « la courbe de frottement ». Comme le mouvement de translation du premier corps (imposé par la table de déplacement du dispositif expérimental) est alternatif, la courbe de frottement présente des parties « positives » et « négatives », chacune d'entre elle marquant le changement du sens de déplacement (Fig. 76). Il faut aussi préciser que dans cette configuration initiale du dispositif expérimental, pour des raisons techniques, la vitesse de déplacement (0.6 mm/s) avait été imposée manuellement, cependant, l'écart maximal enregistré au cours d'une heure d'essai n'a pas dépassé $\pm 0.15\text{mm/s}$.

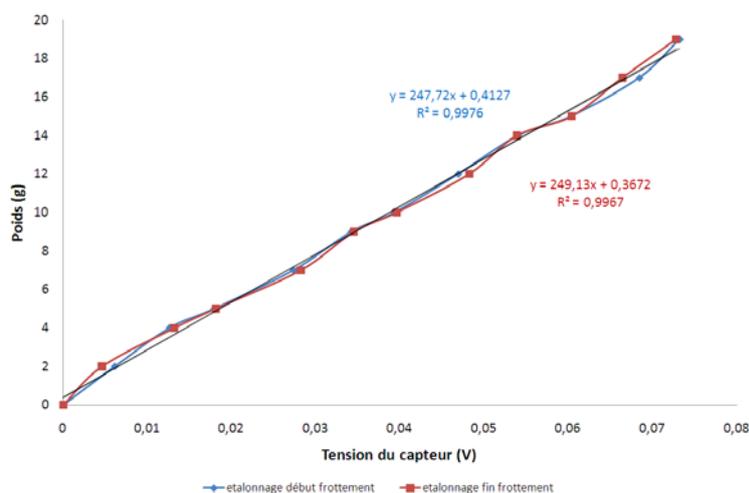


Figure 75. Courbe d'étalonnage en début et à la fin d'un des essais tribologiques



Figure 76. Photo d'une courbe de frottement enregistré pendant les essais *ex vivo* sur le papier millimétrique

C1.3.1. Améliorations du dispositif expérimental

Par rapport au dispositif expérimental initialement conçu (Fig. 77A), la table de déplacement qui supporte le bac avec les lames flexibles a été motorisée en 2008 [6] avec un contrôleur du mouvement uniaxial, type SMC 100CC, couplé avec un système de vérins motorisés pour des courses longues et capacité de charge élevée (Fig. 77B) et un logiciel a été créé sous LabView pour le fonctionnement de la table de déplacement. Puis, en 2010 [16], l'enregistrement automatique sur PC des courbes d'étalonnage et de courbes de frottement a été mis en point, cependant ces enregistrements sont effectués en même temps que celles « classiques » [49] se basant sur l'inscription sur papier (Fig. 77C).

Dans le cadre des essais tribologiques présentés dans ce manuscrit, la configuration expérimentale 2008 du dispositif expérimental a été utilisée (Fig 77B). Ainsi, une vitesse de glissement $v=0,6$ mm/s et une amplitude du mouvement $\Delta x = 6,9$ mm pour des essais de frottement de 50 min (environ 150 cycles de mouvement aller-retour) ont été imposées et contrôlées en utilisant un contrôleur de mouvement à axe unique (SMC 100CC) couplé à un système de moteur permettant des courses longues et ayant une capacité de charge élevée (Newport, USA). La visualisation du contact a été faite *in situ* sur l'écran du PC (avec enregistrement numérique avant, pendant et en fin d'essai) à l'aide du microscope optique sur lequel on fixait le dispositif expérimental (Fig. 77) tandis que les courbes de frottement ont été enregistrées sur papier (Fig. 76), à l'aide d'un inscripteur inclus dans l'ensemble du dispositif (Fig. 77).

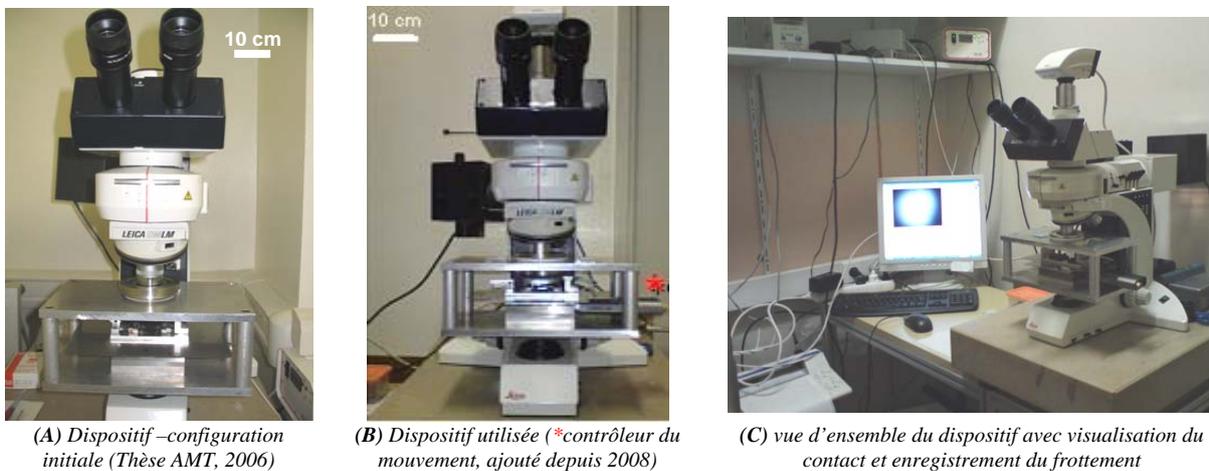


Figure 77. Améliorations et vue d'ensemble du dispositif expérimental

C1.3.2. Validation du mécanisme de lubrification choisi

Afin de s'assurer que les conditions expérimentales utilisées correspondent bien au cas de **la lubrification limite** (nécessaire afin de mettre en évidence le rôle des interfaces lipidiques dans la bio-lubrification articulaire) on a vérifié :

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

On a étudié la variation du coefficient de frottement avec l'augmentation de la charge normale (pression) appliquée. Ainsi, la charge normale a été variée entre 2.4 - 4N (ce qui correspond à des pressions comprises entre 0.2 et 0.4 MPa (compte tenu du diamètre de l'aire de contact ~ 2 mm), avec une vitesse relative de déplacement constante de $v=0.6$ mm/s. Ces essais ont montré que le coefficient de frottement μ n'a pas enregistré de variation, donc il n'est pas influencé par la variation de la charge normale

L'influence de la variation de vitesse de cisaillement

Pour les essais tribologiques effectuées on n'a pas enregistré des variations de μ en fonction de la variation de la vitesse de déplacement (on a imposé dans notre système des vitesses de cisaillement de 0.2, 0.6 et 1.0 mm/s).

Par conséquent, dans la gamme des paramètres choisis (pression, vitesse relative) on n'a pas des effets de portance hydrodynamique dans nos mesures. Dans le cadre des études tribologiques présentés dans cette thèse on a utilisé une vitesse relative des surfaces du contact pour le modèle articulaire *ex vivo* de 0.6 mm/s. Cette faible valeur de la vitesse relative des surfaces du contact modèle dans le cas d'une pression de 0.3 MPa nous a permis:

- une bonne visualisation du contact modèle articulaire *ex vivo* en microscopie optique,
- d'utiliser des conditions expérimentales de sollicitations de sorte que le régime de lubrification soit de type limite et que les effets de portance hydrodynamique soient négligeables, favorisant ainsi la mise en évidence et l'exacerbation du rôle / de l'action des interfaces lipidiques.

C1.4. Discussions et conclusions

En utilisant le dispositif expérimental et le modèle *ex vivo* décrits dans cette partie, on étudiera par la suite l'influence des possibles causes précoces des pathologies articulaires (*détaillées dans la partie A*) sur les interfaces phospholipidiques fluides de DOPC fabriquées à la fois par micelles (DOPC_m, 2 incubations, taux très lent de dilution) et vésicules (DOPC_v). Le choix par défaut dans ce travail s'est plutôt porté pour les bicouches DOPC_m de par leur facilité de fabrication mais quand cela a été nécessaire nous avons utilisé des bicouches DOPC_v.

La composition de ces bicouches à été choisi pour mimer le profil des phospholipides contenus dans le FS (*selon les résultats des analyses lipidomiques présentées dans la partie B*). La couche aqueuse a été choisie de façon à reproduire *ex vivo* différentes caractéristiques spécifiques à l'évolution des pathologies articulaires). Avec ce 3^{ème} corps modèle, nous avons étudié les propriétés tribologiques des bicouches lipidiques sous l'effet :

- de la rugosité du substrat
- des modifications physico-chimiques associées aux pathologies ;
- des modifications biologiques associées aux pathologies.

C2. Effet de la rugosité du substrat sur les propriétés tribologiques des bicouches lipidiques

C2.1. Rugosité « macroscopique » de la surface de 1^{er} corps

La différence de **rugosité** est induite à la fois par :

- **la méthode de fabrication des surfaces de verre** : dans notre étude nous avons utilisé des surfaces planes de verre borosilicate « flotté/coulé » (fournisseur *Pignat, France*, noté **P** dans le manuscrit) et respectivement « poli » (fournisseur *Melles Griot, France*, noté **MG** dans le manuscrit). Le polissage est une procédure de fabrication qui assure la planéité optique de la surface et donc une meilleure visualisation du contact pendant les essais tribologiques ;
- **le protocole de nettoyage** pour fabriquer du verre suffisamment hydrophile pour favoriser le dépôt optimal des bicouches supportées (sonication avec un détergent aqueux).

Premièrement, on a étudié l'influence de la rugosité du substrat sur la structure des bicouches lipidiques supportées.

La racine carrée de la rugosité moyenne (R_q) pour les deux types de surfaces en verre borosilicate (utilisées lors de différents essais utilisant des interfaces DOPC_m et respectivement DOPC_v), avant toute utilisation expérimentale (Fig. 78) est légèrement mais significativement différente : $R_q = 0,17 \pm 0,05$ pour des surfaces « coulées » et respectivement $0,25 \pm 0,06$ nm pour les surfaces « polies » (valeurs déterminés sur une surface de $4 \mu\text{m}^2$).

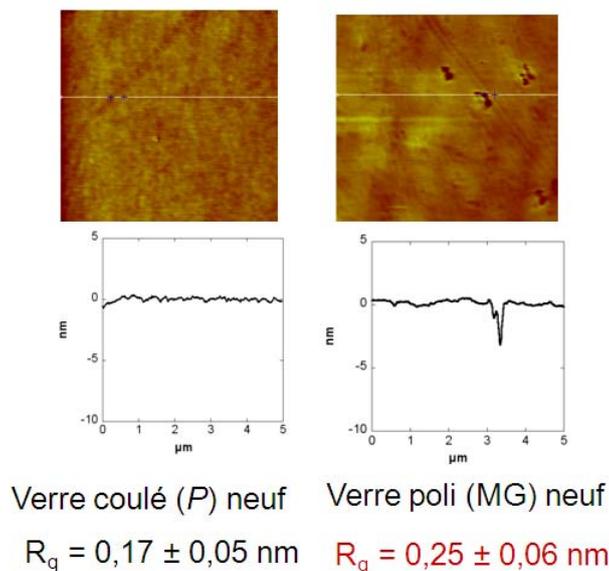


Figure 78. Analyse AFM, profil des rugosités des surfaces de verre neuves (surface de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$)

Le verre « poli » est donc beaucoup plus rugueux (Fig. 78) que celui « coulé ».

Les analyses AFM* ont montrés que le protocole de nettoyage ne change pas la rugosité de la surface du verre *coulé*, tandis qu'il augmente de façon spectaculaire celle de la surface en verre *poli* ($R_q = 1,1 \pm 0,2$ nm, Fig. 79). Lors de différentes études expérimentales nous avons été amenés à utiliser deux types de détergents de nettoyage des surfaces en verre à cause de l'arrêt de production du détergent initialement utilisé (*Micro90*, *Fischer Bioblock*), qui n'affectait pas la rugosité des surfaces. L'influence de ces deux types de détergents (*Microson* et *RBS*, *Fischer Bioblock*) sur la rugosité des surfaces de verre *poli* après plusieurs lavages est évidente (Fig. 79). Vue « l'agressivité » accentuée du détergent RBS sur les surfaces de verre coulé, les expériences tribologiques présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec du détergent *Microson*.

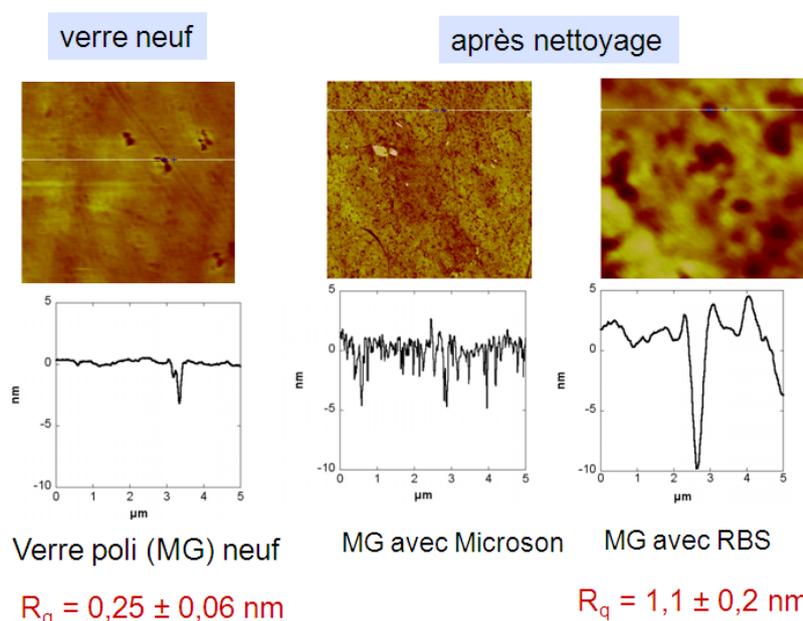


Figure 79. Analyse AFM, profil des rugosités de la surface en verre MG après deux protocoles différentes de nettoyage (sur une surface de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$)

L'analyse AFM du profil des rugosités après le dépôt des DOPC_v et DOPC_m pour le cas d'un verre poli (MG) après nettoyage avec détergent *Microson*[®] indiquent une nette différence pour le cas de deux interfaces lipidiques (Fig. 80).

* Les résultats d'imagerie AFM et de la variation du coefficient de diffusion intramoléculaire au niveau des interfaces phospholipidiques présentés dans cette partie ont été obtenus dans le cadre du stage de fin d'étude (Pfe B Munteanu, 2010) et de la thèse de F. Dekkiche (soutenue 2011).

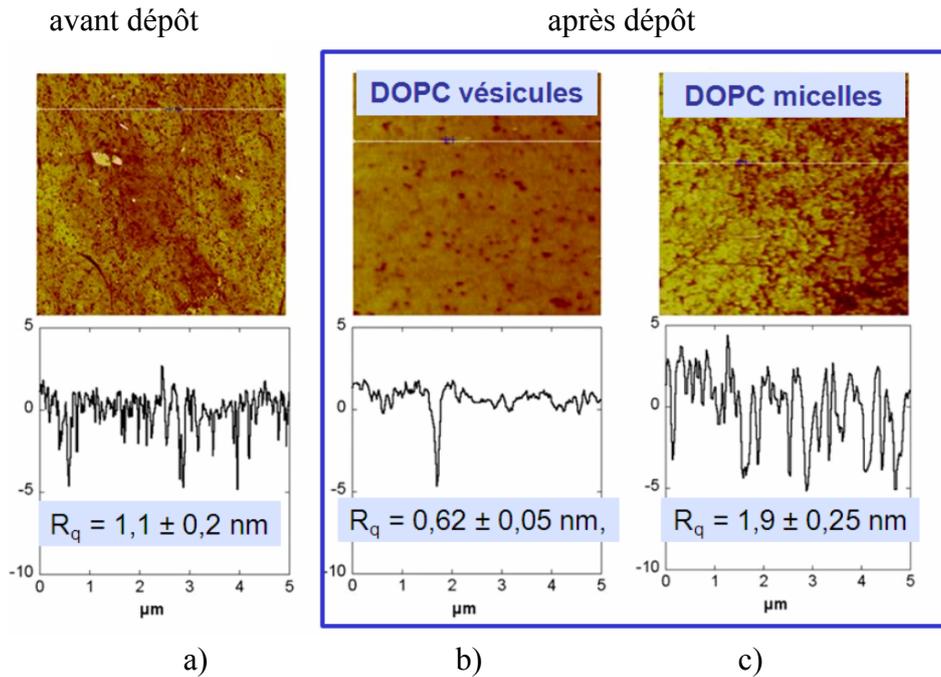


Figure 80. Variation des profils de rugosité mesurés par AFM (surface de $5 \times 5 \mu\text{m}$) pour la surface en verre « poli » : (a) avant dépôt, après nettoyage et (b-c) après dépôt, avec des bicouches de DOPC_v (b) et respectivement DOPC_m 2 incubations (c)

La figure 80 montre l'image AFM et le profil vertical typique correspondant à la surface en verre borosilicate poli couverte par une bicouche DOPC_v ($R_q = 0,62 \pm 0,05 \text{ nm}$) et respectivement DOPC_m ($R_q = 1,9 \pm 0,25 \text{ nm}$). Dans le cas de dépôt DOPC_m , la rugosité est augmentée par rapport au verre nu, alors que dans le cas de la méthode de fusion des vésicules la bicouche DOPC_v montre une topographie du substrat beaucoup plus lisse que le verre nu et la plupart des trous sont couverts par la bicouche.

Pour l'étude de l'influence de la rugosité du substrat sur le comportement tribologique des interfaces DOPC, on a utilisé les deux types de surfaces en verre borosilicate décrites précédemment : coulé (non-rugueux) et poli (plus rugueux). Les résultats de l'influence de la rugosité de ces substrats sur le comportement tribologique des DOPC_m sont présentés dans la figure 81.

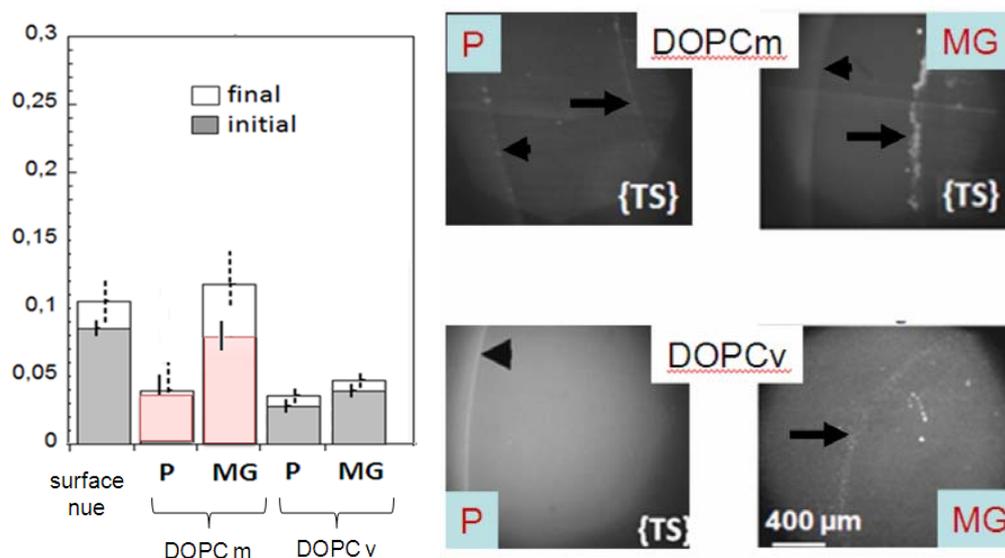


Figure 81. Effet de la rugosité du substrat (P vs. MG) sur le comportement tribologique des interfaces DOPC_v et DOPC_m ; milieu aqueux : solution saline tamponnée (TS)

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement, à l'exception des mesures {W} qu'on a arrêté après 20 minutes en raison des coefficients de frottement excessifs qui pourraient endommager les surfaces de verre). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées.

Images in situ en fluorescence après les essais de frottement. Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées. Dans les solutions tampons salines {TS}, la dégradation est présente dans le cas du substrat « rugueux » (à droite) et très faible (cas de DOPC_m) ou absente (cas de DOPC_v) (à gauche) pour le substrat de verre coulé (P), en accord avec l'évolution des coefficients de frottement pour ces cas.

Abréviations: {W}, eau, pH 5.5; {TS}, tampon Tris salin pH 7.2 avec 150 mM de NaCl ; P, verre « coulé » ; MG, verre « poli ».

Ces résultats (Fig. 81) indiquent un comportement très différent des interfaces phospholipidiques en fonction du substrat utilisé :

- Pour le cas de verre « coulé » (P) : les différences ne sont pas très significatives entre le comportement tribologique des bicouches DOPC_v et DOPC_m en rapport avec l'évolution de coefficient de frottement ($\mu = 0,035$) et de la dégradation de la bicouche à la fin des essais ;
- Pour le cas de verre « poli » (MG) :
 - le coefficient de frottement est plus grand $\mu = 0.06$ et qui augmente ($\mu = 0.11$) jusqu'à la fin de l'essai pour les interfaces DOPC_m, comparativement aux résultats obtenus avec les interfaces DOPC_v ($\mu = 0.04$ au début et 0.05 à la fin de l'essai) ;
 - de plus, les interfaces DOPC_m montrent une forte dégradation de la bicouche dans la solution saline tamponnée (TRIS NaCl pH 7.2).

Pour expliquer les différences tribologiques obtenus dans la section précédente et en accord avec les images AFM on peut faire l'hypothèse que la taille des micelles lors du dépôt ne

permet pas « combler » les grandes rugosités de la surface en verre « poli » induites après nettoyage de la surface avant dépôt. Ceci conduirait à une bicouche interrompue présentant de nombreux trous (verre poli, type MG) (Fig. 79 et Fig. 82).

Les bicouches fluides de DOPC seraient donc plus « rugueuses » ce qui influencerait leur comportement tribologique. Elles pourraient être facilement déformées et endommagées une fois les défauts tels que des trous ou des ponts entre les deux bicouches serait générés (les ponts pouvant être favorisés par la présence de détergent résiduel (Fig. 73).

Cette hypothèse est appuyée par nos mesures comparatives entre les bicouches déposées sur **des surfaces avec des valeurs de rugosité différentes et utilisant des méthodes de dépôts différentes** :

- Lors de l'utilisation de la méthode de co-adsorption des micelles pour le dépôt des bicouches lipidiques de DOPC_m, on a obtenu un coefficient de frottement plus élevé et une forte dégradation sur les surfaces en verre borosilicates plus rugueuses (MG) en comparaison avec des résultats précédemment publiés sur surfaces de verre plus lisses [18];
- Lors de l'utilisation de la méthode de fusion des vésicules pour le dépôt des bicouches lipidiques de DOPC_v, des coefficients de frottement faibles et aucune dégradation détectable ont été obtenus indépendamment du type de surface en verre (rugueuse ou lisse [50].

Ces différences de comportement tribologique des bicouches de DOPC semblent être liées aux observations AFM (Fig. 80b,c) montrant que, selon la méthode de dépôt, les surfaces de verre rugueuses sont plus ou moins couvertes par des bicouches continues.

Lorsqu'on utilise la méthode de fusion des vésicules (Fig. 80b), la bicouche remplit la rugosité du substrat (Fig. 82a). Cela est probablement dû au fait que la bicouche plane est formée à partir de rupture de vésicules de grande taille (diamètre ~ 200 nm).

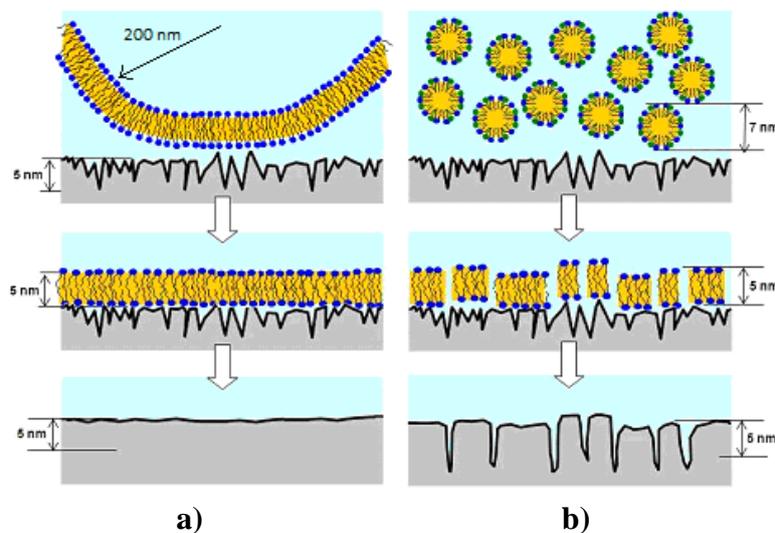


Figure 82. Modification de la rugosité de surface en fonction de la méthode du dépôt des bicouches lipidiques : (a) fusion des vésicules; (b) co-adsorption des micelles.

D'autre part, lors de l'utilisation de la méthode de co-adsorption des micelles (Fig. 80a), du fait de la petite taille des micelles (diamètre $\sim 6-8\text{nm}$) la bicouche se forme à partir de la fusion de tous petits « morceaux » de bicouches lipidiques qui ne peuvent probablement pas couvrir les zones très rugueuses (Fig. 82b). Dans ce cas, la structure résultante de la bicouche déposée sur substrat rugueux est beaucoup plus rugueuse, mais aussi probablement moins continue que celle obtenue avec la méthode de fusion des vésicules. De plus celle-ci peut facilement évoluer et se dégrader lors du glissement prolongé (Fig. 83).

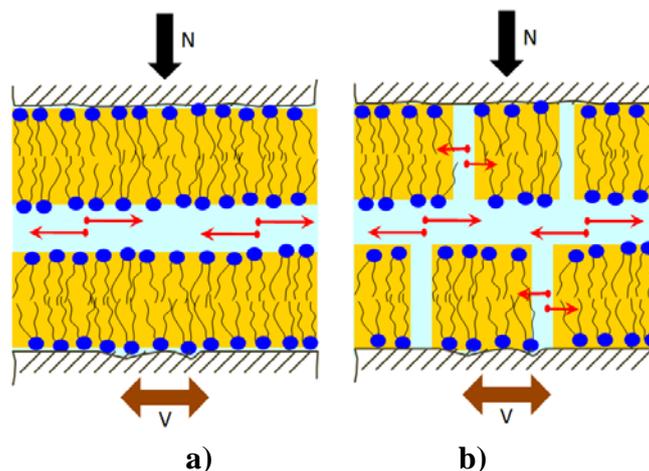
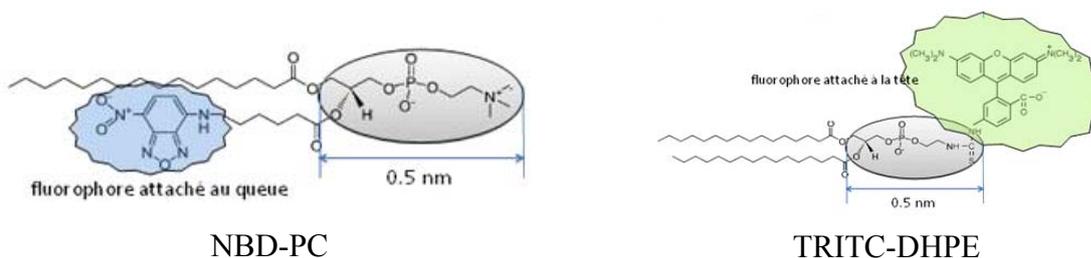


Figure 83. Représentation schématique des essais de frottement utilisant des interfaces phospholipidiques de type : DOPC_v (a) et DOPC_m (b)

C2.2. Rugosité « moléculaire » des interfaces phospholipidiques

On peut également faire varier la rugosité de la bicouche lipidique à l'échelle moléculaire en utilisant deux types différents de fluorophores (Fig. 58) :

- le NBD (attaché aux queues phospholipidiques) qui n'influence pas l'interface entre la bicouche et le milieu aqueux) ;
- le TRITC (attaché aux têtes phospholipidiques) qui génère par sa présence des têtes plus grosses et chargées.



Concernant l'influence du fluorophore sur la continuité de l'interface lipidique, on n'a pas observé de différences en ce qui concerne l'imagerie AFM des bicouches DOPC contenant du NBD et respectivement de TRITC. Ceci est probablement dû au fait que les fluorophores présents en faible quantité sont très mobiles sur la pointe AFM lors du balayage.

Les résultats par rapport à l'influence du fluorophore sur le comportement tribologique des interfaces DOPC concernant la variation des coefficients de frottement et l'évolution de la dégradation des interfaces lipidiques au niveau du contact sont synthétisés dans la fig. 84.

Les valeurs du coefficient de frottement varient en fonction des caractéristiques des interfaces lipidiques (Fig. 84a) :

- avec des bicouches $DOPC_v$ contenant du NBD la valeur initiale (*i.e.* en début d'essais) du coefficient de frottement est $\mu = 0,013 \pm 0,003$ tandis que pour les bicouches $DOPC_m$ contenant du NBD la valeur initiale (*i.e.* en début d'essais) du coefficient de frottement est $\mu = 0,03 \pm 0,002$. Après 50 min de frottement, la valeur du coefficient de frottement est légèrement plus élevée, $\mu = 0,015 \pm 0,003$ pour le $DOPC_v$ et $\mu = 0,032 \pm 0,006$ pour le $DOPC_m$;

Ce résultat est corrélé avec une absence de la dégradation des interfaces phospholipidiques $DOPC_v$ et $DOPC_m$ présentes dans le contact lors du frottement, dans la solution saline tamponnée, même après 50 min de frottement (Fig. 84b, en haut) :

- sans fluorophore, les valeurs des coefficients de frottement sont comparables et ne varient pas ;
- pour les essais de frottement utilisant des bicouches contenant de TRITC (fluorophore attaché à la « tête » phospholipidique) à la place des bicouches contenant de NBD (fluorophore attaché sur la « queue ») on a obtenu un coefficient de frottement initial plus de 3 fois supérieur et qui a presque doublé à la fin d'essai de frottement : $\mu = 0,05$ et respectivement 0,096 pour les interfaces $DOPC_v$ et $\mu = 0,08$ et respectivement 0,13 pour les interfaces $DOPC_m$;

Cette évolution du coefficient de frottement a été corrélée avec une très forte dégradation des bicouches $DOPC_v$ et $DOPC_m$ dans le contact (Fig. 84b, en bas).

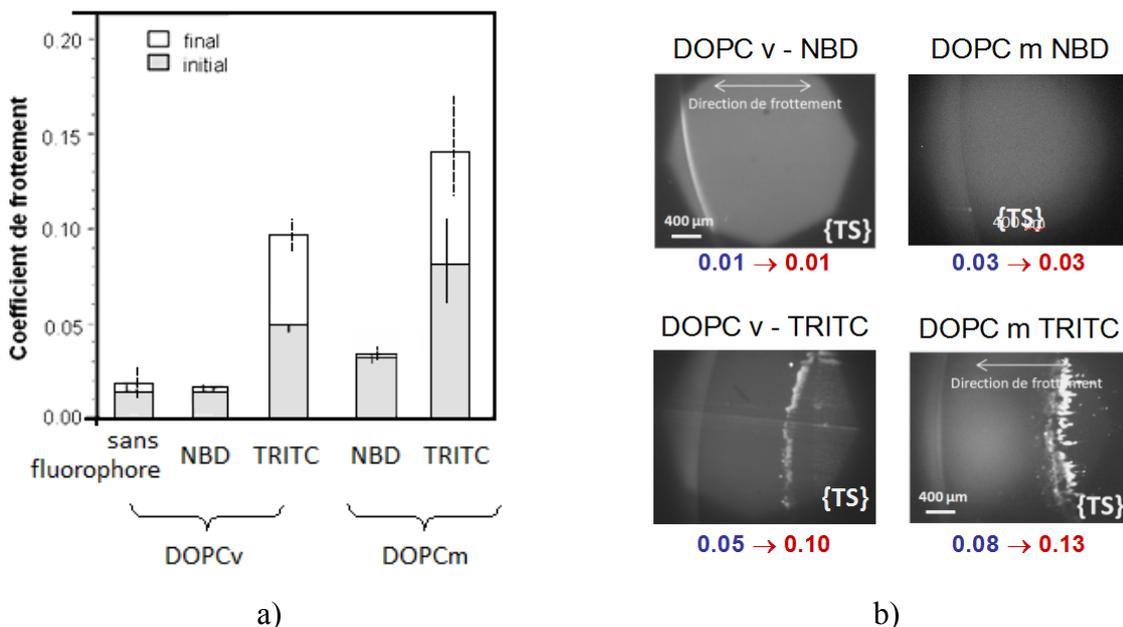


Figure 84. Comportement tribologique des interfaces $DOPC_v$ et $DOPC_m$ – influence de la rugosité moléculaire mimée à l'aide de deux fluorophores attachés sur la tête (TRITC) et respectivement sur les queues (NBD) des phospholipides

- a) Les valeurs moyennes du coefficient de frottement sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement) Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées.
- b) Visualisation in situ de la limite de la zone de contact entre la lentille HEMA et la plaque de verre recouvertes de DOPC montrant une éventuelle dégradation de la bicouche (les images ont été réalisées en lumière « bleue » ou « verte » en accord avec les caractéristiques du fluorophore utilisé : NBD et respectivement TRITC).

Absence de dégradation des deux bicouches DOPC-NBD dans une solution saline tamponnée {TS} (tampon Tris pH 7,2 avec 150 mM de NaCl) (**en haut**);

Forte dégradation de deux bicouches DOPC-TRITC dans une solution saline tamponnée {TS} (tampon Tris pH 7,2 avec 150 mM de NaCl), après 50 min de frottement (**en bas**).

Les bicouches DOPC contenant du NBD (dont la partie fluorescente est attachée à la queue des acides gras phospholipidiques, donc à l'intérieur de la bicouche, Fig. 85b) sont de meilleurs « lubrifiants » que les bicouches DOPC contenant du TRITC (dont la partie fluorescente est attachée à la tête). Ces bicouches DOPC_m ou DOPC_v contenant du NBD assurent un coefficient de frottement plus faible et stable et ne présentent aucune dégradation après 50 min de frottement (comparer dans la fig. 84b les images en haut), de même que les interfaces phospholipidiques dites « de contrôle » (qui ne contiennent pas de marqueur fluorescent mais seulement du DOPC, fig. 85a,b).

Pour le cas des interfaces phospholipidiques (DOPC_v ou DOPC_m) contenant du TRITC (fluorophore attaché à la tête polaire du phospholipide), la différence de la taille et de la charge des têtes des lipides fluorescents semble induire une perturbation des couches d'hydratation ou un encombrement stérique direct entre les deux bicouches (Fig. 85c) qui influence ainsi le comportement tribologique de ces interfaces (augmentation du coefficient de frottement et forte dégradation pendant les essais, Fig. 84).

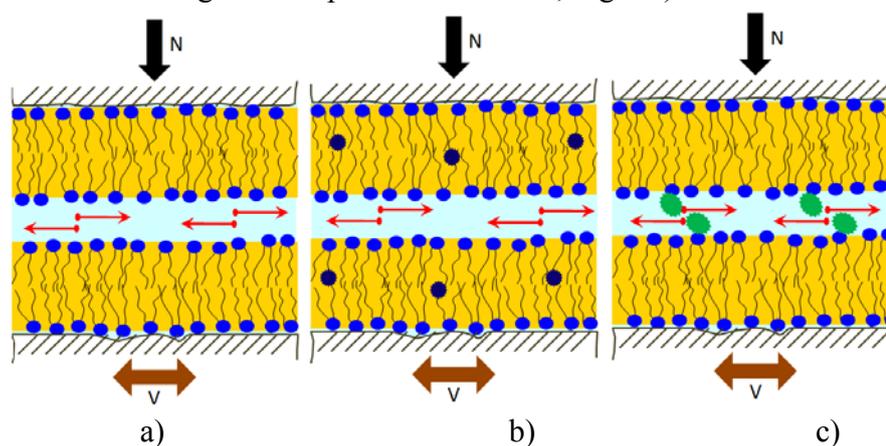


Figure 85. Représentation schématique des essais de frottement utilisant des interfaces lipidiques contenant différents types de fluorophore

(a) sans lipides fluorescents; (b) bicouches contenant du NBD; (c) bicouches contenant du TRITC;

C2.3. Discussions et conclusions

Les résultats des essais tribologiques effectués pour étudier l'influence de la rugosité du substrat (1^{er} corps) et de la structure moléculaire des interfaces lipidiques (induisant une certaine « rugosité » moléculaire locale) sur leurs comportement tribologique nous indiquent que :

- **la rugosité du substrat :**

- influence de manière significative le comportement tribologique des interfaces de type DOPC_m en générant des discontinuités dans la couche lipidique ;
- n'influence pas le comportement tribologique des interfaces de type DOPC_v ayant la capacité de « combler » la rugosité du substrat.

Ces résultats sont importants car le fluide synovial (comme montré dans la *Fig. 7, partie A*, [52]) possèdent dans sa structure volumique un surplus de vésicules lipidiques qui pourront combler les rugosités données par une usure légère du cartilage articulaire.

D'autre part, les études récentes de Klein *et al.* [21,24] ont mis en évidence le rôle des interfaces lipidiques de type vésicules (liposomes de PC) dans la diminution de frottement, avec des valeurs du μ d'environ 2×10^{-5} pour une pression moyenne allant jusqu'à 12MPa.

- **à l'échelle moléculaire (rugosité « locale ») :**

- indépendamment de la méthode d'obtention des interfaces phospholipidiques, la rugosité induite par la présence des molécules ayant des têtes lipidiques larges et chargées influence de manière significative l'évolution/augmentation du coefficient de frottement qui favorise la dégradation accentuée des interfaces lipidiques.

Dans les essais tribologiques présentés dans ce manuscrit, cette rugosité a été modifiée de manière non-biologique, par l'utilisation des marqueurs fluorescents mais, de manière biologique, ces modifications peuvent être présentes *in vivo* lors de différentes pathologies articulaires, comme dans le cas de couplage de différentes protéines aux têtes phospholipidiques [48,58].

C3. Simulation des modifications physico-chimiques associées aux pathologies

C3.1. Paramètres expérimentaux étudiés

Afin d'étudier le rôle de la couche aqueuse dans le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques de type DOPC_v et DOPC_m, nous avons considéré les **paramètres expérimentaux suivants**:

- Piégeage ou non de la couche aqueuse par les bicouches lipidiques :
 - Couche aqueuse en l'absence de lipides ;
 - Couche aqueuse en présence d'une seule bicouche lipidique déposée sur la surface en HEMA ;
 - Couche aqueuse en présence de deux bicouches lipidiques, déposées sur chaque surface de 1^{er} corps (HEMA et verre) ;
- Influence des propriétés physico-chimiques de la couche aqueuse (pH – stabilité et variation, présence des ions et du milieu tamponné).

Pour la visualisation des interfaces DOPC à la fin des essais de frottement, *on a utilisé comme fluorophore le NBD*, dont la présence n'influence pas le comportement tribologique lors des essais de frottement des interfaces phospholipidiques (§C2.2.).

C3.2. Milieu tamponné (solution buffer)

Une **solution buffer/tampon** est une solution aqueuse constituée d'un mélange d'un acide faible et sa base conjuguée (sel d'acide faible) ou une base faible et son acide conjugué. Son pH varie très peu quand une petite quantité d'acide fort ou une base est ajoutée. Les solutions tampon sont utilisées comme un moyen de maintenir le pH à une valeur presque constante dans un large éventail d'applications (bio)chimiques. Beaucoup de formes de vie ne prospèrent que dans une plage de pH relativement faible de sorte qu'ils utilisent une solution tampon pour maintenir un pH constant. Ainsi, *in vivo*, les fluides corporels constituent des solutions buffer/tampons tel que le sang, qui maintiennent un pH à ou près de pH = 7.4. La valeur physiologique de pH étant d'~7.4, une valeur *in vivo* de pH <6,9 ou pH > 7,8 peut mettre la vie en danger. Une condition essentielle dans le choix du tampon pour les études biologiques est sa constante d'acidité (pK_a), qui doit être entre 6 et 8. Plusieurs systèmes tampon peuvent donc être utilisés dans les études biologiques (*leur formule de préparation est indiquée en annexe*).

Le **Tris** (*tris(hydroxyméthyl)aminométhane*, **pH de 7,1 à 9**) est le tampon le plus souvent utilisé dans les travaux de recherches biologiques, biochimiques et de biologie moléculaire [25]. Son pK_a étant de 8.08 à 25°C, il ne peut donc être utilisé à des valeurs de pH inférieures à 7.2 ou au dessus de 9.0. Il peut être utilisé seul en tant que tampon ou bien en tant que composant d'une formulation mixte de buffer (ex. *TRIS-maléate*, pH 5.8-8.2) [42].

Avantages

- bonne capacité de stabiliser le milieu à un pH plus élevé, requis pour certains tissus et certaines procédures cytochimiques ;
- physiologiquement « inerte ».

Inconvénients

- la solution tampon présente des faibles variations du pH avec la variation de la température*, elle doit donc être préparée à la température à laquelle sera utilisée.

Pour « couvrir » la plage de pH nécessaire aux essais tribologiques (§C3.3.) en fonction des besoins, on a utilisé (Fig. 86) :

- pour **ne pas changer la molécule du tampon** :
 - o un milieu tamponné TRIS (pH 7.2 et 8.4) ;
 - o un milieu tamponné TRIS maléate (pH 5.6) ;
- pour les études visant à identifier **l'influence de la molécule du tampon** sur le comportement tribologique des bicouches phospholipidique
 - o un milieu tamponné acétate (pH 5.6).
 - o un milieu tamponné TRIS maléate (pH 5.6) ;

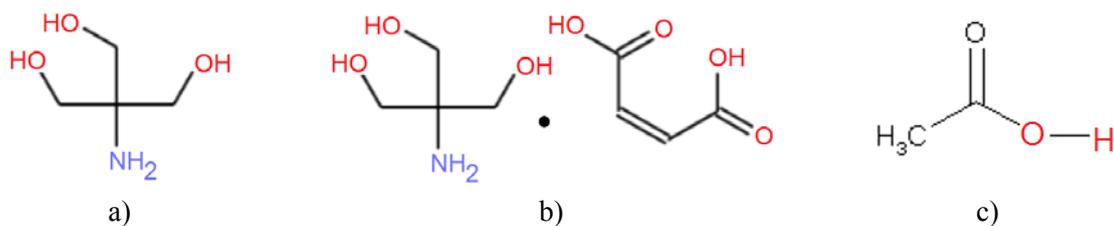


Figure 86. Structure chimique des molécules tampon utilisées
(a) TRIS; (b) TRIS-maléate; (c) acétate

Les réactions chimiques à l'équilibre pour les systèmes tampon choisis sont indiquées dans la figure 87.

La présence de ces molécules sous forme ionisée (cations pour le TRIS et anions pour l'acétate et le maléate) dans la couche aqueuse peut induire des interactions électrostatiques avec les têtes phospholipidiques composantes les bicouches et ainsi influencer leur comportement tribologique.

* TRIS a un pK_a de 8,55 à 0°C, 8,06 à 25°C et 7,22 à > 37°C, donc une variation moyenne $\Delta\text{pH}/\Delta T = 0.03$ unités de pH pour chaque variation d'1°C.

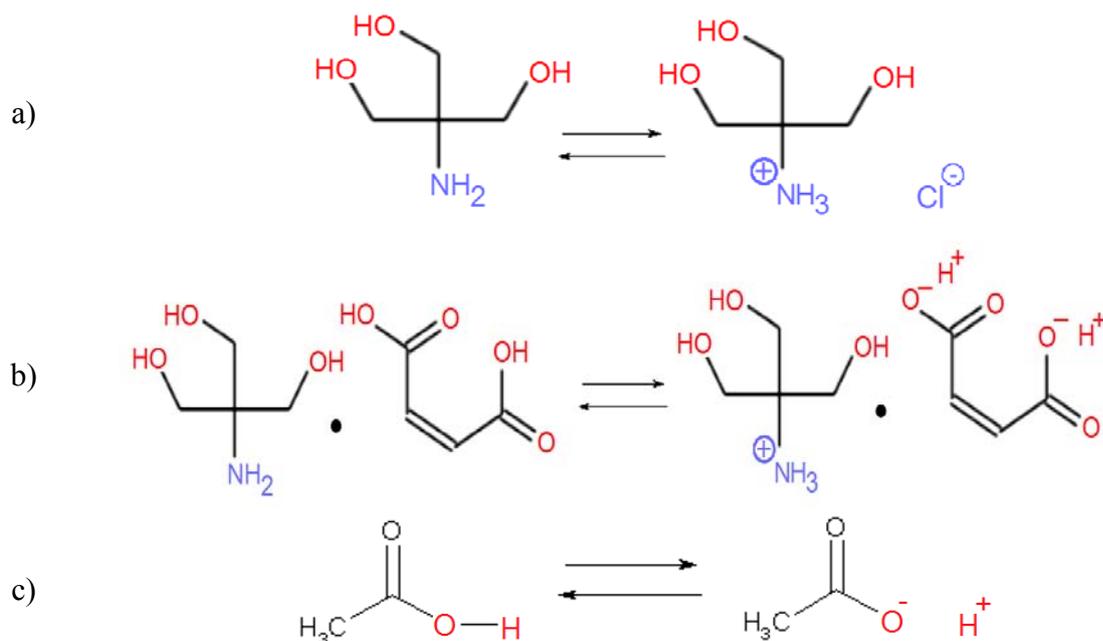


Figure 87. Réactions chimiques à l'équilibre des milieux tampon utilisés
(a) TRIS; (b) TRIS-maléate; (c) acétate

C3.3. Résultats

Les images de microscopie en fluorescence des surfaces de contact recouverts des interfaces phospholipidiques fluides DOPC avant le frottement ont montré que les surfaces des 1^{ers} corps (HEMA hydratée et verre) permettent l'adhésion physico-chimique d'une interface phospholipidique avec fluorescence uniforme (*Partie C1*), ce qui signifie que les essais tribologiques qui seront présentés par la suite ont révélé les caractéristiques de frottement des interfaces DOPC_m et respectivement DOPC_v bien définis.

En rapport avec les paramètres choisis pour reproduire *ex vivo* les variations physico-chimiques des pathologies parmi les résultats obtenus, on peut analyser les situations suivantes :

- Piégeage ou non de la couche aqueuse par les bicouches lipidiques ;
- Influence des propriétés physico-chimiques de la couche aqueuse.

C3.3.1. Piégeage ou non de la couche aqueuse par les bicouches lipidiques

Examinons d'abord le rôle du nombre de bicouches lipidiques déposées (entre 0 et 2). Les variations du coefficient de frottement et l'état des bicouches à la fin des essais de frottement sont présentés dans la figure 88.

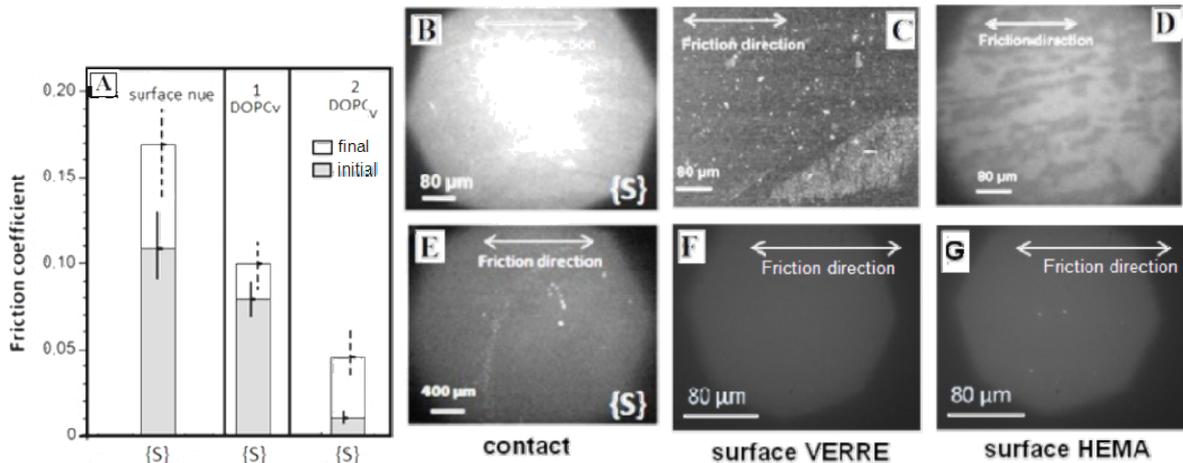


Figure 88. Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-I), en fonction de nombre de bicouches présentes au niveau du contact (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai).

(A) Les valeurs moyennes du coefficient de frottement sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées.

Abréviations: {S}, solution saline (pH 5,6, avec 150 mM NaCl); Les interfaces DOPC ont été déposées sur les surfaces de contact en utilisant la méthode de fusion des vésicules.

(B-G) Visualisation des interfaces phospholipidiques en fin de frottement (50 min) :

- l'image de contrôle initial, avant de commencer le glissement des surfaces, présente une fluorescence homogène (non montrée, mais comparable à celle de la figure 65c) ;
- (B) Zone d'adhésion au niveau du contact pour le cas d'une seule bicouche DOPC_v (déposée avant le début de frottement sur la surface de HEMA) après frottement dans une solution saline {S} ; en fin d'essais, on observe une forte dégradation de la bicouche sur la surface de HEMA (C) suite à son transfert sur la surface de verre (D) ;
- Faible dégradation de deux bicouches DOPC_v au niveau du contact (E) et après avoir séparé les 2 surfaces en contact : (F) verre et (G) HEMA dans une solution saline {S} ;

Pour les surfaces nues (sans dépôt d'interfaces phospholipidiques), le coefficient de frottement initial dans une solution saline est grand ($\mu = 0,11$) et sa valeur finale après 50 min d'essais de frottement continue à augmenter ($\mu = 0,17$).

Pour le cas **d'une seule bicouche DOPC_v dans le contact** (déposée sur la surface de HEMA) on a mesuré un coefficient de frottement $\mu = 0,08$ (en début d'essai de frottement) et $\mu = 0,10$ (à la fin), fig. 88A, valeurs qui sont similaires aux résultats obtenus sans bicouches lipidiques. De plus, en fin d'essais on constate au niveau du contact la présence des zones d'adhésion (Fig. 88B) et on observe une forte dégradation de la bicouche initialement déposée sur la surface de HEMA (Fig. 88C) suite à son transfert sur la surface de verre (Fig. 88D). Le coefficient de frottement élevé et qui augmente avec le temps pendant l'essai est donc corrélé à l'apparition de zones d'adhésion et de dégradation de l'interface phospholipidique. De plus, pour le cas d'une seule bicouche dans le contact, la présence des pics d'adhésion a été observée sur la courbe de frottement (Fig. 89A). Une fois que le mouvement a été initié dans une seule direction, la force de cisaillement augmente linéairement dans le temps jusqu'à ce que la force de frottement statique ait été atteinte. Cette force, qui est nécessaire pour initier le glissement, est plus élevée que la force dynamique nécessaire pour la poursuite du

mouvement dans l'état stationnaire. Cette séquence de frottement statique-dynamique a été observée après chaque inversion de la direction de glissement, comme on peut observer dans la figure 89A.

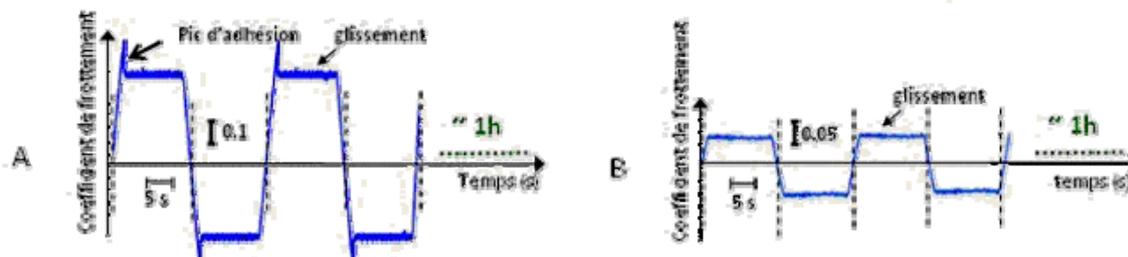


Figure 89. Formes typiques de courbes de frottement

Courbe A est une courbe typique « force de cisaillement transmise vs temps » pour le cas **d'une seule bicouche lipidique** au niveau du contact et de l'eau ultra pure en tant que lubrifiant; le pic d'adhésion montre l'accouplement rigide des surfaces (HEMA et verre). *Courbe B* est une courbe typique « force de cisaillement transmis vs temps » entre **deux bicouches lipidiques** et de l'eau ultra pure comme lubrifiant.

Pour le cas **de deux bicouches DOPC_v dans le contact**, par rapport aux surfaces nues et aux surfaces recouvertes avec une seule bicouche, on constate une diminution significative du coefficient de frottement en début et à la fin des essais, avec toujours la même tendance d'augmentation de μ en fin d'essai (Fig. 88). Les courbes de frottement typiques obtenues pour le cas de deux bicouches en contact lors des essais de frottement sont présentées dans la fig. 89B et ne présentant pas de pic d'adhésion.

Dans ce cas, les bicouches au niveau du contact sont seulement légèrement dégradées (Fig. 88E) ce qui nous indiquent que lorsqu'il s'agit de deux bicouches dans la région de contact, le plan de glissement est situé dans la couche aqueuse de quelques nanomètres d'épaisseur qui se situe entre les deux bicouches phospholipidiques (Fig. 90b). Ainsi, après 50 min de frottement dans une solution saline, le coefficient de frottement est réduit d'un facteur d'environ 2 dans le cas de deux bicouches DOPC_v ($\mu \sim 0,045$ à la fin, fig. 88A) par rapport au cas avec une seule bicouche, et d'un facteur 3 par rapport aux substrats nus et une forte dégradation à la fin de l'essai de frottement (Fig. 88D). En début de frottement les différences sont encore plus grandes ($\mu = 0,015$ avec 2 bicouches, $\mu = 0,08$ avec 1 bicouche et $\mu = 0,111$ sans bicouche).

La valeur obtenue dans le cas d'une bicouche est similaire à la gamme de mesures effectuées sur deux monocouches de phospholipides dans l'air avec des milieux différents par Israelachvili *et al.* [53] cas où des pics d'adhésion attribués aux phénomènes de *stick-slip* ont également été observés. Ceci correspond à un plan de glissement lors du frottement, situé soit à l'interface correspondant au mi-plan monocouche-monocouche soit à l'interface entre les têtes polaires et le substrat (Fig.90a), alors que dans le cas de 2 bicouches ce plan se localise vraisemblablement dans la couche aqueuse entre les deux bicouches (Fig. 90b).

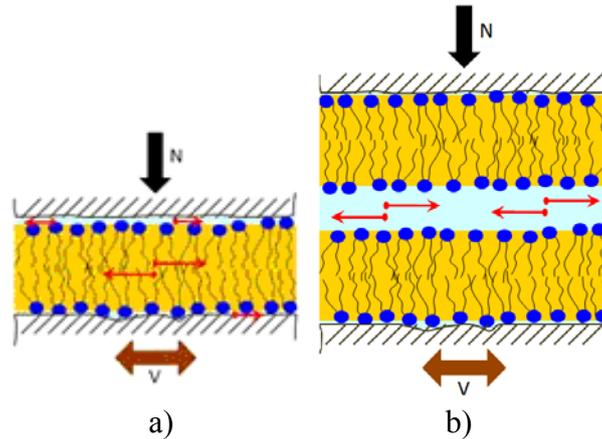


Figure 90. Accommodation de vitesse lors des essais de frottement utilisant 1 et respectivement 2 interfaces lipidiques dans le contact

Par rapport à ces résultats obtenus, pour la suite des essais de frottement, on a utilisé seulement le cas de deux bicouches phospholipidiques.

C3.3.2. Rôle du milieu tampon (stabilisateur du pH) et de la présence des ions

Comme le milieu vivant est un milieu avec un pH stable on a étudié l'influence de la présence d'un milieu aqueux tamponné ou non, salé ou non sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques de type DOPC_v et DOPC_m :

- **pour les bicouches DOPC_v** , lorsqu'une solution saline ou saline tamponnée ont été utilisées, les valeurs initiales (*ie.* en début d'essais) des coefficients de frottement ne sont pas significativement différentes et incluses dans l'intervalle $\mu = (0,011-0,019) \pm 0,003$. D'autre part, après 50 min de frottement, la valeur du coefficient de frottement est plus élevée dans une solution saline ($\mu = 0,046 \pm 0,006$) que dans la solution saline tamponnée ($\mu = 0,015 \pm 0,003$) (Fig. 91A).
- Ces résultats sont corrélés avec différents degrés de dégradation des bicouches DOPC_v présentes dans le contact lors du frottement (Fig. 91B-E):
 - o dégradation faible mais « identifiable » dans le cas d'une solution saline (Fig. 91B) ;
 - o absence de la dégradation dans la solution saline tamponnée, même après 50 min de frottement (Fig. 91C).
- en présence **de deux bicouches de type DOPC_m au niveau du contact**, dans la solution saline, le coefficient de frottement initial est grand ($\mu = 0,07$) et augmente à $\mu = 0,14$ après 50 min de frottement, ce qui engendre aussi la dégradation de la bicouche (Fig. 91D), tandis que dans un milieu aqueux tamponnée Tris salin les coefficients de frottement sont faibles et stables ($\mu = 0,035$) lors du frottement prolongée (Fig. 91A) et la fluorescence de la bicouche reste parfaitement homogène (Fig. 91E).

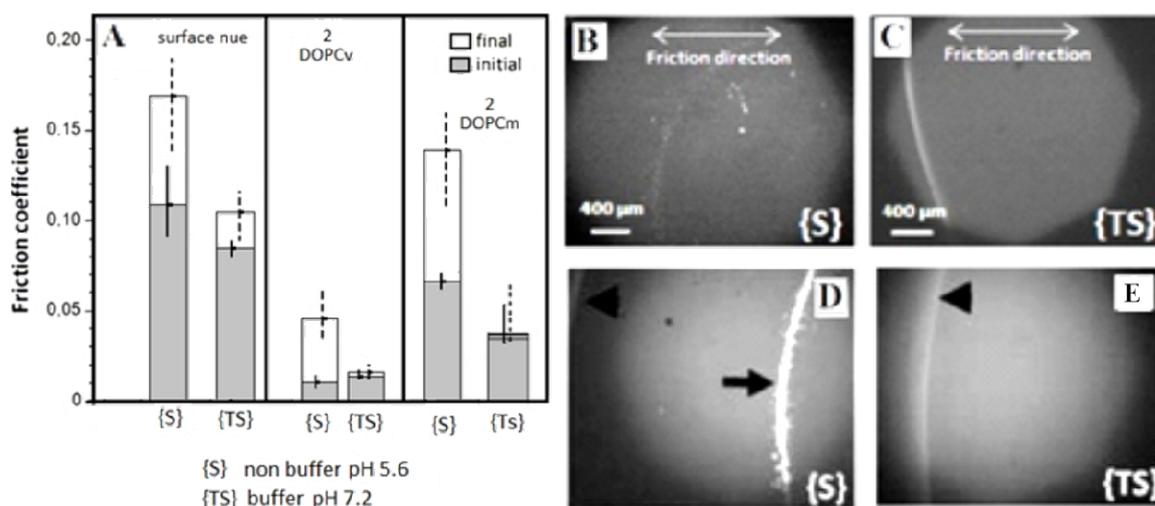


Figure 91. Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-E), en fonction de la stabilité du milieu aqueux (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai).

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement (A) sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement, à l'exception des mesures {W} qu'on a arrêté après 20 minutes en raison des coefficients de frottement excessifs qui pourraient endommager les surfaces de verre). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre minimum et maximum des valeurs mesurées.

Abréviations: {S}, solution saline (pH 5.6 avec 150 mM NaCl); {TS}, solution saline tamponnée (tampon Tris pH 7,2 avec 150 mM de NaCl); Les interfaces DOPC ont été déposées sur les surfaces de contact en utilisant la méthode de fusion des vésicules et respectivement celle de co-adsorption de micelles.

(B-E) Visualisation des interfaces en fin d'essais de frottement (après 50 min) :

- (B) Faible dégradation de deux bicouches DOPC_v dans une solution saline {S} ;
- (C) Absence de dégradation de deux bicouches DOPC_v dans une solution saline tamponnée {TS} ;
- (D) forte dégradation après 50 min de frottement des bicouches DOPC_m dans la solution saline, {S} ;
- (E) très faible dégradation des bicouches DOPC_m dans {TS} après 50 minutes de frottement ;

Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées.

La différence entre les résultats obtenus pour DOPC_m et DOPC_v peut être due à l'existence de plus de défauts (trous) dans la bicouche DOPC_m dû à l'élimination lente du détergent (comme on l'a vu dans le paragraphe C1.2.1.2., fig. 63).

Par contre, les résultats obtenus dans les deux cas (bicouches DOPC_m et DOPC_v) montrent que le milieu aqueux tamponné {TS} stabilise et améliore les propriétés des bicouches. Cette stabilité peut être liée :

- à la présence des ions dans le milieu aqueux
- à la stabilisation du pH par une solution tampon.

Néanmoins, comme on le voit sur la figure 92, la seule présence du tampon TRIS (sans ions sodium supplémentaires) suffit à stabiliser et lubrifier l'interface.

Par conséquent, la stabilisation du pH par le milieu tamponné est plus importante que l'effet des ions sodium. Cela pourrait être dû à une adsorption des molécules tampon sur les têtes des

phospholipides qui pourrait rigidifier la bicouche. Pour vérifier cette hypothèse, les propriétés nano-mécaniques des bicouches DOPC_m dans le milieu tampon {T} et celui contenant en plus des ions {TS} ont aussi été analysés par AFM (Fig. 93).

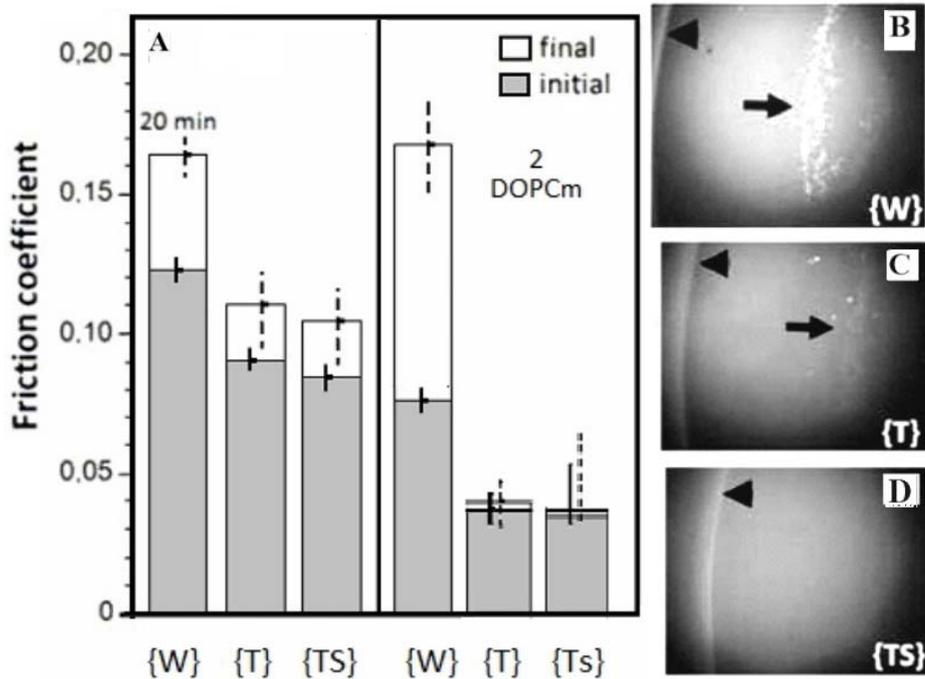


Figure 92. Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-C), en fonction de la présence des ions dans un milieu aqueux stable (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai).

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement (A) sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement, à l'exception des mesures {W} qu'on a arrêté après 20 minutes en raison des coefficients de frottement excessifs qui pourraient endommager les surfaces de verre). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre minimum et maximum des valeurs mesurées.

Abréviations: {W}, eau, pH 5.6; {T}, solution tampon Tris pH 7.2; {TS}, solution saline tamponnée (tampon Tris pH 7.2 avec 150 mM de NaCl). Les interfaces DOPC ont été déposées sur les surfaces de contact en utilisant la méthode de co-adsorption de micelles.

(B-D) Visualisation des interfaces en fin d'essais de frottement (après 50 min) :

(B) forte dégradation des bicouches DOPC_m dans l'eau, {W} ;

(C) très faible dégradation dans les solutions tampons Tris, en l'absence de sel, milieu {T} ;

(D) absence de dégradation avec le sel, milieu {TS}, après 50 minutes de frottement.

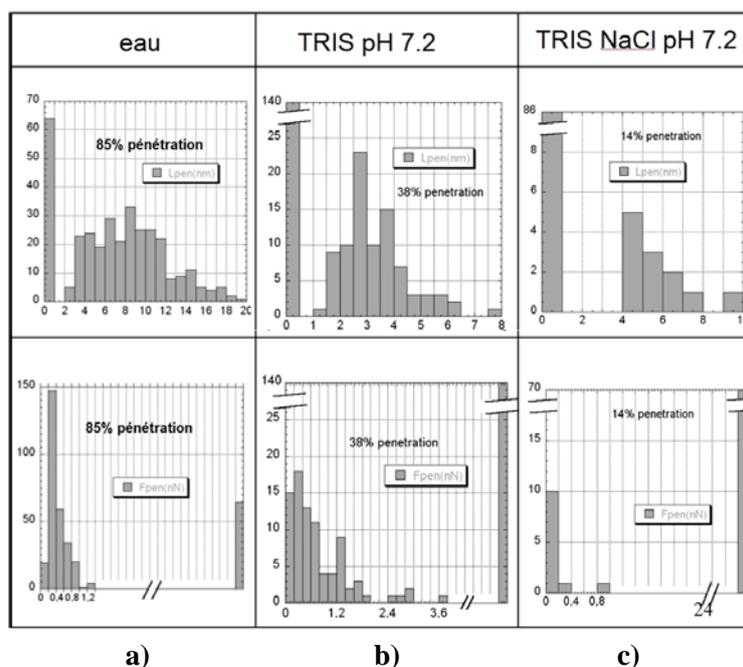


Figure 93. Influence de la présence des ions dans la couche aqueuse sur la résistance nano-mécanique à l'indentation des bicouches DOPC_m - spectroscopie de force AFM [PFE B Munteanu, 2010].
 Ligne du haut : profondeur pénétrée (en nm) ; ligne de bas : force de pénétration. Le pourcentage de courbes avec indentation est indiqué.

Ainsi, les résultats obtenus montrent que dans un milieu aqueux avec pH stable (présence du tampon Tris, Fig. 93b) les interfaces phospholipidiques résistent mieux à l'indentation de la pointe AFM par rapport à l'indentation dans l'eau (Fig. 93a). Ainsi, on mesure seulement 38% de probabilité de rompre les bicouches contre 85% dans l'eau, à une force moyenne d'environ 0.8 nN (seulement 0.35 dans l'eau). La présence des ions (Fig. 93c) augmente encore plus la résistance de la bicouche : elle est rompue par la pointe AFM avec une probabilité de 14% (résultats B. Munteanu, Fig. 93c) ou seulement 4% (résultats F Dekkiche, 2010, non représentés), avec une force de rupture allant jusqu'à 20nN.

La bonne résistance à l'indentation de la bicouche DOPC dans la solution saline est en accord avec une étude détaillée de la spectroscopie de force qui a montré que plus la force ionique est élevée, plus la force qui doit être appliquée avec l'AFM pour rompre la bicouche doit être élevée [23]. Les auteurs expliquent la résistance plus grande à la pénétration par une augmentation des interactions latérales lipides-lipides (c.à.d. de la cohésion de la bicouche) promus par des ions (Na⁺, Ca²⁺) liés à la membrane lipidique.

Cette conclusion est étayée par différents résultats expérimentaux et théoriques. Ainsi, quand la force ionique augmente, la charge des liposomes PC (qui est négative en l'absence de sel ajouté) augmente, en raison de l'adsorption d'ions positifs et est proche de zéro à environ 100mM NaCl [23,39]. Il a été également trouvé que l'augmentation de la concentration de NaCl diminue l'autodiffusion des lipides de type POPC dans la bicouche. Des simulations de dynamique moléculaire ont révélé une liaison étroite des ions sodium aux oxygènes carbonyles de trois lipides, en moyenne, conduisant ainsi à des plus grands complexes à

mobilité réduite [5]. Ce système simple pourrait expliquer la résistance à l'indentation normale de bicouches DOPC_m dans un tampon Tris (pH 7.2) en l'absence de NaCl si l'on suppose que les cations de la molécule de Tris s'adsorbent à la bicouche (Fig. 94).

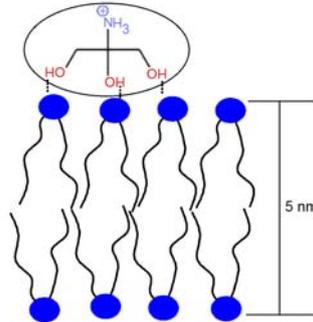


Figure 94. Schéma d'un possible couplage chimique entre la molécule de tampon TRIS et la bicouche lipidique

Ainsi, la molécule de TRIS peut se coupler chimiquement aux têtes des phospholipides, générant ainsi une rugosité moléculaire locale au niveau de la bicouche qui détermine l'augmentation du coefficient de frottement suite au cisaillement (voir aussi §C2.2.) et de la résistance mécanique à l'indentation (Fig. 93b).

Les résultats présentés montrent une nette différence pour le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques en cas de frottement dans un **milieu tamponné**, (buffer {T} et tamponnée saline, buffer {TS}) par rapport au frottement dans l'eau : forte baisse et stabilité du coefficient de frottement, l'absence de dégradation des bicouches en fin d'essais.

Par contre, la présence des ions influence mais pas significativement le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques.

C3.3.3. Rôle du type de molécule tampon

Pour mettre en évidence un peu plus encore le rôle de la molécule de buffer présente dans la couche aqueuse sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques, à une même valeur du pH (stable car solution tamponnée) on a utilisé les solutions suivantes à même pH (Fig. 95) :

- eau ultra pure, pH 5.6 ;
- tampon Tris maléate, pH 5.6 ;
- tampon acétate, pH 5.6.

Les résultats obtenus (Fig. 95) indiquent une nette différence entre les valeurs du coefficient de frottement

- pour un milieu aqueux avec un pH non stable ($\mu = 0,075$ en début et respectivement 0.17 en fin d'essais de frottement dans l'eau ultra pure) ;
- pour un milieu aqueux ayant un pH stabilisé par la présence du buffer, pour deux molécules de tampon différentes :

- $\mu = 0,01$ pour le **buffer acétate** {Ac} en début et à la fin du frottement ;
- $\mu = 0.02$ pour le **buffer tris** {Tm} en début de frottement et respectivement $\mu = 0.05$ à la fin de frottement.

Cette évolution des coefficients de frottement est corrélée avec l'état de dégradation des bicouches en fin d'essais (Fig. 95 B-D). Ainsi, on constate :

- une forte dégradation après 20 min de frottement dans l'eau ultra pure (Fig. 95B) ;
- une faible dégradation dans la solution tamponnée {Tm} (Fig. 95C) ;
- une très faible dégradation dans une solution tamponnée {Ac} (Fig. 95D).

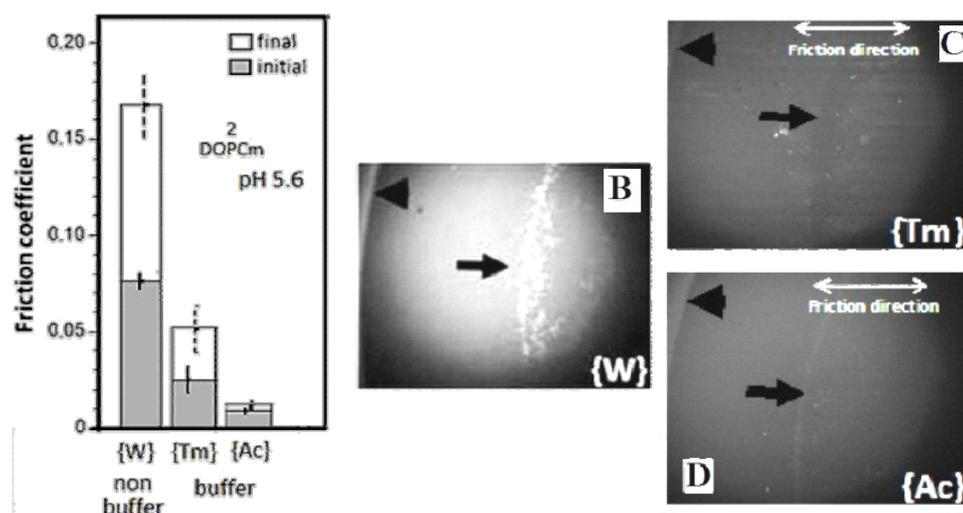


Figure 95. Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-D) en fonction du type de molécule tampon dans le milieu aqueux (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai).

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement (A) sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement, à l'exception des mesures {W} qu'on a arrêté après 20 minutes en raison des coefficients de frottement excessifs qui pourraient endommager les surfaces de verre). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées.

Abréviations: {W}, eau ultra pure (pH ~ 5.6); {Tm}, solution tamponnée (tampon Tris Maléate, pH 5.6); {Ac}, solution tamponnée (tampon Acétate, pH 5.6) ;

Les interfaces DOPC ont été déposées sur les surfaces de contact en utilisant la méthode de co-adsorption de micelles.

(B-D) Visualisation des interfaces en fin d'essais de frottement (après 50 min) :

(B) Dégradation de deux bicouches DOPC_v dans l'eau ultra pure {W} ;

(C) Faible dégradation de deux bicouches DOPC_m dans une solution tamponnée {Tm} ;

(D) Très faible dégradation de deux DOPC_m dans une solution tamponnée {Ac} ;

Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en lumière blanche ou en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées.

Le résultat le plus « spectaculaire » est la diminution d'un facteur 4 du coefficient de frottement dans le cas de l'utilisation du tampon acétate par rapport à l'autre tampon (Fig. 95A), les deux solutions tamponnées ayant le même pH 5.6. Cette variation se reflète aussi dans la stabilité des interfaces DOPC_m pendant l'essai (voir images en fluorescence fig. 95C-

D) où on distingue une légère dégradation lorsque les bicouches frottent dans le tampon Tris Maléate (Tm, Fig. 95C) et presque aucune dégradation dans le cas de tampon acétate (Ac, Fig. 95D).

Afin de comprendre si cette différence du comportement tribologique vient d'une différence de résistance mécanique et/ou de fluidité, une analyse AFM pour caractériser la résistance nano-mécanique à l'indentation des bicouches DOPC_m (Fig. 96) et des mesures de coefficient de diffusion par FRAPP (Fig. 97) dans les mêmes milieux aqueux ont été réalisées.

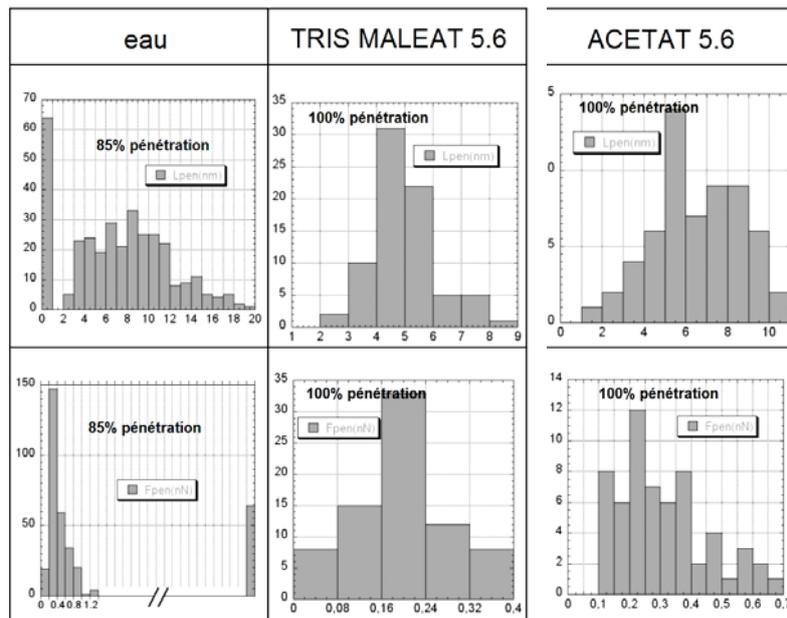


Figure 96. Influence de la molécule de tampon sur la résistance nano-mécanique à l'indentation des bicouches DOPC_m - spectroscopie de force AFM [PFE B Munteanu, 2010].

Ligne du haut : profondeur pénétrée (en nm) ; ligne de bas : force de pénétration. Le pourcentage de courbes avec indentation est indiqué.

A pH 5.6, dans chacun des tampons, les bicouches DOPC_m sont rompues dans 100% des essais de nano-indentation, avec un saut d'environ 4.5 nm qui correspond à l'épaisseur de la bicouche. La force d'indentation est d'environ 0.3 nN pour un milieu contenant le tampon acétate et 0.21 nN pour le cas du tampon Tris maléate.

Par contre, on observe une diminution significative du coefficient de diffusion en présence du tampon acétate (Fig. 97).

Ainsi, l'hypothèse du « pontage » des têtes lipidiques avec des molécules du tampon augmentant la rigidité et diminuant la fluidité paraît trop simpliste ici.

Pour cela, d'autres hypothèses pour ce changement de comportement des interfaces phospholipidiques pourraient être prises en compte :

- le « frottement électrostatique » déterminé par la taille des molécules tampon et le fait qu'à pH 5.6 les bicouches sont 2 fois plus négatives qu'à pH 7.2 ;

- les molécules de tampon pourraient s'intercaler entre les queues lipidiques modifiant ainsi la mobilité des lipides à l'intérieur de la bicouche et donc son caractère fluide.

Afin de valider ou non cette hypothèse, une analyse des coefficients de diffusion intramoléculaire au niveau de la bicouche dans les milieux aqueux étudiés a été effectuée (Fig. 99, *B Munteanu, Pfe 2010*).

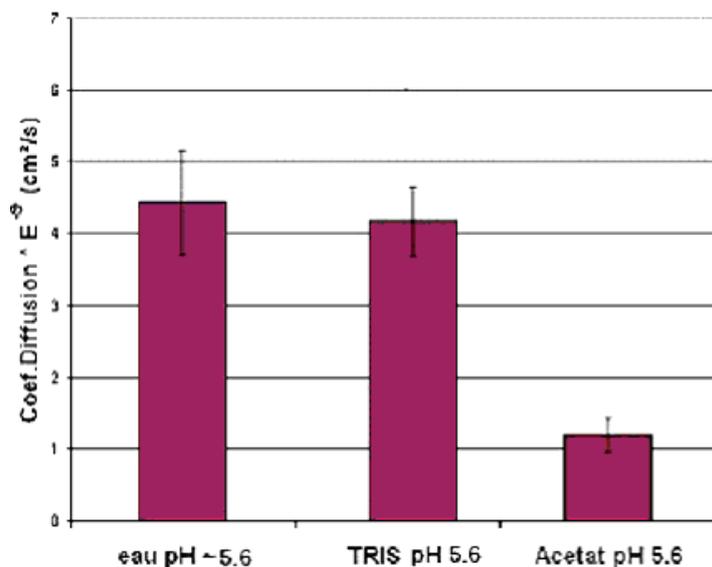


Figure 97. Variation du coefficient de diffusion en fonction de la molécule du tampon (analyse FRAPP) [*Pfe B Munteanu, 2010*)]

Comme les résultats présentés ci avant suggèrent une forte influence de la variation du pH du milieu aqueux sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques, on a choisi par la suite d'étudier plus en détails ces aspects.

C3.3.4. Rôle de la variation du pH (dans un même type de milieu tamponné)

Pour se faire, on a choisi d'étudier le comportement tribologique des interfaces DOPC_m 2 incubations dans des milieux aqueux contenant la même molécule du tampon (TRIS) mais ayant un pH stable différent, respectivement 5.6, 7.2 et 8.4. Les résultats obtenus sont synthétisés dans la figure 98.

Les résultats obtenus (Fig. 98) indiquent une légère différence entre les valeurs du coefficient de frottement dans le cas des milieux tampons à des pH différents, par contre une plus grosse différence en terme d'usure des bicouches lipidiques entre pH 5.6 et les autres deux pH (7.2 et 8.4) :

- au pH 5.6, le coefficient de frottement augment en fin d'essais ($\mu = 0,02$ au début et 0.05 à la fin) corrélé avec une dégradation des bicouches lipidiques (Fig. 98B) ;

- au pH 7.2 et 8.4, le coefficient de frottement à une valeur plus stable et cette tendance se traduit par une absence de dégradation des bicouches en fin d'essais de frottement (Fig. 98C-D).

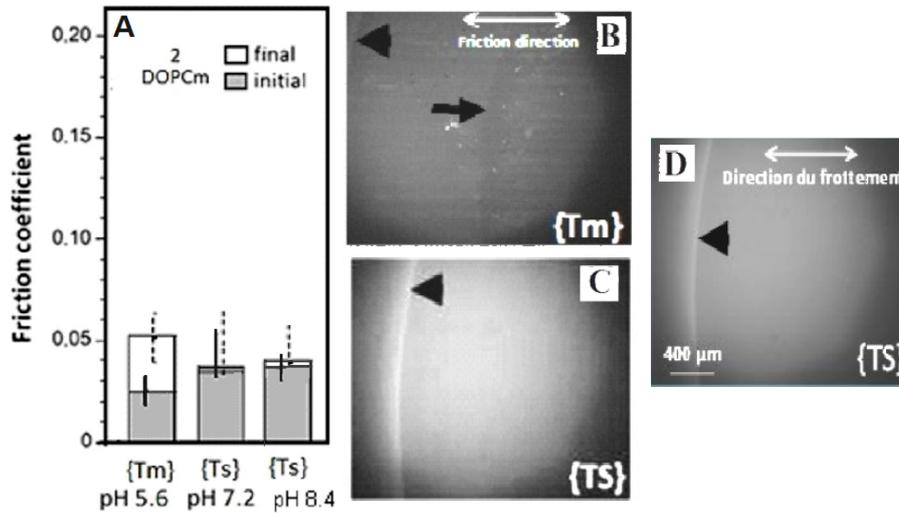


Figure 98. Evolution du coefficient de frottement (A) et état de dégradation des bicouches en fin d'essais (B-D) en fonction de la variation du pH dans le milieu aqueux tamponné avec le Tris (valeurs de coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai).

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement (A) sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées. Abréviations: {Tm}, solution tamponnée (tampon Tris Maléate, pH 5.6) ; {TS}, solution saline tamponnée (tampon Tris pH 7.2 respectivement 8.4 avec 150 mM de NaCl).

Les interfaces DOPC ont été déposées sur les surfaces de contact en utilisant la méthode de co-adsorption de micelles.

(B-D) Visualisation des interfaces en fin d'essais de frottement (après 50 min) :

(B) Faible dégradation de deux bicouches DOPC_m en {Tm} ;

(C-D) Absence de dégradation de deux bicouches DOPC_v en {TS}, pH 7.2 et 8.4;

Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en lumière blanche ou en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées.

On observe que l'usure est minimale dans le cas de pH 7.2 et 8.4, qui semble optimal pour la stabilité des bicouches en cisaillement.

Afin de comprendre plus ces résultats, on a étudié les propriétés nano-mécaniques des bicouches DOPC_m dans les trois milieux tampons à différents pH (Fig. 99).

Les résultats obtenus montrent une faible résistance mécanique à l'indentation des bicouches dans un milieu tampon à pH 5.6 (les bicouches sont rompues dans 100% des cas, avec une faible force de rupture d'environ 0,21 nN et le saut est égale à l'épaisseur d'une bicouche) ; L'augmentation du pH (à 7.2 et 8.4) améliore les propriétés nano-mécaniques des bicouches DOPC (Fig. 99) ; ainsi elles sont plus résistantes à l'action de la pointe AFM (les bicouches sont rompues dans 38% des cas à pH 7.2 et seulement 16% à pH 8.4) à des forces allant jusqu'à 20nN.

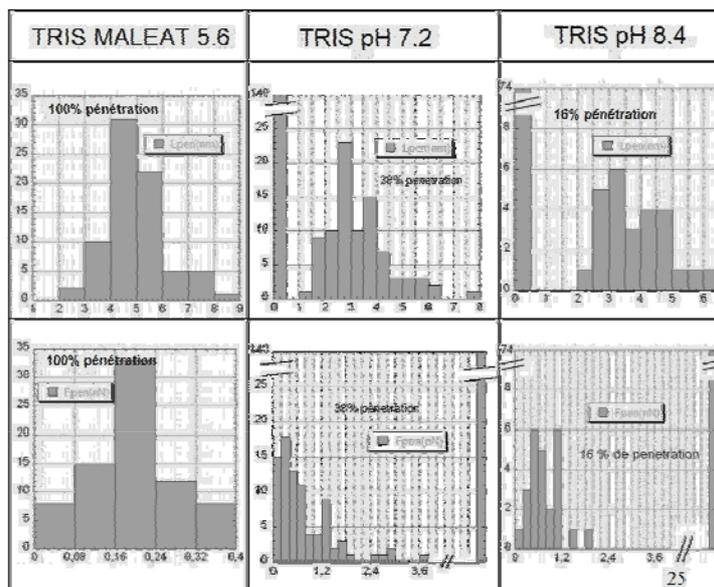


Figure 99. Influence de la variation du pH (dans un milieu stable) sur la résistance nano-mécanique à l'indentation des bicouches DOPC_m - spectroscopie de force AFM [PFE B Munteanu, 2010]
 Ligne du haut : profondeur pénétrée (en nm) ; ligne de bas : force de pénétration. Le pourcentage de courbes avec indentation est indiqué.

On peut émettre une hypothèse en termes de charge électrique pour expliquer ces résultats. La charge de bicouches PC diminue fortement et de façon presque linéaire avec le pH. Cela est dû à l'adsorption probable des ions hydroxyde négatifs [55]: les bicouches sont environ deux fois plus négatives au pH 7.2 qu'au pH 5.6. Il est possible qu'une plus grande charge maintienne une plus grande distance entre les deux bicouches qui leur confère une plus grande stabilité. Des mesures d'épaisseur inter bicouche par FRET (*Flux Resonance Energy Transfert*) sont envisagées.

C3.4. Discussions et conclusions

Dans l'ensemble, les résultats des essais tribologiques nous ont permis d'observer une forte corrélation entre les caractéristiques nano-mécaniques (résistance à l'indentation) des interfaces étudiés (DOPC_m et DOPC_v) [19,40] et leur comportement tribologique (un coefficient de friction faible et stable et l'absence de la dégradation de la bicouche pendant le cisaillement).

Une première conclusion sur les résultats présentés dans ce chapitre montre qu'il y a en général une corrélation positive entre la résistance à l'indentation normale, le coefficient de frottement faible et stable et l'absence de dégradation de la bicouche pendant le cisaillement :

- La corrélation est vraie pour le frottement et la nano-indentation des interfaces DOPC_m dans de l'eau ultra pure (pH 5.6). Elles sont facilement percées, rapidement endommagées et leurs propriétés lubrifiantes diminuent au bout de 20 min de frottement ($\mu \sim 0,15$ que l'on trouve pour les surfaces nues) ;

- Cette corrélation existe également dans une solution tampon Tris (pH 7.2) ou dans un tampon Tris salin (150mM NaCl, pH 7.2), dans ces cas les bicouches résistent complètement aux forces d'indentation allant jusqu'à 20nN, assurent des coefficients de frottement faibles et stables ($\mu = 0,035$) et ne sont pas ou faiblement endommagées sous cisaillement.
- Par contre, cette corrélation n'est pas valable pour des tampons acétate qui pourraient interagir au niveau des queues phospholipidiques en modifiant la fluidité de la bicouche sans pour autant augmenter leur résistance mécanique.

L'utilisation d'un milieu tamponné favorise donc la stabilité et la bonne lubrification par les bicouches. Le sel a un rôle un peu moins important que le pH.

Pour mieux comprendre et confirmer ces résultats, des études plus systématiques combinant AFM (indentation) FRAPP et FRET (mesure d'épaisseurs des couches aqueuses) ainsi que des modélisations en dynamique moléculaire seraient nécessaires.

Une deuxième conclusion par rapport aux résultats obtenus nous permet de montrer que la force de frottement entre les surfaces de 1^{ers} corps revêtues d'interfaces phospholipidiques en phase fluide dépend fortement de la composition de la couche aqueuse. Ainsi, nous avons montré que

1. les interfaces DOPC_m dans l'eau ultra pure (pH 5.5) ne sont pas stables pendant de longues périodes de friction et sont facilement perforés par la pointe d'AFM.
2. l'ajout de sel améliore la résistance à la pénétration, mais pas celle au cisaillement.
3. dans les deux solutions tampon (Tris et Tris salin), les DOPC_m sont plus résistantes et présentent des meilleures propriétés lubrifiantes. Ces effets ont été interprétés en termes d'adsorption des ions dans les bicouches qui peut augmenter la cohésion de la bicouche et la répulsion électrostatique bicouche-bicouche.
4. l'augmentation du pH montre une augmentation de la résistance mécanique des bicouches mais sans conséquences très grandes sur le comportement tribologique.

Klein *et al.* ont aussi illustré le rôle des ions dans des systèmes aqueux extrêmement lubrifiants. Ils affirment que, lorsque deux surfaces chargées négativement (comme celle de mica nue ou des brosses de polyélectrolytes sur le mica) sont comprimées dans un milieu très salin (sels ajoutés), les cations piégés hydratés (Na^+ ou K^+) s'accrochent fortement à leur couche d'hydratation. Ainsi, ils ne se condensent pas facilement dans les sites chargés négativement du réseau pour neutraliser les charges de surface, même à des pressions de plusieurs atmosphères, comparables à des pressions relatives dans les systèmes vivants. Les couches d'hydratation, en dépit de leur grande réticence à être évincés, doivent se comporter d'une manière très fluide vue que des coefficients de frottement effectif d'environ 0,0002 ont été mesurés avec des surfaces de mica [40] et d'environ 0,0004 avec des brosses polyzwitterioniques [11].

La présence des sphères d'hydratation [27] formées par l'organisation de molécules d'eau autour des ions (Fig. 100 [13], adaptation du [9]) assure, suite à l'échange très rapide des

molécules d'eau entre l'eau libre interstitielle et l'eau d'hydratation, des propriétés lubrifiantes remarquables par un mécanisme de « roulement à billes » moléculaire (*molecular ball bearing*, [35]) et des coefficients de frottement très faibles, de l'ordre de 0.0015 [9].

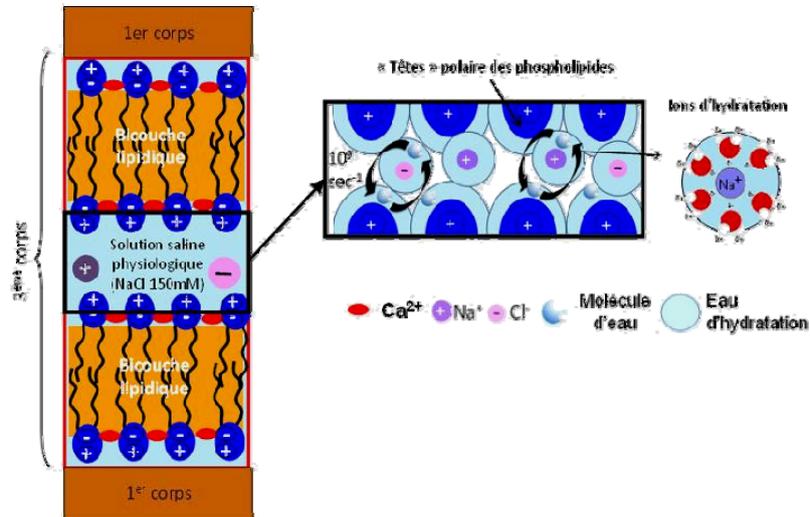


Figure 100. Schéma présentant les couches d'hydratation au niveau des multicouches lipidiques du FS et le mécanisme de lubrification par sphères d'hydratation (ions entourés d'une couche fortement organisée de molécules d'eau) [13,35]

C4. Simulations des modifications biologiques associées aux pathologies

C4.1. Paramètres expérimentaux étudiés

Dans cette partie on a choisi d'étudier le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques reproduisant *ex vivo* des caractéristiques pathologiques comme :

- la variation dans la composition en phospholipides entre le FS sain et celui pathologique (*voir §B.4.3.2.*) et
- l'action *in vivo* des enzymes (à un pH optimal) qui favorise l'évolution de la pathologie (*voir §A.4.3.2.*).

On a utilisé **des bicouches lipidiques de DOPC** en phase fluide (prédominants dans le FS pathologiques) obtenues avec la **méthode de co-adsorption de micelles** (DOPC_m) en appliquant 2 incubations et le rinçage avec le taux de dilution le plus faible (0.5 min⁻¹) afin de prévenir des éventuelles traces de détergent DDM dans la bicouche et en reproduisant la variation en composition des FS pathologiques.

C4.2. Influence de la variation en composition chimique des « têtes » phospholipidiques pathologiques

C4.2.1. Caractéristiques biochimiques retenues

Pour rappel, les conclusions concernant la composition en phospholipides déterminés à l'issue de l'analyse lipidomique de différents échantillons de FS pathologiques (cf. *Partie B*) nous ont indiqué :

- que le phospholipide prédominant est le PC ;
- que l'analyse des chaînes acyle a révélé une prédominance de la phase fluide.

Le profil phospholipidique pour le FS pathologique déterminé indique environ 60% PC, 8% PE, 12% PS, 20% PI+Sph (*voir partie B*).

Vue ces résultats et afin de ne pas induire des difficultés dans l'interprétation des résultats des essais tribologiques liées au % spécifique d'un phospholipide donné, on a choisi d'utiliser dans le modèle *ex vivo* des pathologies :

- des interfaces « référence » constitués à 100% de DOPC_m,
- des interfaces phospholipidiques en phase fluide « mixtes » constituées à chaque fois d'un mélange de DOPC (prédominant, 90%) et de 10% pour un phospholipide « minoritaire ».

Les interfaces utilisées dans cette étude sont donc *en phase fluide* : on a utilisé des

phospholipides correspondant aux différentes classes (PC, PE, PI, PS) et ayant des chaînes acyles symétriques et mono insaturés (*di-oléoyl-*, DO). Ainsi, pour l'obtention des interfaces phospholipidiques, en accord avec les résultats des analyses lipidomiques des FS pathologiques on a utilisé comme phospholipides : le DOPC ; puis les mélanges de DOPC+10%DOPE, DOPC+10%DOPI, DOPC+10%DOPS et respectivement DOPC+10%DOPE +10%DOPI+10%DOPS.

Dans tous les cas, on a ajouté 1% de NBD-PC (fluorophore attaché aux « queues » phospholipidiques, voir §C1.2.1.2., fig. 58) pour nous permettre la visualisation de l'état de la bicouche en microscopie en fluorescence car on a bien montré que la présence de NBD n'influence pas le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques (voir §C2.2.).

La structure de toutes ces molécules utilisées pour obtenir les interfaces phospholipidiques avec un accent particulier sur la taille des têtes phospholipidiques (cf. mesure en *RasMol* d'une molécule 3D) est indiquée sur la figure 101.

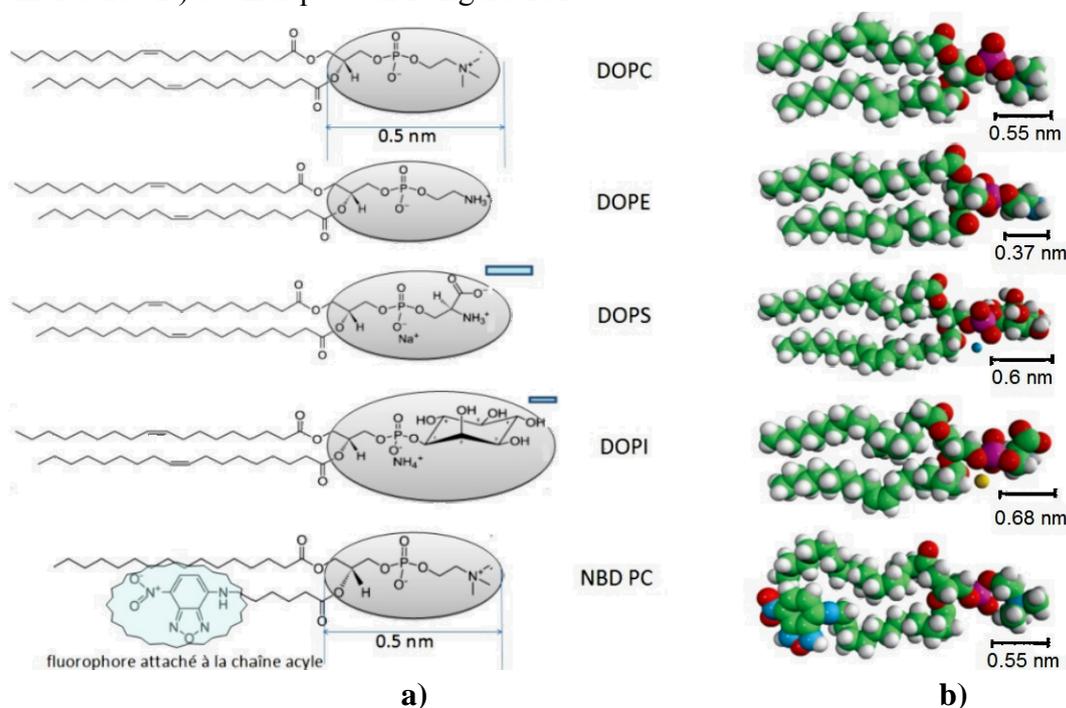


Figure 101. (a) Structure chimique et (b) vue 3D (source : *Avanti Polar Lipids*) des molécules utilisées pour obtenir les interfaces phospholipidiques en phase fluide

C4.2.2. Résultats obtenus

Les résultats concernant l'évolution du coefficient de frottement en fonction de la composition des interfaces phospholipidiques pathologiques, étudié dans un milieu aqueux salin tamponné (pH 7.2 stable) sont présentés sur la figure 102, ensemble avec les images en fluorescence correspondantes (prises à la fin des tests de frottement).

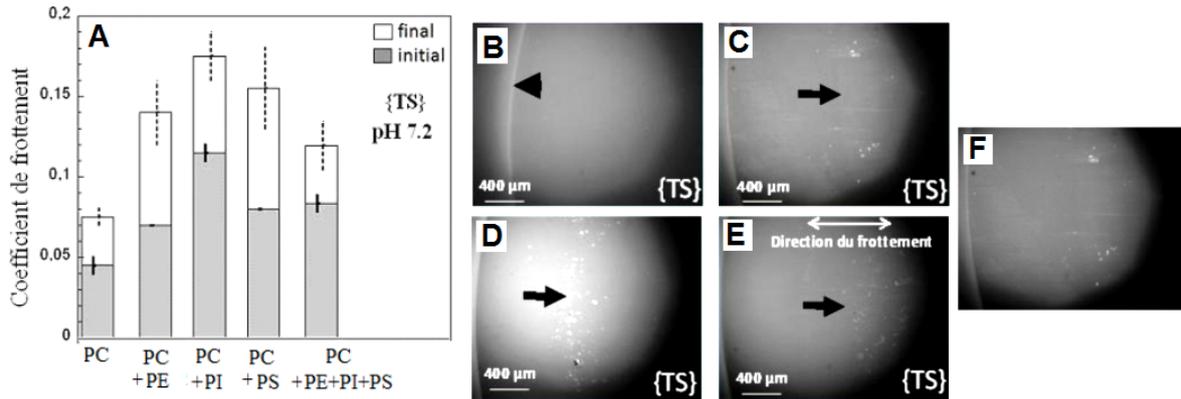


Figure 102. Effet de la **composition** des interfaces phospholipidiques sur leur comportement tribologique

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement (A) sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées.

(B-F) Visualisation in situ de la limite de zone du contact montrant l'état de la bicouche (dégradation ou non) en fin d'essais de frottement :

B) DOPC ; C) DOPC-PE ; D) DOPC-PI ; E) DOPC-PS ; F) mélange PC-PE-PI-PS

Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées.

On observe ainsi que pour le cas des bicouches contenant en plus du DOPC d'autres phospholipides (avec les « têtes » phospholipidiques plus grosses et chargées) le coefficient de frottement initial est plus grande ($\mu = 0.045$ pour les interfaces DOPC, 0.07 pour celle contenant 10% DOPE, 0.12 pour le cas d'ajout de 10% de DOPI, 0.08 pour les interfaces ayant 10% de DOPS et respectivement 0.075 pour le cas où, dans la composition des interfaces phospholipidiques on a majoritairement du DOPC et un % égal des autres lipides, PE, PI et PS). Le coefficient de frottement pour ces cas augmente jusqu'à la fin des essais de frottement ($\mu = 0.075$ (DOPC), 0.14 (DOPC+10% DOPE), 0.175 (DOPC+10%DOPI), 0.155 (DOPC+10%DOPS) et respectivement 0.12 pour les bicouches contenant DOPC et 10% de DOPE, DOPI et DOPS) (Fig. 102A). Cette augmentation du coefficient de frottement est corrélée avec une dégradation de la bicouche en fin d'essai (Fig. 102B-F), dégradation d'autant plus accentuée que le coefficient de frottement final est plus grand (voir le cas des interfaces DOPC+10% DOPI, Fig. 102D).

On observe donc que par rapport aux interfaces phospholipidiques ayant seulement des têtes de type PC, le coefficient de frottement augmente quand on ajoute d'autres têtes lipidiques dans la composition de la bicouche. Ainsi, la présence des têtes de type PI (les plus grandes parmi les lipides choisis dans cette étude, Fig. 101) induit la plus grande augmentation du coefficient de frottement et la plus forte dégradation de la bicouche.

Pour tenter d'expliquer ces résultats, on a choisi d'analyser à l'échelle moléculaire ces interfaces. Les résultats d'imagerie AFM montre des îlots au niveau de la bicouche

DOPC+10% DOPI (Fig. 103, *B Munteanu, PFE 2010*), qui pourraient être dus à la présence des têtes PI qui sont plus grandes et plus chargées que celles de type PC.

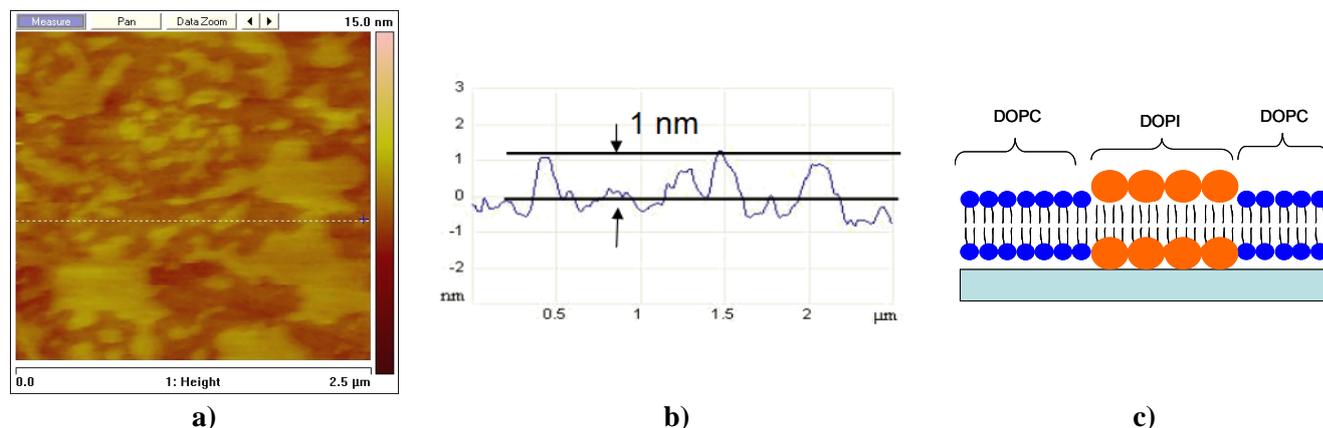


Figure 103. Image AFM d'une bicouche de DOPC+10%DOPI obtenus par la méthode de co-adsorption de micelles (2 incubations) [*B Munteanu, Pfe 2010*]

(a) topographie de la bicouche, 2,5 x 2,5 μm ; (b) profil des hauteurs caractéristiques selon la ligne indiquée ; (c) schéma de la bicouche déposée sur la surface en verre avec les domaines DOPC et respectivement DOPI

Les images obtenues en microscopie à force atomique (Fig. 103a) pour les bicouches de DOPC +10%DOPI montrent la présence de domaines formés par des îlots de DOPI (ayant des têtes lipidiques plus volumineuses, Fig. 104c) dans une bicouche DOPC compacte. La hauteur des domaines de DOPI par rapport à la bicouche de DOPC est d'environ 1 nm (Fig. 103b) [*B Munteanu, Pfe 2010*].

Vu l'influence de la rugosité moléculaire sur le coefficient de frottement (*cf.* §C2.2.), on peut supposer que les différences de coefficient de frottement (Fig. 102) en présence de têtes lipidiques différentes (PC, PE, PI, PS) sont dues notamment à l'augmentation de leur taille qui induit localement des rugosités moléculaire dans la bicouche majoritairement constituée de DOPC (Fig. 103). Les charges peuvent également avoir un rôle même si on a déjà vu que dans ce cas il peut augmenter l'épaisseur entre les bicouches et donc la stabilité au frottement (§ C3.3.4.).

C4.3. Action des enzymes

C4.3.1. Caractéristiques biochimiques retenues

Pour étudier le comportement tribologiques des interfaces phospholipidiques sous l'action des enzymes caractérisant les pathologies articulaires (la phospholipase A₂ - PLA₂ et la phosphatase alcaline - ALP), on a utilisé comme *milieu aqueux* une solution saline tamponnée (tampon TRIS 15mM, avec 150mM NaCl) à deux pH différents :

- pH 7.2, valeur optimale pour favoriser l'action de l'enzyme PLA₂ (20μg/ml et 30 min d'incubation avant l'essai de frottement);
- pH 8.4, valeur favorable à l'activation et l'action de l'enzyme ALP (10μg/ml et 30

min d'incubation avant l'essai de frottement) ;

De plus, afin de mettre en évidence *ex vivo* le rôle de l'ALP dans la précipitation des ions de Ca^{2+} et le processus de minéralisation (qui a lieu *in vivo*), on a utilisé aussi une solution saline tamponnée (TRIS 15mM NaCl 150mM) à pH 8.4, contenant 50mM CaCl_2 et 10 $\mu\text{g/ml}$ de ALP et une incubation de 12h avant l'essai de frottement.

Toutes les solutions ont été filtrées avec une membrane de PES (0,2 μm) avant utilisation pour prévenir ainsi la présence de toute impureté au niveau du contact pendant les essais de frottement.

C4.3.2. Résultats obtenus

C4.3.2.1. Action de l'enzyme PLA_2

Pour analyser l'influence de l'action des enzymes de type PLA_2 sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques on a utilisé :

- des interfaces « référence », de type DOPC_m ;
- des interfaces contenant 10% du DOPI en plus du DOPC .

Les résultats concernant le comportement tribologiques des interfaces phospholipidiques avant et après action de la PLA_2 sont présentés sur la figure 104.

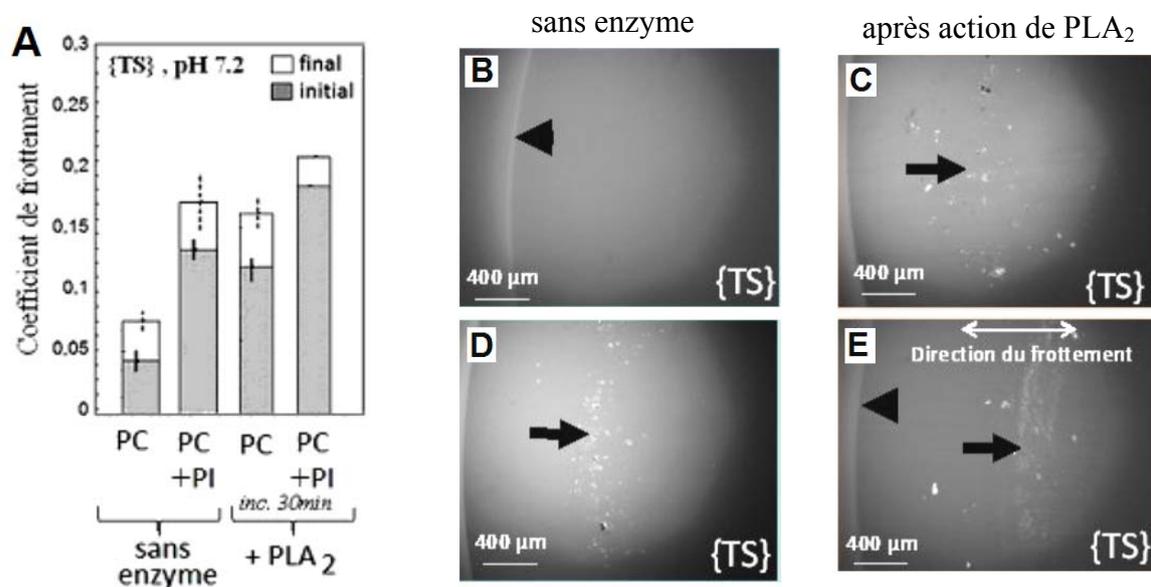


Figure 104. Effet de l'action de la PLA_2 sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques : (A) coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai et (B-E) état de dégradation de la bicouche en fin d'essais

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement (A) sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées.

Abréviations: {TS}, tampon Tris salin pH 7.2 avec 150 mM de NaCl ;

(B-E) Visualisation *in situ* de la limite de zone du contact montrant l'état de la bicouche (dégradation ou non) en fin d'essais de frottement avant (B,D) et après l'action de la PLA₂ (C,E) : bicouches DOPC (B,C) et bicouches DOPC+10% DOPI (D,E).

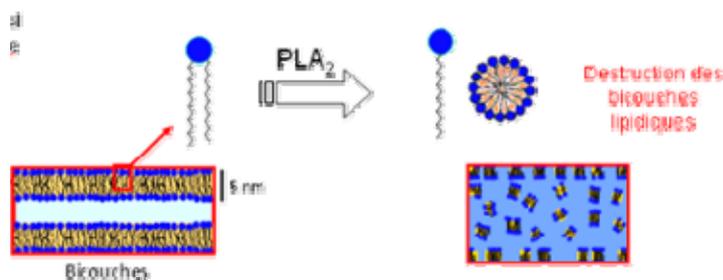
Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées.

Comme déjà présenté dans le §C4.2.2 (Fig. 102), la présence de DOPI dans la bicouche de DOPC entraîne une valeur du coefficient de frottement plus grande en début d'essai (à comparer avec la valeur obtenue pour le cas d'une bicouche DOPC_m simple) et qui continue d'augmenter à la fin de l'essai de frottement (Fig. 104A), comportement en corrélation avec l'état de dégradation de la bicouche en fin d'essais (Fig. 104B,D).

Suite à l'action de l'enzyme PLA₂, pour les deux types de bicouches (DOPC et respectivement DOPC+10% DOPI) on constate une valeur encore plus grande du coefficient de frottement initial ($\mu = 0.12$ pour DOPC et 0.18 pour DOPC+10%DOPI) qui continue à augmenter jusqu'à la fin de l'essai ($\mu = 0.16$ pour DOPC et respectivement 0.2 pour DOPC+10% DOPI) (Fig. 104A). L'augmentation du coefficient de frottement suite à l'action de la PLA₂ sur les interfaces étudiées (DOPC et DOPC+10%DOPI) est corrélée avec l'état de la bicouche en fin d'essais, les images en microscopie en fluorescence indiquant une forte dégradation de la bicouche après l'action de l'enzyme (Fig. 104C,E).

Pour expliquer ces résultats on peut s'inspirer de l'action *in vivo* connue de la PLA₂ (Fig. 38, Partie B). Ainsi, *in vivo*, suite à l'action des enzymes de type PLA₂, des espèces de type lyso-phospholipide (lyso-PL) se forment et leur présence au niveau de la structure des assemblages moléculaires du FS pourrait déterminer un changement structural (Fig. 19, Partie A).

De fait de la tendance de ces espèces moléculaires de type « lyso » (qui représentent un détergent naturel très puissant ayant une tendance de s'auto organiser en micelles (voir §B.2.1.) à former des structures de type micelles plutôt que des interfaces planes de type bicouches, suite à l'action de la PLA₂, les interfaces phospholipidiques des FS pourraient être détruites, conformément au schéma sur la fig. 41 (Partie B) reprise ci-après.



Donc, l'augmentation du coefficient de frottement dans le cas d'ajout de PLA₂ pourrait être due à la présence de lyso-PC (après action de la PLA₂ sur le DOPC) qui a un rôle de détergent dans la bicouche lipidique. Sans que cela soit une preuve expérimentale absolue, il est intéressant de faire remarquer qu'on peut obtenir les mêmes résultats avec des bicouches

DOPC_m obtenues après une et respectivement deux incubations (Fig. 105) qui contiennent comme on l'a déjà dit plus ou moins de détergent. Les valeurs du coefficient de frottement des DOPC_m (1 incubation) ou DOPC_m (+ PLA₂) sont ainsi très similaires.

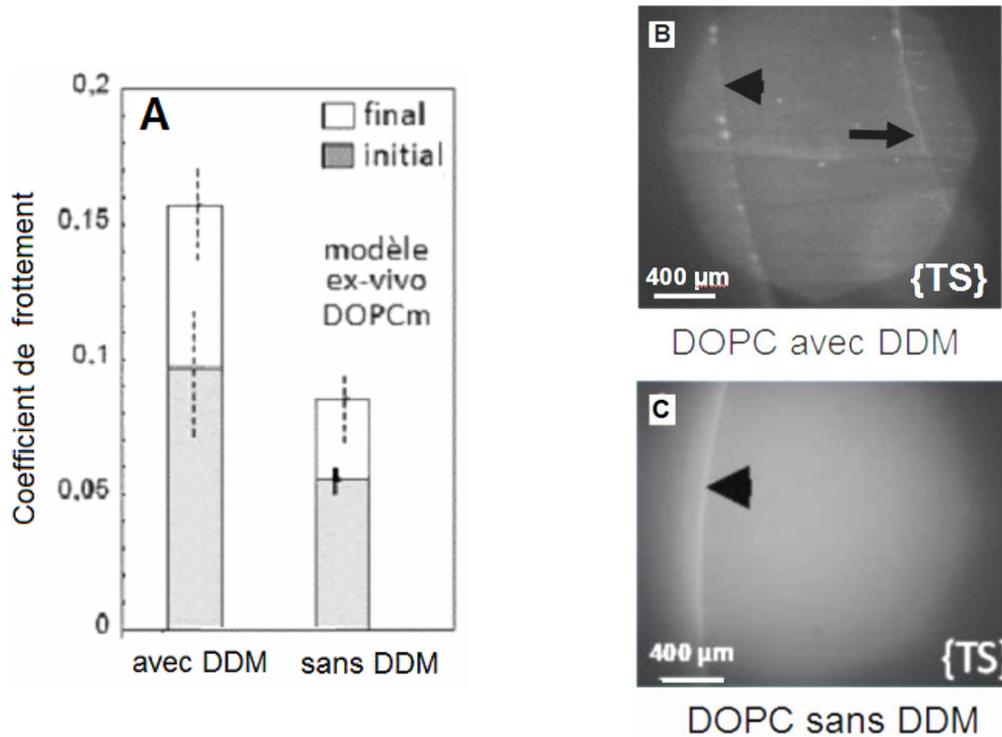


Figure 105. Effet de la présence du détergent DDM sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques : coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai (A) et état de dégradation de la bicouche en fin d'essais (B-C)

Les valeurs moyennes du coefficient de frottement (A) sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes. Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées. Abréviations: {TS}, tampon Tris salin pH 7.2 avec 150 mM de NaCl

(B-C) Visualisation in situ de la limite de zone du contact montrant

(B) la dégradation de la bicouche en fin d'essais de frottement de fait de la présence de détergent pour une bicouche DOPC_m à 1 incubation (avec DDM).

(C) absence de la dégradation de la bicouche en fin d'essais de frottement en absence de détergent pour une bicouche DOPC_m à 2 incubations (sans DDM).

Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées.

Ces résultats confirment l'hypothèse que l'augmentation du coefficient de frottement suite à l'action de la PLA₂ est due à la formation des molécules ayant rôle de « détergent » (lyso-PC).

C4.3.2.2. Action de l'enzyme ALP

L'action de l'enzyme ALP au niveau de la structure des assemblages moléculaire du fluide synovial (notamment au niveau des phospholipides de type PI et PS présentes dans les interfaces phospholipidiques) active le processus de minéralisation et ainsi des particules de

cristaux d'hydroxy-apatite se forment au niveau de l'articulation malade. La présence de ces cristaux favorise l'accentuation de l'usure de la surface du cartilage articulaire arthrosique (Fig. 106, [1])

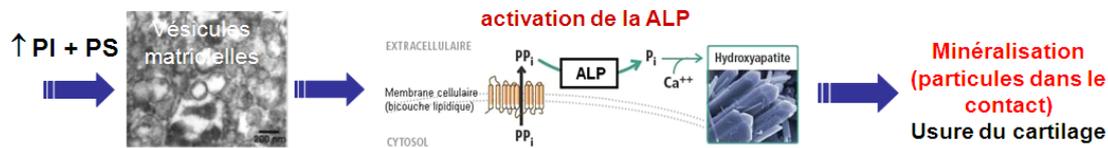


Figure 106. Réalité biologique : action de l'enzyme ALP et activation *in situ* de la minéralisation

Pour analyser les conséquences de l'action de l'ALP sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques, on a étudié l'action de cette enzyme sur des bicouches composées de DOPC, DOPC+10%DOPI et respectivement DOPC+10%PS.

Pour mieux mettre en évidence les effets de l'action enzymatique, on a fait des essais de frottement après une incubation de 30 min, puis après 12h d'incubation des bicouches dans le milieu contenant l'enzyme. Les résultats de ces essais sont synthétisés sur la fig. 107.

Ces résultats nous indiquent des comportements tribologiques similaires pour tous les cas de bicouches étudiées :

- un coefficient de frottement plus grand dès le début des essais de frottement, après 30 minutes d'incubation avec l'enzyme ALP, dont la valeur augmente légèrement en cours d'essais, avec une dégradation de la bicouche mise en évidence en microscopie en fluorescence ;
- une plus forte augmentation des valeurs de coefficient de frottement après 12h d'incubation enzymatique, en présence de Ca²⁺ (50mM), accompagnée d'une très forte dégradation des bicouches dans ce cas (Fig. 107c).

En l'absence d'action enzymatique, en comparant les résultats obtenus à pH 7.2 (Fig. 102A) et respectivement 8.4 (Fig. 107A), on constate une nette différence (facteur 10) pour le cas des interfaces phospholipidiques DOPC+10%DOPI. Dans ce cas, à pH 7.2, le coefficient de frottement obtenu a été $\mu = 0.12$ en début et respectivement $\mu = 0.175$ à la fin des essais de frottement, tandis qu'à pH 8.4, on a obtenu des coefficients de frottement très faible, $\mu = 0.015$ (en début) à 0.028 (à la fin). Cette différence pourrait être attribuée à la conformation stérique et aux charges électriques locales déterminées par le pH dans le milieu aqueux.

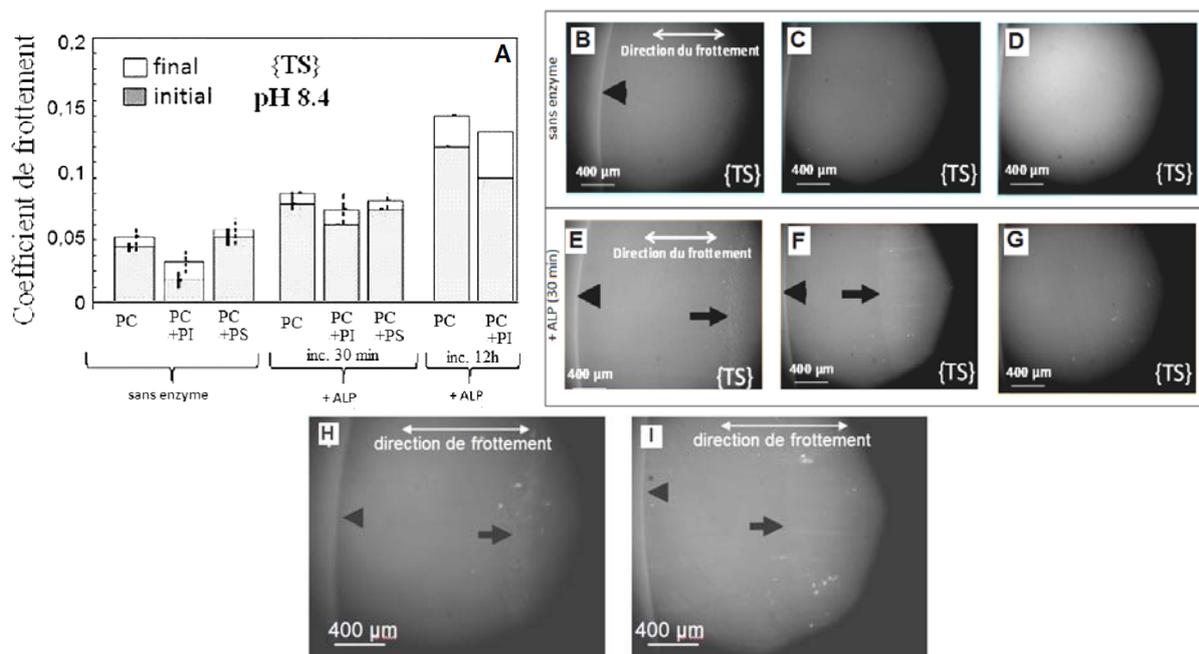


Figure 107. Effet de l'action de l'enzyme ALP sur le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques : coefficient de frottement en début et à la fin de chaque essai (A) et état de dégradation de la bicouche en fin d'essais (B-I)

(A) Les valeurs moyennes du coefficient de frottement sont calculées à partir d'au moins deux expériences indépendantes (sauf pour le cas d'incubation 12h). Les barres grises représentent la valeur initiale et celles blanches la valeur finale (après 50 minutes de frottement). Les barres d'erreur indiquent l'écart entre les valeurs minimales et maximales mesurées. Abréviations: {TS}, tampon Tris salin pH 7.2 avec 150 mM de NaCl ;

(B-I) Visualisation in situ des bicouches intactes, sans action enzymatique (B-D) et dégradées en fin d'essais de frottement après l'action de l'ALP, pour 30 min d'incubation (E-G) et respectivement 12h d'incubation (H-I). Bicouches préparées par la méthode de co-adsorption de micelles : composées de DOPC (B,E,H), DOPC+10% DOPI (C,F) et DOPC+10% DOPS (D,G,I).

Les pointes de flèches sur la gauche indiquent la limite extérieure de la lentille HEMA, tandis que les flèches sur la droite de l'image indiquent le bord de la zone de contact qui est visible en fluorescence lorsque les bicouches sont dégradées.

C4.4. Discussions et conclusions

Les phospholipides de type « PE » sont présentes en quantité faible dans le FS sain à importante dans les FS pathologiques tel que déterminé par l'analyse lipidomique, *Partie B*).

La présence de DOPE dans les interfaces phospholipidiques fluides de DOPC_m génère une augmentation du coefficient de frottement et de la dégradation de la bicouche en cas de cisaillement des interfaces phospholipidiques dans un milieu salin tamponnée à pH 7.2. La même tendance a été observée pour le cas des bicouches contenant du DOPS (faible dans le FS sain et en quantité augmenté dans les FS pathologiques) dans les mêmes conditions expérimentales (Fig. 102).

Pour le cas des essais de frottement en utilisant des bicouches qui reproduisent les caractéristiques des interfaces lipidiques lors de pathologies articulaires dans *un milieu salin tamponné à pH 8.4, la présence de la DOPS* dans les bicouches génère une légère augmentation du coefficient de frottement, mais la valeur finale est proche de celle de début pour tous les cas étudiés. Un résultat remarquable mais non compris est celui obtenu pour le cas des bicouches contenant du DOPI à pH8.4 : dans ce cas, le coefficient de frottement de début aussi bien que celui à la fin (légèrement augmenté) reste beaucoup plus faible à pH 8.4 qu'à pH 7.2 (Fig. 102A et Fig. 107A). Cette différence peut être due à la structure chimique complexe de la tête DOPI et à son comportement particulier à pH 8.4.

Pour le cas des essais de frottement étudiant l'action de la PLA₂ sur les interfaces modèles, du fait que les caractéristiques des têtes polaires n'influencent pas cette réaction (l'enzyme agissant au niveau de la chaîne acyle des molécules), on a choisi de faire cette étude pour 2cas seulement : bicouche composée uniquement de DOPC et bicouche contenant en plus du DOPC+10% DOPI. On peut supposer que la tendance observée pour ces deux cas serait la même dans le cas des autres mélanges de phospholipides.

Dans la même logique, comme dans la littérature il est précisé que dans le processus de minéralisation par précipitation de Ca²⁺ un rôle important est détenu par les phospholipides de type PI et PS, on a exclu dans ce cas les essais avec des bicouches de type DOPC+10%DOPE, en se concentrant sur les cas DOPC+10%DOPI et DOPC+10%DOPS.

En ce qui concerne l'influence de la présence des enzymes caractérisant les pathologies articulaire dans le modèle de frottement on a pu déterminer que :

- dans le cas de frottement des interfaces phospholipidiques en présence de PLA₂, le coefficient de frottement augmente considérablement entre le début et la fin d'essai, (3 fois pour le cas de DOPC) entraînant une dégradation des bicouches phospholipidiques, et ceci indépendamment de type de « tête » polaire des phospholipides ; cette augmentation est due à l'effet de la formation de lyso-PC – détergent naturel très puissant) ; des résultats similaires ont été aussi obtenus dans le cas des bicouches DOPC_m à 1 incubation, contenant de détergent ;
- pour le cas d'action de l'ALP, l'augmentation du coefficient de frottement lors des essais (et notamment pour les cas où on a laissé l'enzyme incuber pendant 12h dans le milieu aqueux) est due :
 - soit à l'adsorption de l'enzyme sur la bicouche, qui entraîne une augmentation de la rugosité moléculaire de surface, similaire aux essais tribologiques avec des interfaces phospholipidiques où on varie les types de têtes polaires (voir §C2.2.),
 - soit au fait que pendant l'incubation et l'essai de frottement, des microcristaux ont été formés (de fait de la précipitation des ions de Ca²⁺ présents dans le milieu aqueux).

Afin d'arriver à comprendre plus en détails le comportement tribologique des interfaces phospholipidiques dans des essais reproduisant *ex vivo* l'évolution des pathologies articulaires, il serait nécessaire de compléter les études de frottement avec des analyses de coefficient de diffusion au niveau des bicouche (analyse FRAP) et d'analyses d'imagerie et essais de nano-indentation (analyse AFM). Ceci n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette thèse.

C5. Conclusions

La *partie A* du manuscrit nous a montré l'importance d'étudier la bio-tribologie des interfaces phospholipidiques qui représentent la première barrière à franchir afin de générer l'usure précoce du cartilage articulaire. Pour cela, la *partie B* montre en rapport avec les résultats d'analyse lipidomique que les phospholipides prédominantes des fluides synoviaux pathologiques sont de type PC et en phase fluide. C'est pour cela que notre modèle tribologique *ex vivo* consiste à reproduire le fonctionnement tribologique des interfaces phospholipidiques de type DOPC. Le **modèle tribologique** reproduit le triplet tribologique articulaire qui est constitué du **mécanisme** (imposé par le dispositif expérimental) qui assure une lubrification de type limite permettant la mise en évidence du rôle du **3^{ème} corps**, les des interfaces phospholipidiques déposées sur les surfaces des **1^{ers} corps**, d'une part sur la surface d'hydrogel HEMA (matériau modèle pour le cartilage articulaire) et d'autre part sur la surface en verre (qui facilite la visualisation du contact pendant les essais de frottement).

Dans ce contexte, nous avons étudié leur propriétés mécaniques (résistance à l'indentation de la pointe AFM) et physiques (coefficient de diffusion par FRAPP) en relation avec leur **comportement tribologique** à l'aide d'un biotribomètre. Plus particulièrement nous avons étudié leur influence sur l'accommodation de la vitesse de cisaillement au niveau du contact et leur capacité de maintenir un coefficient de frottement faible et stable.

Afin de simuler le fonctionnement tribologique dans un régime limite de lubrification, on a adapté le modèle *ex vivo* existant pour le cas d'une articulation saine au cas des pathologies articulaires.

L'objectif des travaux de cette partie a été l'étude du comportement tribologique des interfaces phospholipidiques modèles et plus particulièrement leur rôle dans la biolubrification articulaire pathologique.

1. Influence des paramètres mécaniques

- **la rugosité du substrat** (de la surface modèle en verre, reproduisant l'usure précoce du cartilage articulaire):
 - influence de manière significative le comportement tribologique des interfaces de type DOPC_m en générant des discontinuités dans la couche lipidique ;

- les interfaces de type DOPC_v restent intactes et ont la capacité de « combler » la rugosité du substrat.
- **la rugosité « locale », à l'échelle moléculaire** (donnée par la variation de la structure chimique des phospholipides et notamment celle de leurs têtes polaires) :
 - indépendamment de la méthode d'obtention des interfaces phospholipidiques, la rugosité induite par la présence des molécules ayant des têtes polaires larges influence de manière significative l'évolution et détermine l'augmentation du coefficient de frottement qui associe aussi une dégradation accentuée des interfaces lipidiques.

2. Influence des paramètres physico-chimiques caractérisant le milieu aqueux

Dans l'ensemble, les résultats des essais tribologiques nous ont permis d'observer une forte corrélation entre les caractéristiques nano-mécaniques (résistance à l'indentation) [19,40] des interfaces étudiés (DOPC_m et DOPC_v) et leur comportement tribologique (un coefficient de friction faible et stable et l'absence de la dégradation de la bicouche pendant le cisaillement).

Les résultats d'essais tribologiques (l'évolution de coefficient de frottement et la visualisation *in situ* du contact à la fin du cisaillement) indiquent une nette différence de comportement tribologique (accommodation de vitesse) des interfaces phospholipidiques, en rapport avec :

- la stabilité du milieu aqueux ;
- la variation du pH ;
- la variation de la molécule de tampon.

Nous avons montré que la force de frottement entre les surfaces de 1^{ers} corps revêtues d'interfaces phospholipidiques en phase fluide dépend fortement de la composition de milieu aqueux, de la méthode utilisée pour déposer les bicouches phospholipidiques sur les surfaces de contact ainsi que de la rugosité du substrat. Nous attribuons la forte réduction du coefficient de frottement lorsque deux bicouches sont déposées (une sur chaque surface de frottement) à la localisation de plan d'accommodation de vitesse dans la couche aqueuse présente entre les deux bicouches lors du frottement. Ce scénario est soutenu par les résultats indiquant un coefficient de frottement plus grand et une forte dégradation des interfaces lipidiques quand une seule bicouche est présente au niveau du contact ou lorsque les phospholipides composant les bicouches lipidiques ont des groupes polaires (« têtes » phospholipidiques) plus volumineuses.

Les interfaces DOPC_m dans l'eau ultra pure (pH 5.6) qui est un milieu non-stable, ne sont pas résistantes pendant de longues périodes de frottement et sont facilement perforés par la pointe d'AFM. L'ajout de NaCl dans un milieu non tamponné améliore la résistance des interfaces lipidiques à l'indentation, mais pas celle au cisaillement. Au contraire, dans les deux solutions tamponnées à pH 7.2 (Tris et Tris salin), les interfaces DOPC_m sont plus résistantes et présentent des meilleures propriétés lubrifiantes : baisse et stabilité du coefficient de frottement et absence de la dégradation des bicouches comparé aux résultats obtenus dans un milieu aqueux non tamponné, donc non stable). Ces effets ont été interprétés en termes

d'adsorption des ions dans les bicouches qui peut augmenter la cohésion de la bicouche et la répulsion électrostatique bicouche-bicouche.

Ainsi, on peut conclure que les interfaces DOPC_m (préparées par la méthode de co-adsorption de micelles, une méthode plus simple et moins coûteuse que celle de fusion des vésicules) sont bien adaptées pour étudier le rôle de bicouches dans la biolubrication.

3. Influence des caractéristiques biologiques des interfaces phospholipidiques

- **la variation de leur composition** : la présence des phospholipides ayant des têtes polaire grande augmente le coefficient de frottement et détermine la dégradation des bicouches en fin d'essais ;
- **l'action des enzymes** détermine une augmentation des valeurs de coefficient de frottement dès le début des essais de frottement qui continuent à augmenter jusqu'à la fin d'essais, déterminant aussi une forte dégradation des interfaces étudiées.

Les caractéristiques du lubrifiant influencent le comportement tribologique, en particulier en modifiant la résistance au cisaillement et la charge. Ces changements sont représentatifs des conditions pathologiques (comme l'arthrite et l'arthrose [22,28,34], Fig. 108). Par conséquent, les résultats de ce travail seraient utiles pour développer l'analyse tribologique des maladies articulaires.

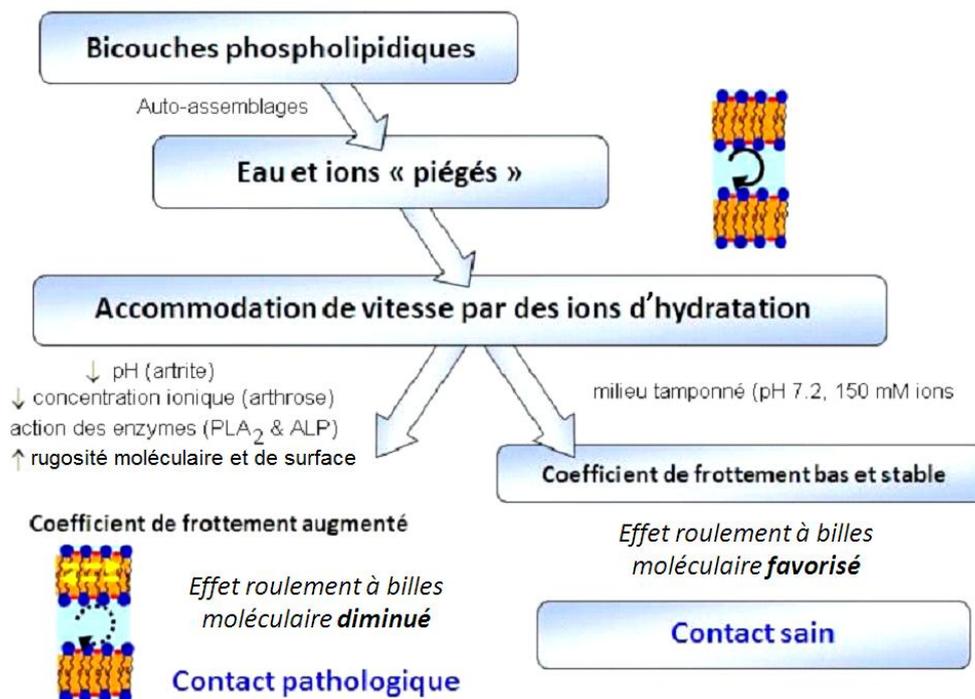


Figure 108. Évolution des interfaces phospholipidiques lors des pathologies articulaires

Conclusions générales et perspectives

Les recherches actuelles dans le domaine de la **bio-tribologie articulaire** visent à s'affranchir des problèmes liés à l'utilisation des implants articulaires (durée de vie limitée, coûts élevés) en trouvant des solutions thérapeutiques pour traiter de manière précoce les pathologies articulaires. Pour cela il est nécessaire de comprendre l'évolution des pathologies articulaires afin de pouvoir les détecter dans les phases débutantes (quand le cartilage articulaire est très faiblement usé). Les pathologies articulaires sont causées par une multitude de facteurs (mécaniques, physico-chimiques et biologiques) qui gênent la rupture de l'homéostasie articulaire pouvant provenir de différents composants de l'articulation : du cartilage, du fluide synovial, de l'os ou du système musculo-ligamentaire.

Dans ce contexte, cette thèse se concentre sur l'analyse des causes des pathologies articulaires provenant du fluide synovial. Ainsi, des études physico-chimiques ont montré que la composition moléculaire du fluide synovial entraîne des interactions entre divers composants (lipidiques et glycoprotéiques), d'où la formation d'une structure discontinue composée de vésicules entourées de multicouches lipidiques, formées par l'empilement de 3 à 7 bicouches lipidiques piégeant entre des couches aqueuses.

Le traitement précoce des pathologies articulaires doit donc passer par la compréhension de l'origine des perturbations liées aux interfaces lipidiques de type multicouches qui sont la première barrière à franchir pour déterminer ensuite l'usure du cartilage articulaire.

Cette thèse a eu comme objectif d'étudier le rôle et l'évolution des multicouches lipidiques formant l'interface fluide synovial/cartilage articulaire dans le cas de plusieurs facteurs considérés déclencheurs dans une pathologie articulaire.

Pour ce faire, cette thèse a été menée en exploitant des techniques expérimentales d'analyse *ex vivo* comme : l'analyse lipidomique, la microscopie optique en epi-fluorescence, la microscopie de force atomique et l'analyse bio-tribologique. Ces techniques ont été utilisées de manière à adapter le modèle tribologique *ex vivo* caractérisant l'articulation saine* afin de nous permettre l'étude du fonctionnement articulaire pathologique des multicouches phospholipidiques. Ce modèle tribologique *ex vivo* reproduit le **triplet tribologique articulaire** en utilisant :

- comme **corps en contact** : un matériau de type hydrogel HEMA, qui permet, quand il est hydraté dans une solution saline tamponnée (TRIS 15mM NaCl 150mM, pH 7.2) de reproduire les propriétés mécaniques et physicochimiques des cartilages articulaires. Un premier compromis expérimental a été l'emploi d'une contreface en verre transparent afin de favoriser la visualisation du contact pendant les essais tribologiques ;
- un dispositif expérimental permettant conjointement la mesure du coefficient de frottement et la visualisation *in situ* du contact pour simuler *ex vivo* le **mécanisme** articulaire ; Ce mécanisme a été réduit à un mouvement de glissement avec une faible vitesse relative de manière à se mettre dans des conditions de lubrification limite permettant ainsi la mise en évidence et l'exacerbation du rôle des multicouches lipidiques.
- comme **lubrifiant** : des multicouches lipidiques constituées de deux bicouches lipidiques

* thèse Ana Maria Sfarghiu, LaMCoS, 2006

entre lesquelles est piégée une couche aqueuse.

Grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents moléculaires spécifiques, ce modèle permet d'analyser la localisation du glissement et l'évolution de la dégradation au niveau des bicouches lipidiques et ainsi expliquer les valeurs de coefficient de frottement obtenues.

Dans ce contexte, cette thèse a comporté **deux étapes** :

1. La première étape a été orientée vers **l'analyse lipidomique des FS sains et pathologiques (Partie B)**. Cette étape nous a permis de cibler les paramètres biologiques liés aux perturbations pathologiques des interfaces phospholipidiques. Ainsi, nous avons mis en évidence :

- la présence des médiateurs lipidiques de l'inflammation dans le fluide synovial ostéoarthrosique (LTB₄, 5-HETE), suite à l'action des enzymes (comme la PLA₂) associées aux pathologies articulaires sur les phospholipides composant les interfaces lipidiques ; ceci a pour conséquence une modification de la structure et de la conformation des molécules composant les bicouches lipidiques ce qui peut engendrer une réorganisation de la structure des interfaces lipidiques, favorisant ainsi l'initiation de l'usure du cartilage articulaire ;
- les quantités de différentes classes de phospholipides contenues dans les fluides synoviaux sains et pathologiques analysées, majoritairement des phosphatidylcholines en phase fluide ; cette variation en composition influence la stabilité et la fluidité de la bicouche lipidique et en conséquence sa résistance mécanique aux sollicitations locales, à l'indentation et au cisaillement ;
- les caractéristiques variables des lipides en fonction de l'état sain ou pathologique, à savoir que :
 - dans le fluide synovial sain les phospholipides sont plutôt en phase solide (60 % saturés et 40% non saturés) tandis que
 - les phospholipides contenus dans les fluides synoviaux pathologiques sont majoritairement en phase fluide (seulement 43 % saturés et 57% non saturés, ces dernières formées par des acides gras insaturés, dont l'acide oléique est prédominant) ;

Par rapport aux résultats des analyses lipidomique, le choix par défaut dans ce travail s'est porté pour les bicouches phospholipidiques supportées de type DOPC, comme modèle des interfaces phospholipidiques, obtenues par deux techniques : co-adsorption de micelles (DOPC_m) et éclatement de vésicules (DOPC_v).

2. La deuxième étape de ce travail a consisté à adapter le modèle tribologique articulaire *ex vivo* existant (caractérisant les articulations synoviales saines* pour **étudier l'influence des possibles causes précoces des pathologies articulaires sur le fonctionnement tribologique des multicouches phospholipidiques (Partie C)**). Ainsi, nous avons étudié l'influence sur le rôle et l'évolution des interfaces lipidiques des **facteurs** :

- **mécaniques** : *les faibles variations de la rugosité* ;
- **physico-chimiques** : *la variation du pH et de la concentration ionique, du milieu aqueux piégé entre deux bicouches lipidiques* ;
- **biologiques** : *la variation pathologique de la composition des bicouches lipidiques et l'action enzymatique de associées aux pathologies (enzymes PLA₂ et ALP)*.

Une première conclusion par rapport aux résultats obtenus indique que les **performances tribologiques des interfaces lipidiques** dépendent :

* thèse Ana Maria Sfarghiu, LaMCoS, 2006

- **du nombre de bicouches lipidiques au niveau du contact frottant**
Après 50 minutes de frottement on constate une forte diminution du coefficient de frottement lorsque deux bicouches lipidiques sont déposées (une sur chaque surface de frottement) par rapport au frottement des surfaces nues, sans bicouches lipidiques (facteur 3) ou en présence d'une seule bicouche lipidique (facteur 2). Cette diminution est attribuée à la localisation du plan d'accommodation de vitesse dans la couche aqueuse piégée entre les deux bicouches lors du frottement.
- **de la qualité des bicouches modèles utilisées dans les essais expérimentaux**
On a montré que la méthode de co-adsorption de micelles est plus difficile à contrôler par rapport à la méthode d'éclatement de vésicules. Mais en contrôlant le nombre d'incubations (minimum 2), le taux de dilution (lent, moins de 0.7 min^{-1}) et l'oxydation des lipides (à éviter) on arrive à obtenir des bicouches uniformes à grande échelle, permettant d'avoir des résultats reproductibles dans les essais tribologiques.
- **de la faible rugosité du substrat, caractérisant les stades précoces de la maladie, qui :**
 - n'influence pas le comportement tribologique des interfaces de type DOPC_V qui ont la capacité de « combler » la rugosité du substrat, mais
 - influence de manière significative (facteur 2 pour le coefficient de frottement par rapport aux résultats obtenus avec des bicouches DOPC_V) le comportement tribologique des interfaces lipidiques DOPC_m qui « suivent » la rugosité du substrat ;
- **de la rugosité locale de la bicouche**, induite par la présence des molécules ayant des têtes lipidiques volumineuses qui influence de manière significative le comportement tribologique par une augmentation du coefficient de frottement et de la dégradation des interfaces lipidiques, indépendamment de la méthode dont celles-ci ont été obtenues.

Par rapport à ces résultats, on peut conclure que pour avoir des études tribologiques reproductibles il est nécessaire d'utiliser au minimum 2 bicouches lipidiques déposées sur chaque surface du contact, par la méthode d'éclatement de vésicules ou par celle de co-adsorption de micelles (à condition qu'elle soit bien contrôlée, comme mentionné auparavant) sur des surfaces ayant une rugosité très réduite (environ 1nm rms).

Concernant l'influence des caractéristiques physico-chimiques (stabilité du pH, variabilité du pH, présence des ions) du milieu aqueux piégé entre deux bicouches lipidiques, les résultats d'essais tribologiques (l'évolution du coefficient de frottement et la visualisation *in situ* du contact à la fin du cisaillement) indiquent une nette différence du comportement tribologique des interfaces lipidiques, en rapport avec :

- **stabilité du milieu aqueux : milieu non tamponné et milieu tamponné**
Ainsi, même si la valeur du coefficient de frottement est similaire en début d'essais de frottement, on observe une augmentation de la dégradation des bicouches lipidiques dans un milieu non tamponné par rapport à un milieu tamponné. Cette différence peut être expliquée par une baisse de la résistance mécanique à la nano-indentation des bicouches lipidiques (85% des bicouches sont rompues dans un milieu non tamponné et 38 % dans un milieu tamponné). L'utilisation d'un milieu tamponné favorise donc la stabilité des bicouches qui assurent ainsi une bonne lubrification.
- **la variation de la molécule de tampon**
D'après les résultats obtenus on suppose que la variation de la molécule de tampon ait la capacité de se coupler chimiquement aux molécules des phospholipides (couplage des têtes ou insertion entre les chaînes acyle) modifiant ainsi la fluidité de la bicouche et en conséquence son comportement à l'indentation et au cisaillement.

– **la variation du pH**

L'augmentation du pH montre une augmentation de la résistance mécanique des bicouches mais sans conséquences très grandes sur le comportement tribologique.

– **la variation de la concentration ionique**

L'ajout du sel (NaCl) améliore la résistance à la pénétration mais pas au cisaillement, la variation de la concentration ionique ayant moins d'effet comparatif au pH (stabilité par la présence d'un milieu tamponné).

Ces résultats montrent la localisation de l'accommodation de vitesse au niveau de la couche aqueuse qui permet, par des mécanismes similaires à ceux décrits par Klein (*voir fig. 100*) de favoriser la lubrification par un mécanisme de « roulement à billes moléculaire ».

En ce qui concerne **l'influence des caractéristiques biologiques des interfaces phospholipidiques sur leurs performances tribologiques** on a observé que celles-ci dépendent de :

- **la variation de leur composition** de fait que la présence des phospholipides ayant des têtes polaire volumineuses et chargées augmente le coefficient de frottement et détermine la dégradation des bicouches en fin d'essai d'où l'importance de quantifier le rapport des « têtes » des phospholipides dans les pathologies articulaires par le développement d'une analyse lipidomique quantitative systématique ;

- **l'action des enzymes pathologiques**

- de type PLA₂, qui, activées dans l'état inflammatoire, agissent en formant des molécules de détergent qui déterminent une augmentation de la fluidité de la bicouche et une diminution significative de sa résistance au cisaillement ;
- l'action des enzymes de type ALP dans les cas non inflammatoires, qui augmentent le coefficient de frottement et l'usure des bicouches par une possible précipitation des ions de Ca²⁺.

L'action des enzymes pathologiques détermine donc une augmentation des valeurs de coefficient de frottement dès le début des essais de frottement qui continuent à augmenter jusqu'à la fin d'essais ; on observe aussi une forte dégradation des interfaces lipidiques étudiées mais on ne peut pas dire à cet étape du projet de recherche si c'est l'augmentation du coefficient de frottement qui engendre la dégradation des bicouches ou *vice versa*.

Afin d'évaluer l'état pathologique et son évolution, il serait donc indispensable de faire une évaluation quantitative par analyse lipidomique des facteurs inflammatoires présents dans les fluides synoviaux pathologiques et une analyse par microscopie électronique en transmission (MET) mettant en évidence la formation des cristaux suite à la précipitation de calcium.

Dans l'ensemble, les résultats de cette thèse montrent l'importance des paramètres caractérisant les interfaces lipidiques (bicouches lipidiques et couche aqueuse piégée entre deux bicouches) dans l'obtention des performances tribologiques d'une articulation synoviale (faible coefficient de frottement et faible usure).

Les résultats montrent une forte « corrélation » entre le coefficient de frottement, la dégradation et la résistance nano-mécanique des bicouches ainsi que la mobilité des molécules lipidiques à l'intérieur de la bicouche lipidique et suggèrent une grande influence de l'épaisseur de la couche aqueuse piégée entre les bicouches lipidiques. Afin d'estimer l'épaisseur de la couche aqueuse, par la suite, il est envisagé d'adapter des techniques FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, *Flux Resonance Energy Transfer*) et des modélisations par la méthode de dynamique moléculaire.

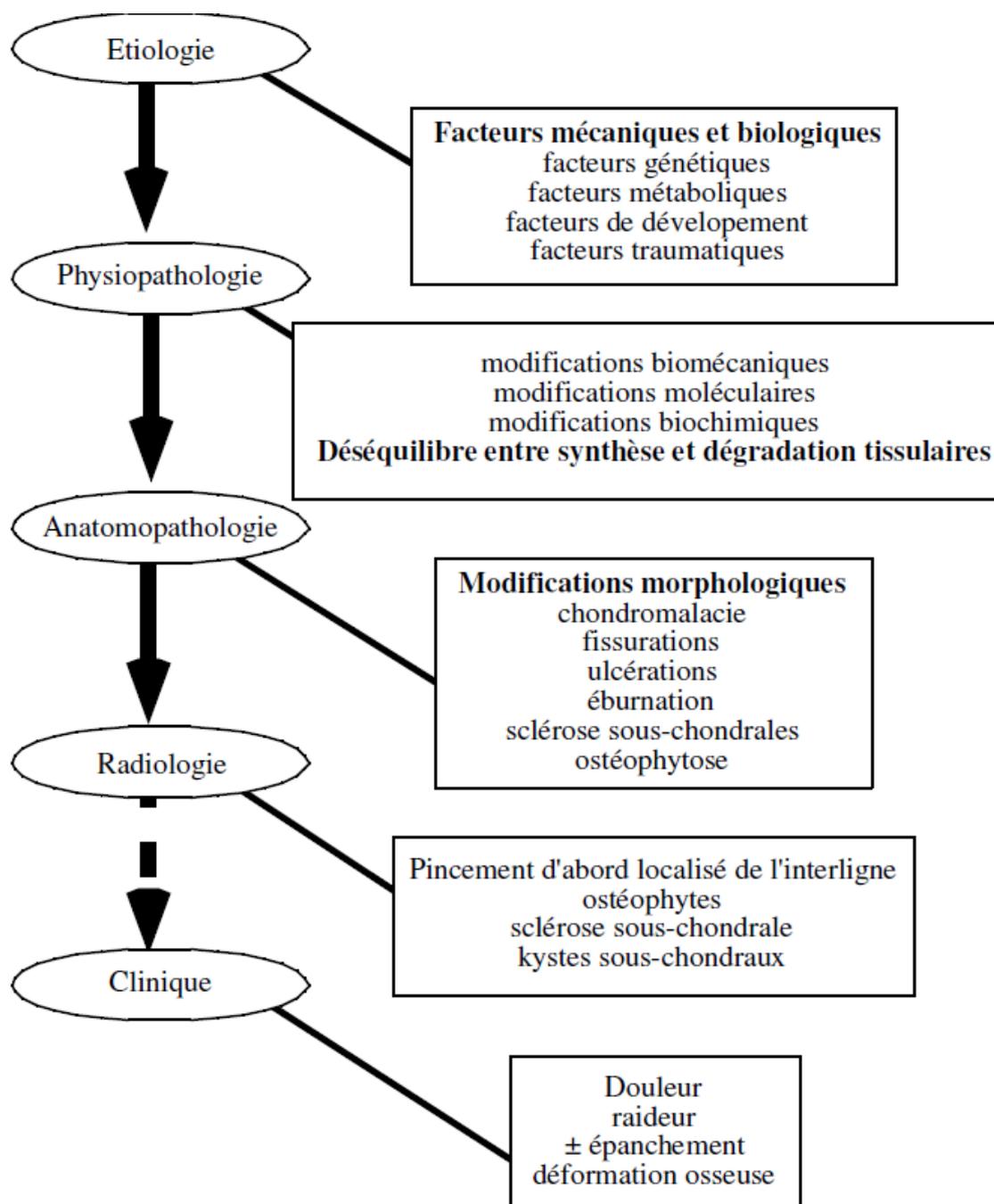
De plus, en ayant choisi de se concentrer à la seule étude du comportement tribologique des interfaces phospholipidiques, ces travaux ont « négligé » le rôle des interactions et des couplages multiples existants entre les différents composants du FS (AH, protéines, phospholipides) et entre ceux-ci et les corps en contact au cours du fonctionnement tribologique articulaire. Pour ce faire il est absolument nécessaire de reproduire dans le modèle *ex vivo* en plus des interfaces lipidiques surfaciques le volume discontinu du fluide synovial comportant les assemblages moléculaires constitués de vésicules remplies du gel glycoprotéique. De plus, il va falloir tester les propriétés tribologiques des interfaces phospholipidiques et celles des vésicules présentes dans le volume du film lubrifiant dans des conditions plus hydrodynamiques, compte tenu du fait que pendant le cycle de la marche, on est à 50% HD. Pour ce faire, comme ce travail a utilisé un mécanisme modèle simplifié dont la cinématique se limite à un mouvement de glissement tandis que **le mécanisme articulaire réel impose des roulements et des glissements**, les travaux futurs devraient aussi reproduire la cinématique réelle (inclure dans le mécanisme le roulement en plus du glissement) afin d'étudier le rôle des assemblages moléculaires du FS dans les régimes de lubrification de type hydrodynamique qui sont aussi associés au fonctionnement d'une articulation saine et à l'évolution des pathologies articulaires.

L'objectif ultime de ses études est la **compréhension des enchaînements « causes-conséquences »** et les interactions des éléments du triplet tribologique articulaire au cours des études tribologiques utilisant des dispositifs expérimentaux adaptés aux conditions de contact reproduisant **l'évolution des pathologies**. Cette compréhension ouvrirait la voie au développement de **traitements ciblés** sur l'élément du contact articulaire responsable de la maladie et notamment de **développer de nouvelles stratégies pour favoriser un diagnostic précoce**, ce qui permettra ensuite de **pouvoir agir sur les causes mécaniques** des dégâts articulaires et de **développer des traitements efficaces** non prothétiques.

ANNEXES

1. DEFINITION DE L'ARTHROSE (D'APRES OMS).....	155
2. SCHEMA GENERAL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ARTHROSE	156
3. HISTOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.....	157
4. EVALUATION DE L'ETAT PATHOLOGIQUE DU FS – ANALYSE DES PRELEVEMENTS.....	162
5. COMPOSITION EN PLS DE FS DE DIFFERENTES ESPECES ET COMPARATIF AVEC LE PLASMA SANGUIN.....	164
6. CALCUL DU NOMBRE DES BICOUCHES QUI PEUVENT ETRE FORMEES PAR LES PLS DES INTERFACES DU FS	165
7. QU'EST-CE QUE C'EST LA « LIPIDOMIQUE » ?.....	166
8. LES ACIDES GRAS	171
9. STOCKAGE (PEREMPTION) ET MANIPULATION DES LIPIDES.....	175
10. PREPARATION DE SOLUTIONS TAMPON (BUFFERS)	177
11. OBTENTION EX VIVO DES SOLUTIONS DE VESICULES PAR EXTRUSION	181
12. METHODES GENERALES D'OBTENTION DES INTERFACES PHOSPHOLIPIDIQUES	183
13. PRINCIPES DE LA CHROMATOGRAPHIE.....	186
14. PROTOCOLES D'ANALYSE LIPIDOMIQUE.....	191
15. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES AFM.....	199
16. PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	202
17. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE FRAPP	203

1. Définition de l'arthrose (d'après OMS)



D'après l'OMS et de l'American Academy of Orthopaedic Surgeons (1994) *l'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuses conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale. L'opinion qui prévaut est que l'arthrose n'est pas une maladie univoque mais un groupe d'affections dégénératives articulaires. En d'autres termes, elle n'est pas une maladie mais un syndrome, l'aboutissement ultime de diverses maladies touchant l'articulation, ayant un caractère dynamique et multifactoriel.* [Lheureux Elise, *L'arsenal pharmacologique dans le traitement de l'arthrose. Focus sur la chondroïtine, thèse en pharmacologie, Université de Lille 2, 2010, 120 p.*].

2. Schéma général de la physiopathologie de l'arthrose

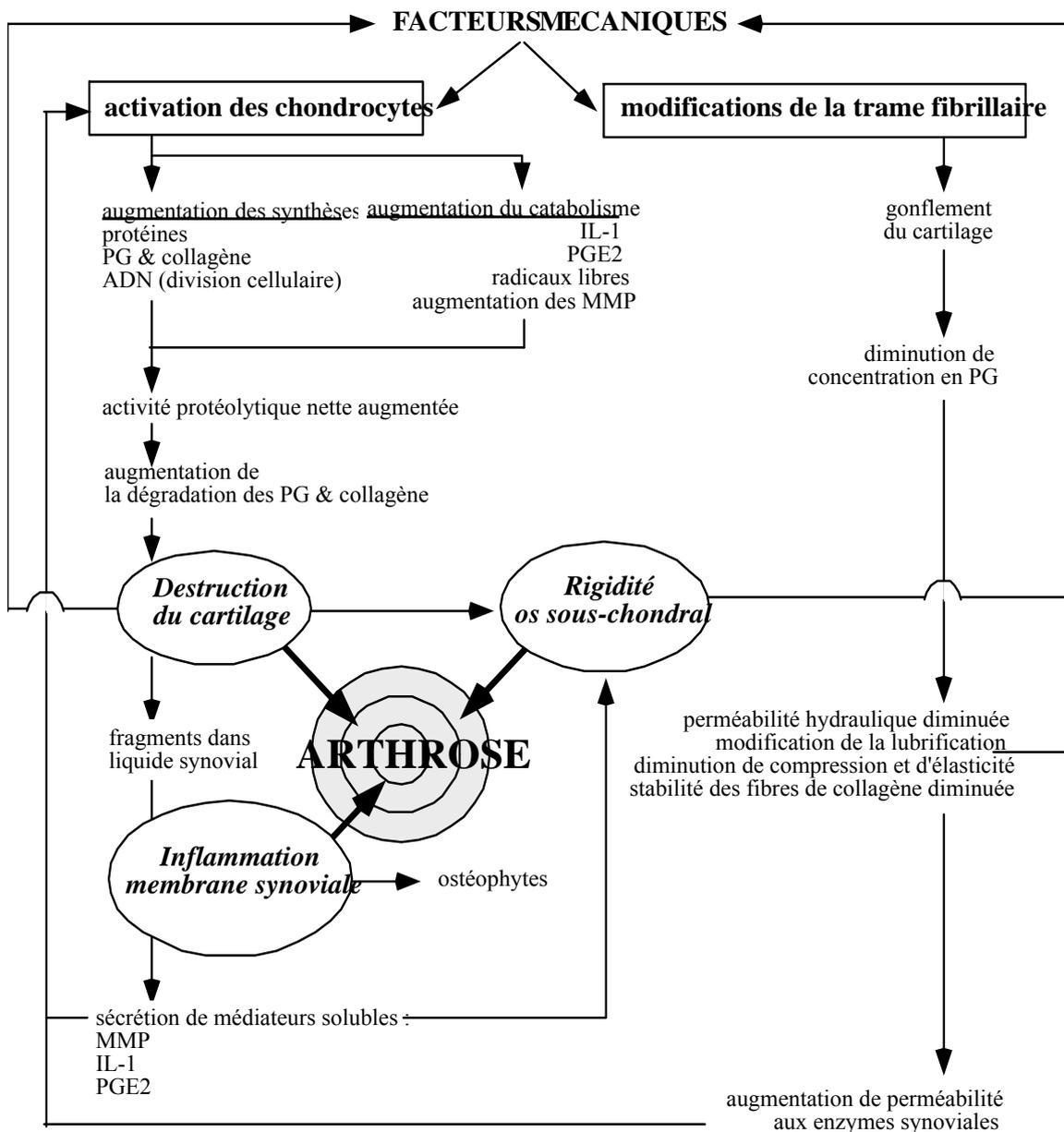


Figure 109. Schéma physiopathologique de l'arthrose

Ce schéma (Fig. 109) intègre les facteurs mécaniques et l'activation du chondrocyte dans la genèse de la maladie (dans *Arthrose, module57, Université de Médecine de Toulouse, Module Appareil Locomoteur, 2011*).

3. Histologie* et physiologie† de la membrane synoviale

Concernant sa **structure**, **la membrane synoviale** est un tissu conjonctif lâche différencié qui s'organise en deux couches (Fig. 110) [62]:

- *intima* (la couche bordante, superficielle), en contact avec la cavité articulaire ;
- *subintima* (la couche sous-intimale, profonde), en contact avec la capsule articulaire ;

L'ensemble des deux couches est séparé de la capsule articulaire par la *subsynoviale*, tissu conjonctif *pauci cellulaire*‡ dans lequel prédomine la substance intercellulaire. En fait la démarcation entre ces différentes couches n'est souvent pas très nette, et par endroits l'intima ne se compose que de synoviocytes isolés au sein d'une subintima très développée.

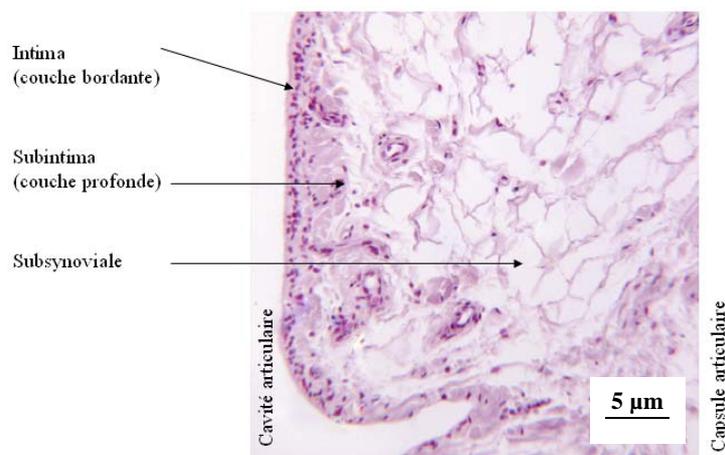


Figure 110. Structure histologique de la membrane synoviale *normale* [83]

- L'intima** (couche bordante de la cavité articulaire), a une épaisseur qui varie entre 20 et 40 µm selon le type de membrane synoviale. Les cellules (synoviocytes fibroblastiques et macrophagiques) sont disposées en une à quatre couches/assises, elles sont riches en enzymes oxydatives, hydrolytiques et en adénosine 5-triphosphatase§. Le milieu intercellulaire contient de grandes quantités d'acide hyaluronique (AH).

En microscopie électronique on distingue deux types de cellules (Fig. 111) [12]:

- *les synoviocytes de type A*, les plus nombreux, qui ont plutôt une fonction phagocytaire** (appareil de Golgi, mitochondries, vacuoles et vésicules très abondantes) ;

* **Histologie** (du grec ancien *hystos* = tissu et *logos* = discours) est la branche de la biologie et de la médecine qui étudie la structure des tissus biologiques et des cellules qui les composent.

† **Physiologie** (du grec *physis* = la nature, et *logos* = l'étude, la science) étudie le rôle, le fonctionnement et l'organisation mécanique, physique et biochimique des organismes vivants et de leurs composants (organes, tissus, cellules et organites cellulaires) et les interactions entre un organisme vivant et son environnement.

‡ **Pauci cellulaire** (du lat. *pauci* = peu et *cellula* = cellule), structure contenant dans sa structure peu d'éléments cellulaires

§ **Adénosine 5-triphosphatase** (ATP-ase) = enzyme qui intervient dans le processus de conversion d'énergie dans l'hydrolyse contrôlée de l'adénosine triphosphate (ATP).

** La **phagocytose** (du grec *phagein* = manger et *kutos* = cellule) consiste en la capture/adhésion, l'ingestion et éventuellement la digestion de particules **solides** inertes ou vivantes du milieu ambiant et a un rôle important dans la fonction immunitaire (c'est en effet un moyen de défense de l'organisme, notamment lors d'infections bactérienne et parasitaire).

- les synoviocytes de type B moins nombreux, ayant une forme plus massive, et peu de prolongements cytoplasmiques par rapport aux synoviocytes de type A. De plus, l'appareil de Golgi est réduit, les mitochondries sont peu abondantes, ainsi que les vacuoles et les vésicules.

En revanche, l'ergastoplasme*, porteur de ribonucléoprotéines, est très développé. Ainsi, ces synoviocytes ont plutôt un rôle de synthèse : ce sont les synoviocytes de type B qui intervient dans le processus de synthèse du FS par la membrane, qui est ensuite secrété dans la cavité articulaire par exocytose† [16].



Figure 111. Synoviocytes (de type A et B) dans la membrane synoviale (vue en microscopie électronique) [12]

La subintima, couche aussi riche en cellules mais beaucoup plus vascularisée (elle contient de nombreux capillaires dans la partie la plus superficielle, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques), comprend des fibroblastes (50%), des histiocytes, des mastocytes et des fibres collagènes. En cas d'inflammation, il se produit une modification de la vascularisation locale qui contribue à une augmentation de la perméabilité vasculaire. La substance fondamentale comprend essentiellement des mucopolysaccharides (glycosaminoglycanes, GAG) [47].

La subsynoviale se confond souvent avec les éléments capsulo-ligamentaires sous-jacents dans la structure articulaire, parce qu'elle contient peu de cellules. Dans les couches superficielles, les cellules sont des cellules conjonctives banales. La substance fondamentale contient des mucopolysaccharides et des fibres collagènes lâches. Dans les couches plus profondes, on distingue des cellules adipeuses qui infiltrent le tissu conjonctif [19].

La **membrane synoviale** remplit plusieurs **fonctions** [4,15,18] :

- rôle sur la **trophicité**‡ les propriétés mécaniques et la stabilité de l'articulation;
- rôle de **défense** contre les agressions extérieures (elle peut donc être considérée

* **Ergastoplasme** = ensemble des éléments bien structurés qui correspondent au *réticulum endoplasmique*, RE (du latin *reticulum* = réseau et *endoplasmique* = à l'intérieur du cytoplasme), structure du cytoplasme cellulaire constituée par un système de tubules et de sacs aplatis avec rôle dans la synthèse et le transport des protéines vers l'appareil de Golgi (qui joue un rôle majeur dans le processus d'exocytose, régulant ainsi le transport vésiculaire de milieu intra- vers le milieu extra- cellulaire) ;

† L'**exocytose** (du grec *-exo* = hors de et de *-kutos* = cavité, cellule) est le mécanisme par lequel la cellule libère de larges biomolécules à travers sa membrane, quand des vésicules de transport ou de sécrétion fusionnent avec la membrane plasmique et que leur contenu sort dans le milieu extracellulaire.

‡ **Trophicité** = Ensemble des phénomènes qui conditionnent la nutrition et le développement d'un tissu (ensemble de cellules), d'une partie de l'organisme ou d'un organe

comme un organe immunitaire) ;

- rôle dans la **synthèse** et la **sécrétion** du **fluide synovial**, par sa fonction de barrière de filtration et d'échanges.

Rôle sur la trophicité de l'articulation

L'acide hyaluronique (AH) est synthétisé par les synoviocytes de type B [9]. Il contribue à la lubrification de l'articulation et à la trophicité du cartilage et des structures ligamento-capsulaires [4]

L'AH* fait partie du groupe des polysaccharides de type GAG, représentant une longue chaîne polymérique composée d'unités disaccharidiques contenant de l'acide glycuronique (GlcA) et du N-acétylglucosamine (GlcNAc) (Fig. 112A) [5,24] qui a une structure bi-hélicoïdale à l'état solide (Fig. 112B) [41].

Dans le FS normal l'AH a un haut poids moléculaire (PM) variant entre 2×10^6 et 7×10^6 Da [20,29] La molécule d'AH étirée dépasserait une longueur de $15 \mu\text{m}$ [23]. Le polysaccharide se trouve dans le FS sous forme de *hyaluronate de sodium* (*syn.* hyaluronan, [2]). La polymérisation de 12500 unités de disaccharides réalise une molécule d'un PM d'environ 5×10^6 Da, analogue à la molécule d'AH tissulaire humain [32]. On le trouve dans une grande variété de tissus (liquide synovial, peau, cordon ombilical, crête de poulet) et largement distribué dans la matrice extracellulaire de nombreux tissus dont le cartilage et la membrane synoviale (sa concentration est très importante dans l'intima où il est synthétisé par les synoviocytes de type A) [24].

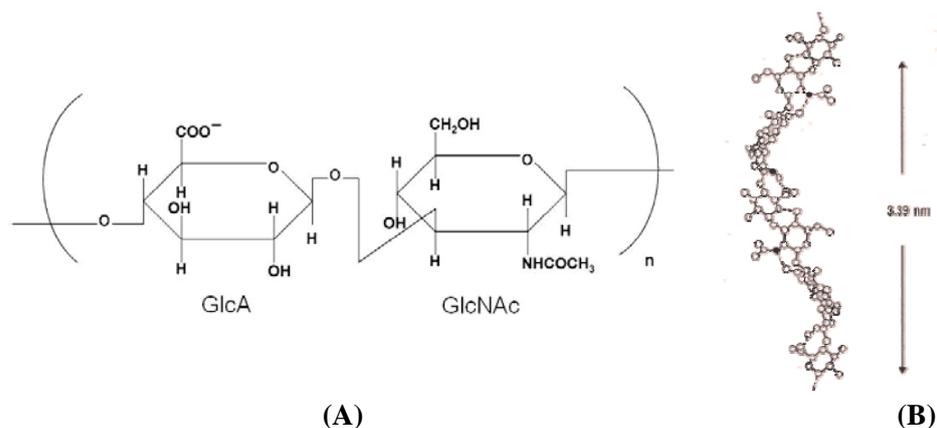


Figure 112. Unité structurale de la molécule d'AH [20,24,29,41]

Les caractéristiques chimiques ou physiques d'AH dépendent donc directement de son PM variable et de sa concentration dans le FS, lui conférant plusieurs **propriétés** [14,24,53]:

- **viscoélastiques** : la molécule d'AH est très hydrophile puisqu'elle peut relier directement environ 4 molécules d'eau par unité disaccharidique, ce qui confère au

* En 1934, Meyer et Palmer l'isolent, définissent chimiquement sa structure primaire et le baptisent acide hyaluronique [MAHEU E, LAMOTTE J, LEQUESNE M. Sel sodique de l'acide hyaluronique (hyaluronan) et gonarthrose (p. 324-339). In: S De Sèze, A Rysckewaert, MF Kahn, D Kuntz, A Dryll, O Meyer, Th Bardin, CI Guérin. L'actualité rhumatologique 1994, Paris, Expansion Scientifique Française ed., 1994]. Les années 50 voient précisées sa structure macromoléculaire sous forme sodique libre dans le FS, ses propriétés et ses fonctions rhéologiques dans le fonctionnement articulaire.

FS une viscosité importante (de l'ordre de quelques Pa.s). De plus, l'AH forme avec l'eau un gel déformable qui devient élastique si les forces de cisaillement appliquées sont plus fortes. Il joue donc un rôle de lubrification et d'absorption des chocs et l'AH est donc considéré « responsable » des propriétés rhéologiques du FS [69].

- antalgiques et anti-inflammatoires : l'AH inhibe la production des PGE₂ dans le FS humain et régule de nombreuses activités cellulaires : inhibition du chimiotactisme, de la migration des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes, inhibition de la phagocytose par les macrophages. Il diminue la production de radicaux libres dans le FS [32,56].
- chondro protectrices : l'AH augmente l'activité métabolique du chondrocyte et du fibroblaste synovial et qu'un déficit en AH provoquerait des modifications de la matrice cartilagineuse avec une dégradation des protéoglycanes [28].
- de cicatrisation : l'AH joue un rôle dans le transport de facteurs de croissance dans le tissu néoformé, favorisant ainsi les processus de cicatrisation [48].

Rôle de défense contre les agressions extérieures

Les *synoviocytes de type A* ont des caractères communs avec les cellules macrophagiques : elles contiennent un appareil de Golgi développé, des lysosomes ainsi que de nombreuses vésicules de *pinocytose*^{*}, suggérant une activité macrophagique, concernant de petites particules ou des débris cellulaires et bactériens. Elles sont renouvelées constamment. Les *synoviocytes* portent à leur surface des antigènes, récepteurs des immunoglobulines et molécules d'adhésion qui sont directement impliqués dans les processus pathologiques tels que la *synovite rhumatoïde* [43].

Barrière de filtration et d'échanges : synthèse du FS.

La membrane synoviale, et en particulier les cellules de l'intima, élaborent et également résorbent le FS, qui est en faible quantité à l'état physiologique [57,65]. Celui-ci est un *dialysat de plasma sanguin* [11,46] auquel s'ajoute l'AH [9,57]. Les échanges entre le sang et la cavité articulaire se font dans les deux sens à travers la barrière synoviale, sous l'effet des pressions hydrostatiques et osmotiques d'une part, et sous l'effet de barrières capillaires et interstitiels propres à la membrane synoviale d'autre part. Les cellules intimes, les macrophages et même les autres cellules de la subsynoviale contrôlent également le transport de substances d'un compartiment à l'autre par pinocytose ou phagocytose [67].

La concentration en électrolytes est peu différente dans le sang et dans le FS [87]. La concentration en sucres du FS est plus faible (glucose, galactose, fructose), ainsi que celle des lipides [13]. Environ trois fois moins de protéines sont trouvées dans le FS sain avec une diminution de l'haptoglobine et des α_2 -globulines, typique des FS traumatiques [9,58]. Les IgG et les IgA y sont retrouvées, les IgM sont pratiquement absentes. *En fait, ce sont les protéines de haut poids moléculaire (PM) qui semblent ne pas pouvoir franchir les différentes barrières* [66]. Ainsi, les petites molécules passent par diffusion entre le plasma et le FS, et

^{*} **Pinocytose** (du grec *pino* = boire, *kutos* = cellule) = est l'ingestion de fluides (gouttelettes) ou de macromolécules au moyen de petites vésicules de diamètre inférieur ou égal à 150 nm ;

les protéines plasmiqes diffusent selon leur PM, leur configuration stérique et leur charge. L'albumine et les protéines de bas PM jouent un rôle important dans la pression osmotique du FS [54] et traversent facilement la membrane synoviale, tandis que le fibrinogène, ayant un PM élevé, est retenu dans le sang ; ce n'est que lors d'une inflammation, que la perméabilité des capillaires est augmentée, et que cette molécule devient détectable dans le FS [66-67].

La membrane synoviale par ses caractéristiques structurales et ses fonctions détermine donc la composition du FS, où l'AH sécrété par les cellules intinales y participe également par son pouvoir de rétention d'eau.

4. Evaluation de l'état pathologique du FS – analyse des prélèvements*

Un prélèvement de FS permet d'évaluer l'état sain ou pathologique et de faire un diagnostic différentiel entre diverses pathologies articulaires. Pour le bon déroulement des protocoles d'analyses suite aux prélèvements de FS il faut noter que :

- le FS sain, peu abondant, très visqueux et transparent est difficile à aspirer ;
- au cours des arthropathies inflammatoires (RA), le FS est fluide et coagule spontanément pendant la réalisation du prélèvement ;
- dans le cas des arthropathies dégénératives (OA), un FS de couleur jaune paille ou jaune citrin revêt une consistance visqueuse collant à l'aiguille ou au doigt si l'on y dépose une goutte ;

Parfois, dans le cas des FS arthrosiques on peut observer dans le prélèvement du FS des petites particules blanchâtres contenant généralement des cristaux calciques et parfois des débris cartilagineux.

Suite à l'obtention des prélèvements pathologiques, différents examens peuvent être effectués :

- des **examens cytologiques et bactériologiques**, utilisés pour différencier les arthrites septiques (avec bactéries) des rhumatismes inflammatoires (sans bactéries mais avec une augmentation du nombre de cellules) où des affections articulaires mécaniques (sans bactéries et sans augmentation du nombre de cellules) ;
- des **examens biochimiques et immunologiques** donnant des informations sur les propriétés physiques du fluide synovial. Suite à l'analyse des FS pathologiques on peut distinguer :
 - o l'augmentation du taux de **protéines** dans les pathologies articulaires de type inflammatoires, due à l'augmentation de leur passage dans le FS à travers les tissus composant l'articulation synoviale suite aux lésions vasculaires pathologiques, à laquelle s'ajoute aussi une augmentation de la synthèse locale par la membrane synoviale ;
 - o dans le cas sain, une concentration d'environ 3mg/ml d'AH de grand PM confère au FS sain une grande viscosité. Au contraire, dans le cas des FS pathologiques inflammatoires on observe une viscosité basse, liée à la baisse du degré de polymérisation et de la concentration d'**AH** dans le FS (voir *Annexe Membrane synoviale*) ;
 - o tandis que dans le cas de FS sain les différents classes de **lipides** (telles que le cholestérol, les triglycérides, les PLs) sont présents à des taux inférieurs aux taux plasmatiques, du fait de la taille importante des lipoprotéines qui leur interdit l'accès à la cavité articulaire à travers la membrane synoviale, dans le cas des pathologies articulaires on a des FS

* Brannan SR, Jerrard DA, Synovial fluid analysis, *Journal of Emergency Medicine*, 30-3, 2006, 331-339

riches en lipides. De ce fait, suite aux prélèvements de FS pathologiques, l'aspect macroscopique est laiteux, crémeux ou chylifère ;

- le dosage de certaines molécules (**enzymes**, fragments de dégradation des **PRG**) dans le FS pourrait renseigner sur l'altération pathologique du métabolisme articulaire ;
- de plus, dans le cas de certaines maladies inflammatoires de type rhumatologiques les dosages immunologiques de **cytokines** montrent des taux élevés des cytokines inflammatoires (notamment celles de type interleukine (IL 1b) et du facteur de nécrose tumorale (TNF, *tumor necrosis factor*).

5. Composition en phospholipides de FS de différentes espèces et comparatif avec le plasma sanguin

Type d'échantillon analysé	Classes de PLs analysées	Quantités (% \pm SD)	Références	
FS (porc)	PC PE PI PS	54,7 \pm 2,23 1,05 \pm 0,62 1,80 \pm 0,62 1,80 \pm 0,62	<i>Higaki H, Murakami T, Nakanishi Y, Lubricating ability of Langmuir-Blodgett films as boundary lubricating films on articular surfaces, JSME, Series C, 40/4, 1997, 776-781</i>	
FS (poulet)	PC PE PI PS	56,9 \pm 2,8 16,9 \pm 1,5 3,2 \pm 0,5 5,8 \pm 0,6	<i>GENGE BR et al, Analytical biochemistry, 322, 2003, 104-115</i>	
FS (bovin)	PC PE PI PS	35,3 \pm 3,3 17,6 \pm 2,4 2,6 \pm 0,4 9,9 \pm 0,4		
FS (humain, sain)	PC PI PS	61,2 \pm 3,3 3,0 \pm 3,0 1,2 \pm 1,2		
Sérum (humain)	PC PI PS	51,3 \pm 6,0 1,8 \pm 2,4 \pm	<i>Bole GG, Synovial Fluid lipids in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis, Arthritis and rheumatism, vol 5, 6, 1962</i>	
FS (humain, rhumatologique)	PC PI PS	52,7 \pm 5,9 2,9 \pm 1,8 \pm		
Plasma (humain)	PC PE PI	59,48 \pm 1,66 3,17 \pm 0,15 1,87 \pm 0,08		
FS (humain, inflammation)	PC PE PI PS	47,62 \pm 1,77 2,87 \pm 0,20 1,55 \pm 0,07 0,26 \pm 0,06	<i>Punzi, L., Todesco, S., Toffano, G., Catena, R., Gigan, F., and Bruni, A. Phospholipids in inflammatory synovial effusions. Rheum. Int. 6:7-11, 1986</i>	
FS (humain, peu inflammatoire)	PC PE PI	49,16 \pm 2,97 2,63 \pm 0,09 1,61 \pm 0,20		
Surface des Condyles fémoraux bovins	PC PE Sph	68,38 \pm 6,2 μ g 46,42 \pm 3,25 μ g 53,68 \pm 2,67 μ g		
FS humain	PC PE PI PS Sph	48 22 6,5 7,4 14	<i>Hills BA, Surface-active phospholipids. Part I, Internal Medecin Journal, 2002, 32, 170-178</i>	

6. Calcul du nombre des bicouches qui peuvent être formées par les PLS des interfaces du FS

On connaît :

- Concentration SAPLs: 0.1-0.3 mg/ml [63, 77];
- Surface du cartilage de genou : 121 cm² [27]
- Section transversale (A₀) pour une molécule de DOPC : 70 Å²/molécule (0.7nm²/molécule) [61]
- Volume du FS dans l'articulation de genou ~2 ml [77]
- M_{DOPC}(g/mol)= 786 g/mol [40]
- Numéro d'Avogadro: N_A ~ 6.023*10²³ molécules/mol [39]

Calculs:

a. Quantité des SAPLs dans le FS du genou:

$$m_{\text{DOPC}} = \text{Conc}_{\text{DOPC}} (\text{mg/ml}) * \text{FS volume (ml)}$$

$$m_{\text{DOPC}} = (0.1 \text{ to } 0.3) \text{ mg/ml} * 2 \text{ ml} = (0.2 \text{ to } 0.6) \text{ mg DOPC}$$

b. Nombre de molécules de DOPC

$$v = m_{\text{DOPC}}(\text{g}) / M_{\text{DOPC}}(\text{g/mol})$$

$$v = (0.2 \text{ to } 0.6) \times 10^{-3} \text{ g} / 786 \text{ g/mol} = (25 \text{ to } 76) \times 10^{-8} \text{ mol}$$

$$n_{\text{DOPC}} \text{ molécules} = v * N_A$$

$$n_{\text{DOPC}} \text{ molécules} = (25 \text{ to } 76) \times 10^{-8} \text{ mol} * 6.023 \times 10^{23} \text{ molécules/mol} \\ = (151 \text{ to } 458) \times 10^{15} \text{ molécules DOPC}$$

c. Surface occupée par les molécules de DOPC si elles formeraient une seule bicouche

$$A_{\text{DOPC bilayer}} = A_0 (\text{nm}^2/\text{molécule}) * n_{\text{DOPC}} \text{ molécules (molécule)} / 2$$

$$A_{\text{DOPC bilayer}} = 0.7 \text{ nm}^2/\text{molécule} * (151 \text{ to } 458) \times 10^{15} \text{ molécule} / 2 \\ = (53 \text{ to } 160) \times 10^{15} \text{ nm}^2 = (530 \text{ to } 1600) \text{ cm}^2 \text{ (bicouche unique)}$$

d. Nombre de bicouches qui peuvent être formées sur la surface du cartilage:

$$n_{\text{bilayers}} = A_{\text{DOPC bilayer}} (\text{cm}^2) / A_{\text{cartilage}} (\text{cm}^2)$$

$$n_{\text{bilayers}} = 530 \text{ to } 1600 \text{ cm}^2 / 121 \text{ cm}^2 = \mathbf{4 \text{ à } 13 \text{ bicouches lipidiques}}$$

7. Qu'est-ce que c'est la « lipidomique » ?

La révolution « *omique* » a stimulé la notion de profilage moléculaire dans la biologie systémique. Bien qu'ayant été une zone à forte intensité de recherche déjà dans les années 1960, la recherche sur les lipides a récemment pris de l'importance avec l'émergence de la **lipidomique** [34,71,81].

La lipidomique a été définie comme « la caractérisation complète des espèces moléculaires lipidiques et de leurs rôles biologiques en ce qui concerne l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme et la fonction des lipides, y compris la régulation des gènes » [74] ou bien « *l'analyse au niveau du système et la caractérisation des lipides et de leurs partenaires d'interaction* » [78,80].

La « lipidomique » ou le profilage des lipides, est une extension de la « métabolomique » où la totalité des lipides d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme est mesurée (Fig. 113, adaptée de [80]). Ainsi, l'analyse lipidomique peut être subdivisée au niveau de la lipidomique des membranes cellulaires, des organites, du métabolisme ou bien des médiateurs [72] qui adresse, soit la description complète et quantitative des lipides constituant les membranes, ou la caractérisation structurale et la quantification d'espèces lipides bioactifs d'une faible abondance, respectivement.

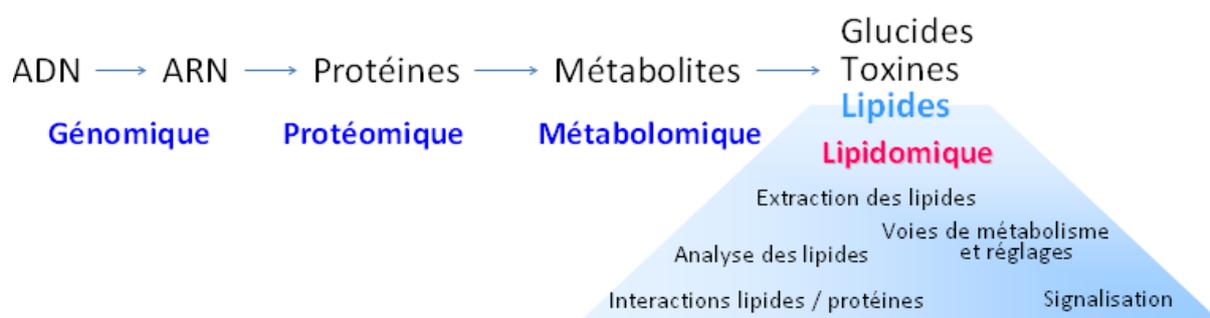


Figure 113. Placement et rôle de l'analyse lipidomique dans les familles des techniques « -omiques » [80]

Elle a été l'objet d'une attention croissante en tant qu'outil de recherche dans des disciplines variées, dont la physiologie, la biochimie des lipides, ou la découverte de biomarqueurs cliniques et pathologiques, grâce à la connaissance de rôles des lipides dans de nombreuses maladies comme le diabète, l'obésité, l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer [22,80]. Utiliser une approche lipidomique permettra ainsi non seulement de fournir des indications sur les rôles spécifiques des espèces moléculaires lipidiques dans la santé et la maladie [25,75], mais aussi d'aider à identifier des biomarqueurs potentiels [42] pour l'établissement des approches préventives ou thérapeutiques* pour la santé humaine [51].

* « *Lipids are in many ways the most important of the biomolecules because they are the ultimate controllers and regulators of our bodily processes ; they are the key to signaling events in cells* » (Edward Dennis)

Les récentes avancées technologiques de la spectrométrie de masse et des techniques chromatographiques ont conduit à l'expansion rapide du champ de recherche lipidomique [60].

7.1. Analyse lipidomique : développement et objectifs

Au cours de 30 dernières années, la biologie cellulaire de base a été un des principaux moteurs de recherche sur les lipides sans pour autant se limiter à l'homéostasie du cholestérol. Des expériences utilisant des organismes modèles (y compris des levures, des vers, des mouches et des souris) ont permis de mieux comprendre le métabolisme des lipides dans les organismes vivants. Utilisant des méthodes modernes de génétique en combinaison avec des tests fonctionnels, ces études portent sur le rôle des nombreux enzymes agissant sur les lipides (lipases, kinases, phosphatases et transférases). Le caractère commun à ces études est de mettre l'accent sur les aspects « mécanistiques » nécessaires à la compréhension de la biologie des lipides au niveau moléculaire [52].

L'objectif principal de la lipidomique est l'identification des voies métaboliques qui sont activées ou désactivées au cours du développement d'un organisme ou lorsque la cellule est « déplacée » d'un état physiologique préétabli à une autre condition physiologique ou pathologique (métabolique d'apprentissage). Une meilleure compréhension des réglages de voies métaboliques sous-jacentes est nécessaire afin de concevoir de nouvelles stratégies d'intervention [26,80].

Le **lipidome**, cet à dire les lipides constituant les biomembranes et celles qui sont en circulation en tant que molécules de signalisation (dans les fluides biologiques) [74] reflètent des états physiologiques à un instant donné.

L'analyse conjointe des lipides et des protéines (superposition de la lipidomique avec la protéomique) aide à mieux comprendre l'importance moléculaire de la relation temporelle entre métabolites et enzymes [31,33,35,85]. Ainsi l'analyse minutieuse des lipides est probablement la mieux placée pour mettre en évidence de manière raffinée des biomarqueurs définis [3,80].

7.2. Technologies pour l'analyse lipidomique

Jusqu'à présent, l'explosion de l'information dans les domaines de la génomique et de la protéomique n'a pas connu d'équivalent dans le domaine des lipides. Ceci est largement dû à la complexité des lipides, car la nature est capable de synthétiser un énorme nombre d'espèces lipidiques chimiquement et structurellement distinctes. En outre, d'outils puissants pour l'analyse des lipides manquaient.

De nouvelles approches d'analyse permettent maintenant d'analyser les systèmes des lipides et de leurs partenaires d'interaction [52]. Deux technologies de base se sont avérées utiles pour l'analyse des lipides : la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (MS) [6].

La spectroscopie RMN nécessite la préparation d'échantillons en relativement faible quantité et est non destructive, ce qui permet une analyse plus approfondie. Toutefois, cette méthode a une faible sensibilité et peut donc détecter seulement les composants présents en forte quantité dans l'échantillon.

L'analyse des lipides est traditionnellement effectuée par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS). Cependant, le développement de nouvelles techniques : Ionisation par ElectroSpray (ESI) [10,34,82] et la Désorption / Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) [64] a considérablement élargi la gamme des lipides qui peuvent être analysés par MS dans les matériaux non fractionnés (« *shotgun lipidomics* » [84]). Le couplage de l'ESI-MS et de la Chromatographie Liquide (LC) a considérablement augmenté le nombre de classes de lipides qui puissent être étudiés au cours d'une expérience unique [59,85].

John B. Fenn a également souligné l'importance de la MS pour les développements dans ce domaine [21,45,55,86]. Il a été lauréat de prix Nobel de chimie en 2002 « *pour le développement de méthodes d'identification et d'analyses structurales de macromolécules biologiques (...) pour leur développement des méthodes de désorption par ionisation douce pour des analyses de macromolécules biologiques par MS* » [1].

Un aperçu des différentes technologies utilisées dans la recherche lipidomique est présenté dans le tableau 11 [80].

Dans ce contexte, il peut être déclaré que le « succès » de l'analyse lipidomique résulte principalement des progrès technologiques concernant la MS. L'avantage des techniques d'analyse lipidomique est qu'elles permettent une analyse à haut débit avec une grande sensibilité et une grande résolution, ainsi que la capacité d'automatiser l'analyse d'échantillons et l'accès aux résultats obtenus [36].

Le *challenge* dans le domaine des analyses lipidomiques des phospholipides est de faire une caractérisation complète de la variabilité de composition en lipides dans le milieu vivant dans le contexte d'un fonctionnement sain aussi bien que dans le cas de diverses pathologies [59]. Dans l'idée que les plus grands défis de la lipidomique restent l'élucidation d'importants phénomènes pathologiques et l'intégration de la grande quantité de nouvelles données devenues disponibles [6].

7.3. Classification des lipides

De manière générique, pour comprendre l'entité de l'ensemble « lipidomique » plusieurs classes de lipides (qui constituent le « **lipodome** ») doivent être étudiées (Fig. 114) [79].

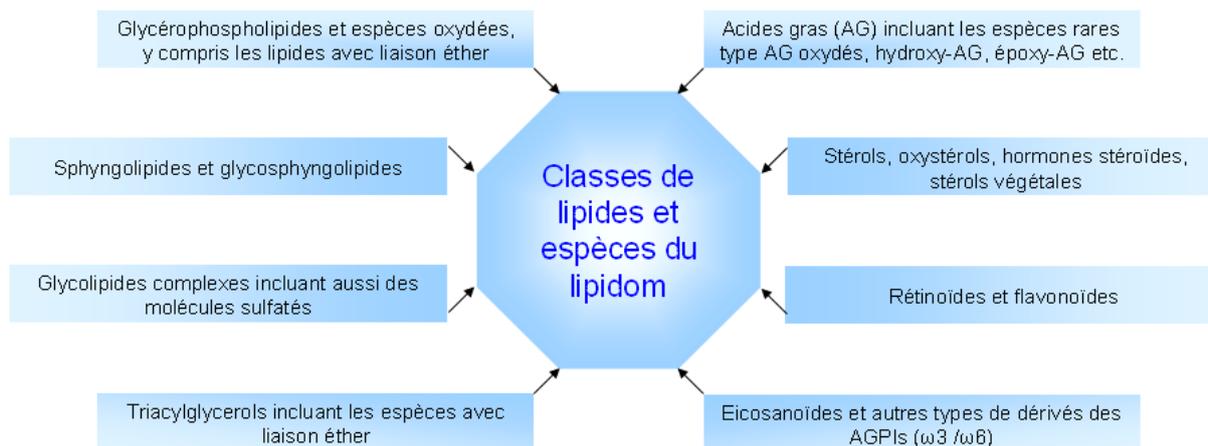


Figure 114. Classes de lipides étudiées par l'analyse lipidomique [79]

La diversité chimique/lipidique dans les échantillons biologiques facilite l'adaptation spécifique de la réponse cellulaire aux altérations des nutriments cellulaires, l'histoire du métabolisme et les événements de signalisation.

Le rôle essentiel des lipides dans la physiologie des cellules, des tissus et des organes est déjà démontré par de nombreuses maladies humaines impliquant la perturbation des actions des enzymes et des voies du métabolisme des lipides. Exemples de telles maladies : le diabète, le cancer, les maladies de troubles neuro-dégénératives et les maladies infectieuses [80].

Comme cela a été décrit en début de chapitre, l'analyse lipidomique consiste à caractériser les espèces moléculaires des lipides dans les échantillons biologiques. Les analyses des lipides présents dans des fluides synoviaux sont donc pertinentes pour ce travail de thèse, dont l'objectif est de comprendre le rôle des assemblages lipidiques dans le fonctionnement articulaire, dans les cas sain et pathologique, en particulier celles concernant le profil des **phospholipides**, ayant, selon des études récentes (voir *paragraphe §A.2.3.*), un rôle important dans les performances tribologiques remarquables des articulations synoviales [7,17,38,70].

Tableau 11. Technologies utilisées dans la recherche lipidomique [80]

Technologie	Lipides étudiés	Avantages	Inconvénients
<i>Spectrométrie de masse (MS)</i>			
MALDI	Plusieurs classes de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • association de TCL, détection directe par m/z 	<ul style="list-style-type: none"> • milieu de la matrice • suppression d'ionisation
ESI	Plusieurs classes de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • association de LC, détection directe par m/z • sensibilité et sélectivité ↑ • turnover ↑ 	<ul style="list-style-type: none"> • une quantification absolue difficile • suppression d'ionisation
<i>RMN</i>			
^1H	Tous les lipides	<ul style="list-style-type: none"> • non destructive, • mesure directe 	<ul style="list-style-type: none"> • sensibilité ↓ • les spectres sont dominés par des lipides abondants
^{31}P	Phospholipides	<ul style="list-style-type: none"> • non destructive, mesure directe, quantitative 	<ul style="list-style-type: none"> • sensibilité ↓
<i>Chromatographie</i>			
GC	Composants non polaires	<ul style="list-style-type: none"> • détection par MS, utilisée principalement pour les AG (FA) 	<ul style="list-style-type: none"> • nécessite la dérivation des lipides polaires ou des composants volatils
HLPC	Plusieurs classes de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • quantitative, • automatisation facile 	<ul style="list-style-type: none"> • détection par détecteur de masse ou indice réfractif
TLC	Plusieurs classes de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • technique facile • peu d'investissement en matériel 	<ul style="list-style-type: none"> • sensibilité ↓ • inconvénients au niveau de la résolution
<i>Biochimie</i>			
Lipides photo activables	Quelques classes de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • identification de protéines liées aux lipides 	<ul style="list-style-type: none"> • nombre limité d'échantillons
Anticorps lipidiques	Très peu de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • études en biologie cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • spécificité des anticorps
Lipides immobilisés dans des kits d'essais	Plusieurs classes de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • identification des interactions lipid-ligand 	<ul style="list-style-type: none"> • techniquement difficile à automatiser et à immobiliser
Lipides solubles dans des kits d'essais	Plusieurs classes de lipides	<ul style="list-style-type: none"> • études quantitatives sur les interactions • ↑ turnover 	<ul style="list-style-type: none"> • techniquement difficile à optimiser

8. Les acides gras

Les queues non polaires de la majorité des phospholipides sont constituées de molécules d'**acides gras** à longues chaînes. Dans le milieu vivant, la chaîne hydrocarbonée de ces résidus d'**acides gras** possède en général de 12 à 24 atomes de carbone.

Les acides gras varient entre eux selon la longueur de leur chaîne d'atomes de carbone (de 4 à 22) et le nombre de doubles liaisons entre les atomes de carbone qu'ils contiennent.

A titre d'exemple, l'acide butyrique (4:0), l'acide palmitique (16:0) et l'acide arachidique (20:0) comportent respectivement une chaîne de 4, 16 et 20 atomes de carbone

Les acides gras sont classés selon le nombre de doubles liaisons qu'ils possèdent : les acides gras saturés n'en comportent pas, alors que les acides gras mono insaturés en comportent une et les acides gras poly insaturés, plus d'une (Fig. 115).

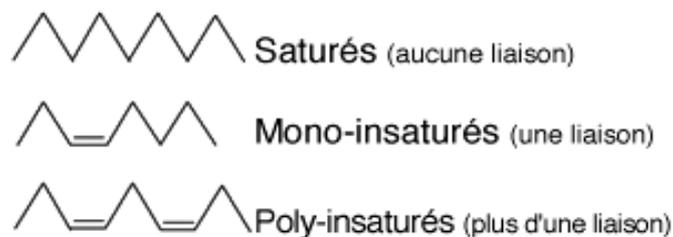


Figure 115. Classification des acides gras (en fonction de nombre de doubles liaisons, C=C)

La présence d'une double liaison C=C provoque l'existence de deux isomères de configuration *cis* et *trans*. Cette double liaison est plus rigide qu'une liaison simple C-C. La configuration *cis* introduit un pli rigide (une inflexion d'environ 30°) dans la chaîne acyle (Fig. 116) :

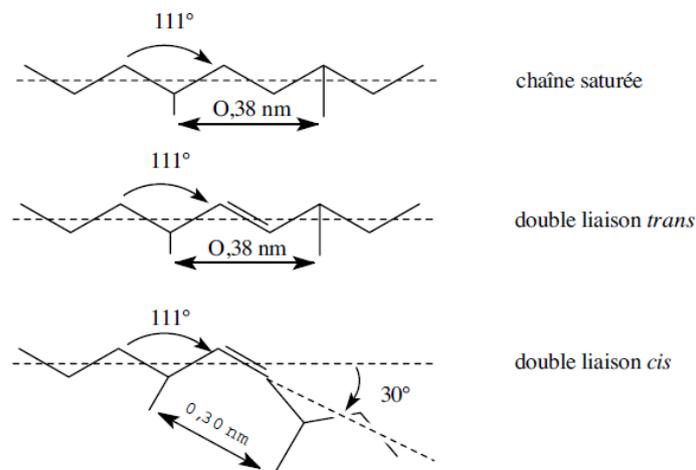


Figure 116. Orientation de la chaîne acyle suite à la présence d'une liaison double, C=C

La longueur de la chaîne carbonée (chaîne acyle) et le nombre de doubles liaisons - ce qu'on appelle le **degré d'insaturation** - influencent le point de fusion et ainsi la transition de phase d'un état « sol » vers un état plus fluide (« gel »).

Ainsi, lorsque le nombre d'atome de carbone d'un acide gras (le nombre de double liaison carbone=carbone restant constant) augmente, la température de fusion croît. Lorsque le nombre de double liaison carbone=carbone augmente (à nombre de carbone constant), la température de fusion décroît.

Par exemple, pour les acides gras saturés, plus la chaîne est longue, plus le point de fusion est élevé : 44,2°C pour l'acide laurique (12 :0), 75,4°C pour l'acide arachidique (20 :0). Ceci tient au fait que plus la chaîne est longue plus les interactions de Van der Waals entre les chaînes sont puissantes donc difficiles à rompre. Il faut donc fournir d'autant plus d'énergie pour désintégrer la structure de l'état solide que le nombre de carbone de la chaîne est élevé.

La présence de doubles liaisons entraîne une courbure de la chaîne carbonée qui interfère avec la possibilité de former des structures compactes très ordonnées. Les forces de Van de Waals entre chaînes en sont d'autant plus affaiblies. Cela se répercute sur la température de fusion des composés : 69,6°C pour l'acide stéarique en C18 sans double liaison contre 13,4°C pour l'acide oléique de même nombre de carbone avec une double liaison.

Sous l'action de la **phospholipase A₂**, les phospholipides membranaires libèrent l'acide arachidonique (20:4), acide gras poly insaturé à 20 carbones et 4 doubles liaisons qui est un substrat d'actions enzymatiques produisant des médiateurs à action extracellulaire : facteurs d'adhérence, d'agrégation plaquettaire, de perméabilité vasculaire ou encore intermédiaire de réaction inflammatoire ou allergie. Leurs noms dérivent de leur localisation et l'on citera les prostaglandines (PG), sécrétion de la prostate, les prostacyclines (PC), tromboxanes (TX), leucotriènes (LT).

La présence dans une chaîne aliphatique de phospholipides d'une ou plusieurs doubles liaisons détermine une « déviation » dans la conformation. Ceci est présenté dans la figure 117.

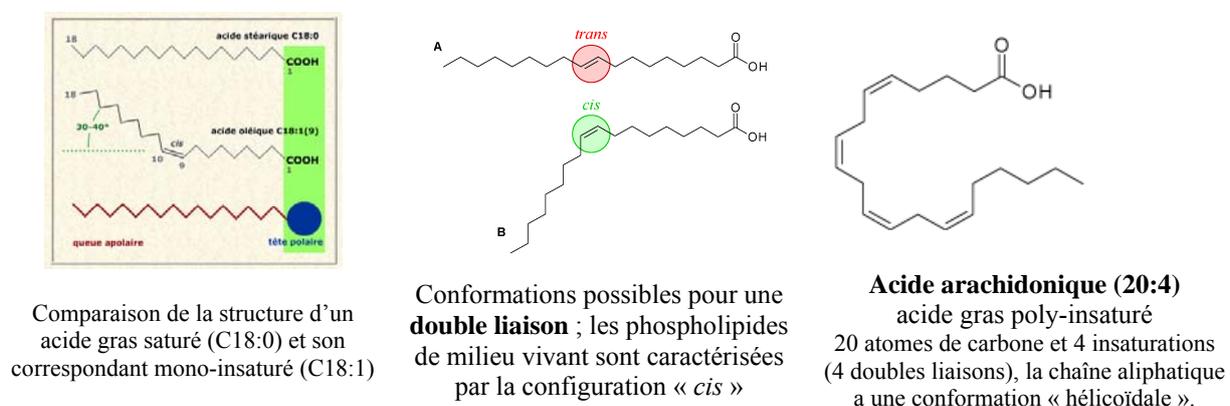


Figure 117. Comparaison des structures saturées, mono et poly-insaturées

Tableau 12. Principaux acides gras saturés

Nom usuel	Nomenclature chimique (IUPAC)	Nomenclature physiologiques	Formule semi-développée chimique
acide butyrique	acide butanoïque	C4:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂ -COOH
acide valérique	acide pentanoïque	C5:0	H ₃ C-(CH ₂) ₃ -COOH
acide caproïque	acide hexanoïque	C6:0	H ₃ C-(CH ₂) ₄ -COOH
acide énanthique	acide heptanoïque	C7:0	H ₃ C-(CH ₂) ₅ -COOH
acide caprylique	acide octanoïque	C8:0	H ₃ C-(CH ₂) ₆ -COOH
acide pélargonique	acide nonanoïque	C9:0	H ₃ C-(CH ₂) ₇ -COOH
acide caprique	acide décanoïque	C10:0	H ₃ C-(CH ₂) ₈ -COOH
acide undécyclique	acide undécanoïque	C11:0	H ₃ C-(CH ₂) ₉ -COOH
acide laurique	acide dodécanoïque	C12:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₀ -COOH
acide tridécyclique	acide tridécanoïque	C13:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₁ -COOH
acide myristique	acide tétradécanoïque	C14:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₂ -COOH
acide pentadécyclique	acide pentadécanoïque	C15:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₃ -COOH
acide palmitique	acide hexadécanoïque	C16:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₄ -COOH
acide margarique	acide heptadécanoïque	C17:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₅ -COOH
acide stéarique	acide octodécanoïque	C18:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₆ -COOH

Tableau 13. Principaux acides gras insaturés

Nom usuel	Abréviation utilisée en biochimie	Nomenclature chimique (IUPAC)	Nomenclature physiologique
Acide gras mono-insaturés			
acide palmitoléique		acide 7Z-hexadécénoïque	C16:1 w-7
acide oléique		acide 9Z-octadécénoïque	C18:1 w-9
acide érucique		acide 13Z-docosaénoïque	C22:1 w-9
acide nervonique		acide 15Z-tétracosaénoïque	C24:1 w-9
Acide gras poly-insaturés			
acide linoléique	AL	acide 9Z,12Z-octadécadiénoïque	C18:2 w-6
acide alpha-linolénique	ALA	acide 9Z,12Z,15Z-octadécatriénoïque	C18:3 w-3
acide arachidonique		acide 5Z,8Z,11Z,14Z-éicosatétraénoïque	C20:4 w-6
acide éicosapentaénoïque	EPA	acide 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-éicosapentaénoïque	C20:5 w-3
acide docosahexaénoïque	DHA	acide 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaénoïque	C22:6 w-3

Tableau14. Températures de la Transition de Phase des PLs [*Avanti Polar Lipids**]

Phosphatidylcholine		Phosphatidylglycerol (Sodium Salt)		
Product	T _m (°C)	Product	T _m (°C)	
12:0 PC (DLPC)	-1	12:0 PG (DLPG)	-3	
13:0 PC	14	14:0 PG (DMPG)	23	
14:0 PC (DMPC)	23	16:0 PG (DPPG)	41	
15:0 PC	33	18:0 PG (DSPG)	55	
16:0 PC (DPPC)	41	18:1 PG (DOPG)	-18	
17:0 PC	48	16:0-18:1 PG (POPG)	-2	
18:0 PC (DSPC)	55	Phosphatidylserine (Sodium Salt)		
19:0 PC	60	14:0 PS (DMPC)	35	
20:0 PC	66	16:0 PS (DPPC)	54	
21:0 PC	72	18:0 PS (DSPC)	68	
22:0 PC	75	18:1 PS (DOPS)	-11	
23:0 PC	79	16:0-18:1 PS (POPS)	14	
24:0 PC	80	Phosphatidic Acid (Sodium Salt)		
16:1 PC	-36	12:0 PA (DLPA)	31	
18:1c9 PC (DOPC)	-20	14:0 PA (DMPA)	50	
18:1t9 PC	12	16:0 PA (DPPA)	67	
18:1c6 PC	1	18:0 PA (DSPA)	75	
18:2 PC	-53	18:1 PA DOPA)	-8	
18:3 PC	-60	16:0-18:1 PA (POPA)	28	
20:4 PC	-70	Phosphatidylethanolamine		
14:0-16:0 PC	35		T _m (°C)	T _h (°C)
14:0-18:0 PC	40	12:0 PE (DLPE)	29	
16:0-14:0 PC	27	14:0 PE (DMPE)	50	
16:0-18:0 PC	49	16:0 PE (DPPE)	63	118
16:0-18:1 PC (POPC)	-2	18:0 PE(DSPE)	74	100
16:0-22:6 PC	-27	20:0 PE	83	96
18:0-14:0 PC	30	18:1c9 PE (DOPE)	-16	10
18:0-16:0 PC	44	18:1t9 PE	38	64
18:0-18:1 PC	6	18:2 PE	-40	-15
18:1-16:0 PC	-9	18:3 PE		-30
18:1-18:0 PC	9	16:0-18:1 PE (POPE)	25	71

* Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins, Dr. John R. Silvius, **Lipid-Protein Interactions**, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1982, reprinted with permission from John Wiley & Sons, Inc.

9. Stockage (péremption) et manipulation des lipides*

a. Solutions organiques:

Les phospholipides qui sont fournis comme une solution organique doivent être stockés dans un récipient en verre fermé sous argon ou azote, à $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, protégés de lumière.

Le stockage des solutions organiques inférieures à -30°C n'est pas recommandée, sauf si la solution est conditionnée dans une ampoule en verre scellée. La fermeture de la fiole doit être bordée de téflon.

Les solutions organiques ne doivent jamais être stockées dans des conteneurs en plastique ou polymère (polystyrène, polyéthylène, polypropylène, etc) car cela va libérer des impuretés hors du conteneur. Les solutions de lipides dans l'eau peuvent être stockées dans du plastique.

Transfert des solutions organiques:

Toujours utiliser le verre, l'acier inoxydable ou le téflon pour transférer les lipides stockés sous forme de solutions organiques.

- NE PAS utiliser des embouts de pipettes en plastique pour le transfert de solutions organiques de lipides ;
- NE PAS utiliser des tubes Eppendorf avec des solvants organiques
- NE PAS utiliser du Parafilm avec des solvants organiques

b. Poudres

Les phospholipides sous forme de poudre doivent être manipulés comme décrit ci-dessous.

Lipides saturés:

Les lipides composés d'acides gras qui sont complètement saturés (par exemple, le dimyristoyl- ou dipalmitoyl- phosphatidylcholine – DMPC ou DPPC) sont stables sous forme de poudres. Ces lipides doivent être stockés dans un récipient en verre avec une fermeture en téflon à $\leq -16^{\circ}\text{C}$. Lors du transfert d'une partie de la matière du contenant, retirez le récipient du congélateur et laissez le produit atteindre la température ambiante avant d'ouvrir le flacon.

Lipides insaturés ou dérivés de tissus:

Les lipides composés d'acides gras contenant une ou plusieurs doubles liaisons (par exemple, le dioleoyl-phosphatidylcholine, DOPC) ne sont pas stables sous forme de poudres. Ces lipides sont très hygroscopiques en tant que poudres et vont rapidement absorber l'humidité et devenir gommeux à l'ouverture du conteneur. Cela pourrait aboutir à l'hydrolyse ou

* http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1679&Itemid=398
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/T1391?ICID=search-product>

l'oxydation de la matière. Ces lipides doivent être dissous dans un solvant organique approprié, transférés dans un récipient en verre avec une fermeture en téflon, et conservés à $<20^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$. Le stockage des solutions organiques inférieure à -30°C n'est pas recommandé, sauf si la solution est conditionnée dans une ampoule en verre scellée.

En général, la forme « poudre » de lipides est la plus stable pour le stockage, cependant, les lipides insaturés sous forme de poudres sont hygroscopiques et ne peuvent pas être facilement pesés. Les lipides saturés peuvent donc être achetés sous forme de poudres (P) tandis que les lipides insaturés devraient être achetés sous forme de solution de chloroforme (C). Si les lipides sont stockés pendant une longue période de temps, on peut acheter sous forme de poudre pour le stockage, puis dissoudre la poudre en utilisant du chloroforme lorsqu'on est prêt à l'emploi de lipide dans les essais expérimentaux. Pour utiliser la solution de chloroforme, la quantité nécessaire de la solution de lipides est transférée (en utilisant l'acier inoxydable, de verre ou du téflon - NE PAS UTILISER les embouts de pipettes en plastique) dans un flacon en verre et le chloroforme évaporé en utilisant l'azote ou l'argon. Le film lipidique obtenu peut être hydraté ou remis en suspension dans un solvant approprié pour la lyophilisation.

Dates de péremption des lipides utilisés dans nos essais:

- 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (**DPPC**) : réf : 850355C, **6 mois** et 850355P, **2 ans**
- 1-palmitoyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphocholine (**NBD-PC**), 810131P et 810131 C, **3-6 mois** ;
- *N*-(6-tetramethylrhodaminethiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (**TRITC DHPE**), réf 71391 (Invitrogen), **3-6 mois**
- 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (**DOPC**) : réf 850375C, **6 mois** ;
- 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (**DOPE**) : réf 850725C, **6 mois** ;
- 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-serine (sodium salt) (**DOPS**): réf 840035C, **6 mois** ;
- 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*myo*-inositol) (ammonium salt) (**DOPI**): réf 850149C, **6 mois**.

10. Préparation de solutions tampon (buffers)*

Les principales solutions tampon (buffers) qui peuvent être utilisées à un pH spécifique sont présentées dans la figure 118.

Ci après sont détaillés sous forme de tableaux les recettes à utiliser pour obtenir la solution tampon au pH nécessaire à une utilisation expérimentale spécifique. La précision des tableaux est de ± 0.05 pH à 23°C, sachant toutefois que dans la majorité des cas, la valeur de pH ne variera pas plus de ± 0.12 pH même à 37°C, avec une très légère variation de la molarité (généralement 0.05M).

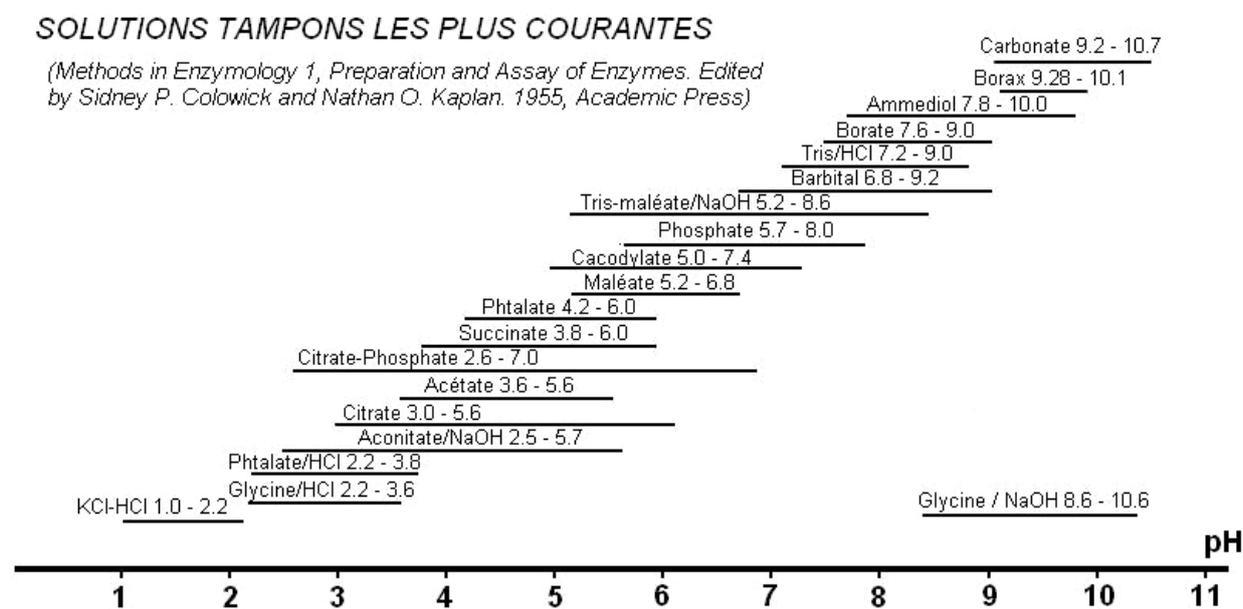


fig. 1

Figure 118. Solutions buffers les plus courantes en fonction du pH.

a. BUFFER ACETATE

Solutions stock :

- A : 0.2 M solution acide acétique (11.55 ml dans 1000 ml)
- B : 0.2 M solution d'acétate de sodium (16.4g acétate de sodium ou 27.2g acétate de sodium hydrate dans 1000 ml)

Pour obtenir une solution tampon acétate à un pH donné il faut prendre : x ml (solution stock A) + y ml (solution stock B), l'ensemble à diluer jusqu'à un volume total de 100ml :

* *Sélection de:* Methods in Enzymology, 1955, vol. 1 – Preparation and assay of enzymes, Ed. SP Colowick et NO Kaplan, chap 16 – General preparative procedures, p. 138-146

X ml sol stock A	Y ml solution stock B	pH final
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

b. BUFFER TRIS MALEATE

Solutions stock :

- A: 0.2 M solution Tris acide maléate (24.2g poudre Tris HCl + 23.2 g acide maléique ou 19.6 anhydride maléique dans 1000 ml)
- B : 0.2 M NaOH

Pour obtenir une solution tampon TRIS maléate à un pH donné il faut prendre :
50 ml solution A + x ml solution B, l'ensemble à diluer jusqu'à un volume total de 200ml :

X ml sol stock B	pH final	X ml solution stock B	pH final
7.0	5.2	48.0	7.0
10.8	5.4	51.0	7.2
15.5	5.6	54.0	7.4
20.5	5.8	58.0	7.6
26.0	6.0	63.5	7.8
31.5	6.2	69.0	8.0
37.0	6.4	75.0	8.2
42.5	6.6	81.0	8.4
45.0	6.8	86.5	8.6

c. BUFFER TRIS

Solutions stock :

- A: 0.2 M solution Tris HCl (24.2g poudre Tris HCl dans 1000 ml)
- B : 0.2 M NaOH

Pour obtenir une solution tampon TRIS maléate à un pH donné il faut prendre :
50 ml solution A + x ml solution B, l'ensemble à diluer jusqu'à un volume total de 200ml :

X ml sol stock B	pH final
5.0	9.0
8.1	8.8
12.2	8.6
16.5	8.4
21.9	8.2
26.8	8.0
32.5	7.8
38.4	7.6
41.4	7.4
44.2	7.2

d. BUFFER PHOSPHATE

Solutions stock :

- A: 0.2 M solution de phosphate de sodium monobasique (27.8g dans 1000 ml)
- B : 0.2 M solution de phosphate sodium dibasique (53.65g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou 71.7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml)

Pour obtenir une solution tampon phosphate à un pH donné il faut prendre :

x ml solution A + y ml solution B, l'ensemble à diluer jusqu'à un volume total de 200ml :

X ml sol A	Y ml sol B	pH final	X ml sol A	Y ml sol B	pH final
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

e. SOLUTIONS STOCK pour la hydratation des lentilles HEMA et les essais sur tribomètre

- SOLUTIONS TAMPONEES « TRIS »

Tout d'abord il faut préparer une solution TRIS à 0.2 M (24,2 g TRIS en 1000mL eau ultra pure)

- Solution tamponnée TRIS 50 mM à pH 7,2

	Recette 1	Recette 2
	50 ml sol TRIS 0.2M	50 ml sol TRIS 0.2M
	44.2 ml sol HCl 0.2M	8.84 ml sol HCl 1N
	105,8 ml eau ultra pure	141,16 ml eau ultra pure
Volume total sol TRIS 50mM, pH 7,2	200 ml	200 ml

- Solution tamponnée TRIS 15 mM à pH 7,2

Solution	Quantités
TRIS 50mM pH 7,2	300 ml
Eau ultra pure	700 ml
Volume total sol TRIS 15mM, pH 7,2	1000 ml

- Solution tamponnée TRIS 50 mM à pH 9

	Recette 1	Recette 2
	50 ml sol TRIS 0.2M	50 ml sol TRIS 0.2M
	5 ml sol HCl 0.2M	1 ml sol HCl 1N
	145 ml eau ultra pure	149 ml eau ultra pure
Volume total sol TRIS 50mM, pH 9	200 ml	200 ml

- SOLUTION TAMPONEE « TRIS » SALEE (NaCl 150 mM)

Solution	Quantités
TRIS 15 mM pH 7,2	1000 ml
NaCl (poudre)	8,775 g
Volume total sol TRIS 15mM NaCl 150mM, pH 7,2	1000 ml

Utile :

$M_{\text{TRIS}} = 121,14 \text{ g/mol}$; $M_{\text{NaCl}} = 58,5 \text{ g/mol}$; $M_{\text{HCl}} = 36,5 \text{ g/mol}$

TRIS = Trizma[®] base Primary Standard and Buffer, ($\geq 99.9\%$ Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l., T1503-100g)

L'eau ultra pure utilisée a un pH d'environ 5,5.

11. Obtention ex vivo des solutions de vésicules par extrusion

Matériel :

Lipides (DPPC, DOPC, etc.) : 20 mg

Lipides fluorescentes (NBDPC et/ou T1391) : 0.20 mg

Ethanol (1 ml) ; Chloroforme (1 ml) ; Ether éthylique (1ml)

Solution tampon TRIS 15 mM, pH 7.2, obtenue selon la recette suivante :

- A partir de 3,6342g Tris (Trizma[®] base Buffer, ≥99.9% Sigma-Aldrich) et 150 ml eau ultra pure on obtient 150 ml solution Tris 0.2M (pH ~ 9)
- Partant de cette solution on rajoute 423.48 ml eau ultra pure et 26.52 ml HCl 1N (ou équivalent en fonction de la solution HCl en stock au labo) on obtient 600ml solution tamponnée Tris 50mM, pH 7.2
- Utilisant 300ml solution tampon Tris 50mM, on y rajoute 700ml eau ultra pure et on doit obtenir 1l solution tampon Tris 15mM, pH 7.2

Méthodologie :

Pour obtenir des MLVs à extruder afin d'obtenir des LUVs

- solubilisation des poudres lipidiques en utilisant un mélange de solvants chloroforme/éthanol (9:1, v/v) afin d'obtenir une solution contenant 20 mg/ml lipides (DOPC, DPPC, mélange de différentes lipides, ... selon protocole) et 0.2 mg/ml lipide fluorescent,
- mélange des deux solutions (20mg/ lipide et 0.2 mg lipide fluorescent)
- évaporation de la solution obtenue afin de réaliser un étalement uniforme des lipides sur la paroi interne d'un tub d'essais en verre; l'évaporation sera réalisée sous azote, 2 fois en chloroforme et une fois en éther ;
- le tube d'essais avec l'étalement lipidique est mis sous vide (min 5h, pour des raisons pratiques toute la nuit) pour assurer l'évaporation totale du solvant
- ensuite, on rajoute 1ml de solution tampon TRIS (pH 7.2) dans le tub d'essais contenant les lipides; puis on fait chauffer à 50°C (seulement pour le DPPC, $T_m = 41^\circ\text{C}$, afin que le lipide soit en phase fluide) et on fait vortexer la solution 10 min ;
- on continue avec 6 cycles congélation (5 min, azote liquide)/décongélation (10 min bain-marie, température du bain à minimum 45°C quand on utilise le DPPC)
- il faut « vortexer » 1 min après chaque cycle congélation/décongélation

Pour préparer des liposomes LUV

Pour passer de la solution lipidique de MLV (20mg/ml lipide avec 1% fluorescence) en tampon TRIS 15mM, pH 7.2 à une solution LUV (même composition chimique) on applique **l'extrusion**, on utilisant le mini-extruder Avanti Polars Lipids* (réf. ava-610000-1Ea) (Fig. 119A)

* http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=185&Itemid=193

Pour l'extrusion de la solution MLV :

- 1ml de solution 20mg/ml de MLV en tampon TRIS 15mM, pH 7.2 est extrudé en utilisant 2 types de membranes (400nm et 200nm, polycarbonate)
- l'extrusion est réalisée en passant la solution 19 fois d'une cotée à l'autre de la membrane à l'aide des seringues d'extruder
- pour limiter les pertes pendant l'extrusion, la membrane doit être humide et pour cela on fait quelques fois l'extrusion avec un volume de solution TRIS 15mM avant de procéder à l'extrusion de la solution MLV.

Au final on obtient des liposomes LUV. Pour éviter l'oxydation de la solution des liposomes LUV celle-ci est conservée sous azote et à l'abri de lumière (papier aluminium).

Quelques observations expérimentales :

- Lavage de seringues d'extruder : selon les biologistes (3 fois en chloroforme, 3 fois en éthanol, ensuite séchage) ; sur le site d'Avanti Polar Lipids il est précisé qu'il ne faut jamais utiliser pour le lavage des seringues autre que isopropanol, eau pure ou détergent*
- Il ne faut pas oublier au moment de montage de l'extruder de mouiller la membrane (cela évite qu'elle se casse ainsi que les pertes de la solution après l'extrusion)
- Selon le site d'Avanti Polar Lipids les stocks de lipides varient en termes de stabilité en fonction de type de lipide: 3 mois pour ceux poly insaturés, 6 mois les mono insaturés et 12-24 mois celles saturés (à stocker toujours à -20°C !).
- De plus, pendant la manipulation des lipides il ne faut jamais utiliser des pipettes en plastic, du Parafilm^R ou des tubes Eppendorf. Pour ce qui est les solutions aqueuses de lipides, celles-ci ne doivent en aucun cas être stockées pour des longues périodes de temps vu que leur stockage en milieu aqueux accélère l'hydrolyse de l'échantillon.
- Pour l'extrusion[†], il faut faire très attention au montage/positionnement de l'extruder sur le block thermique (Fig. 119B)

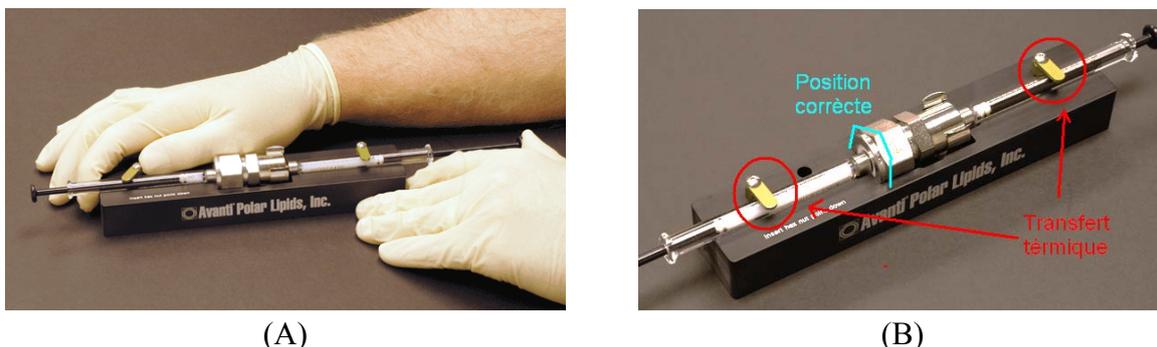


Figure 119. (A) Mini-extruder et son positionnement correct (B) sur le block chauffant

* http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=534&Itemid=298

† http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=533&Itemid=297

12. Méthodes générales d'obtention des interfaces phospholipidiques

Co-adsorption de micelles mixtes

La méthode co-adsorption de micelles mixtes « lipide-détergent » a été développée par Grant et Tiberg, [76] Cette méthode donne des résultats robustes et est moins coûteuse en lipides, de plus elle ne nécessite pas de dispositifs spéciaux. Le principe consiste à adsorber à partir d'une solution concentrée de lipide et de détergent puis une succession de rinçage et de réadsorption à partir de solution moins concentrée en mélange lipide/surfactant ainsi une bicouche dense et compacte pourra être produite sur la surface.

Cette technique utilise un détergent non ionique, fortement soluble dans l'eau, (d'où son élimination facile avec le rinçage) le DDM (n-Dodecyl- β -maltoside, fig. 120), ($cmc = 1.67 \cdot 10^{-4}$ mol/l) pour dissoudre les lipides et former des micelles [30].

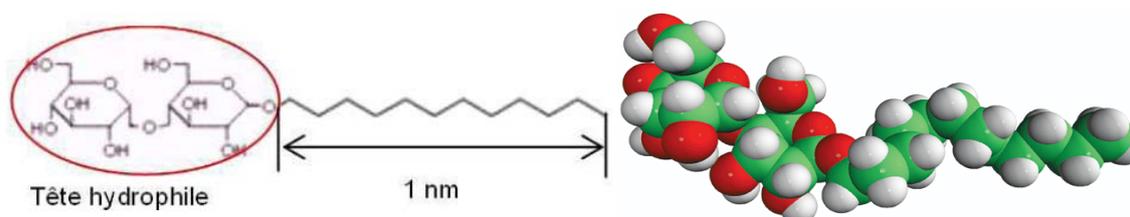


Figure 120. Structure chimique d'une molécule de n-Dodecyl-beta-D-maltoside (DDM)

Le DOPC a été solubilisé à une concentration de 1mM dans un mélange de chloroforme/éthanol (9/1, v/v). Le NBD-PC a été rajouté à cette solution à 1% (mol%) afin de pouvoir vérifier par la suite la qualité et l'homogénéité du dépôt à grande échelle par microscopie de fluorescence. Un aliquote de la solution lipidique est placé dans un tube à essai, puis soumis à un débit d'azote avec une rotation continue; le solvant est ainsi évaporé, (Fig. 121). Nous obtenons un dépôt uniforme de lipides sur la paroi interne du tube. Des micelles lipide/détergent en rapport massique 1/6 sont obtenues en rajoutant, dans le tube à essai contenant l'étalement lipidique, de l'eau ultra pure et une solution aqueuse DDM (0.485mg/ml) pour former à la fin une solution de mélange DOPC/DDM à une concentration finale de 0.114 mg/ml. Nous agitions doucement pour éviter la formation de mousse du détergent. Toute l'opération est effectuée sous courant d'azote pour éviter l'oxydation des lipides. La solution obtenue est limpide. Elle peut être conservée 3 semaines au réfrigérateur.

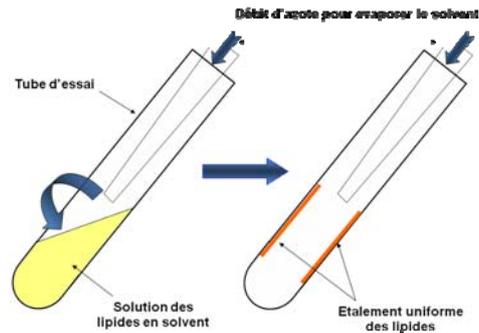


Figure 1211. Technique de préparation de micelles : étalement sur les parois du tube à essai par évaporation du solvant avec un courant d'azote.

Préparation de bicouches dans l'eau : la technique de dépôt **comporte trois étapes essentielles:**

1- Incubation de la solution de micelles /DDM 0.114mg/ml sur le verre pendant 5 minutes en présence d'ions Ca^{2+} (CaCl_2) à une concentration de 2mM. Les travaux de Hills [37] montrent que ces ions Ca^{2+} sont présents également dans les bicouches lipidiques *in vivo* où leur rôle serait de rigidifier la bicouche en formant des liaisons ioniques entre les parties négatives (phosphates) des têtes lipidiques. D'autres travaux [73] montrent que la présence des ions, comme Ca^{2+} , peut modifier les propriétés physico-chimiques des bicouches lipidiques: charge électrique superficielle, perméabilité, etc.

2- Rinçage lent avec l'eau ultra pure à un débit de 3ml/min pendant 90minutes afin d'éliminer le détergent et les lipides qui n'ont pas accroché à la surface.

3- Après cette étape de rinçage, le surfactant est toutefois susceptible d'être resté dans la bicouche à l'état de traces. Ainsi, pour éliminer toute trace de surfactant et avoir un dépôt lipidique plus compact, une **deuxième incubation** est parfois nécessaire : ainsi après la première incubation, nous rajoutons une solution de micelles dix fois moins concentrée (0.0114mg/ml), toujours en présence du calcium 2mM. L'incubation dure 5 minutes puis nous effectuons un rinçage lent goutte à goutte pendant 90 minutes comme dans la première étape.

Les bicouches sont conservées à l'état hydraté pour qu'elles ne se transforment pas en monocouches (après déshydratation) ou vésicules (après réhydratation). Elles sont étudiées le jour même (AFM et fluorescence).

Bicouches de DOPC dans le Tris pH 7.2

La préparation des bicouches de DOPC dans le Tris par la méthode de co-adsorption de micelles mixtes est similaire à celle des bicouches dans l'eau, sauf qu'à la fin du rinçage, l'eau est remplacée par le Tris/ HCl (15mM, pH 7.2).

Fusion des vésicules

Les vésicules unilamellaires (LUV) ont été préparées par la méthode d'extrusion des vésicules [68]. Nous préparons une solution de 20 mg/ml de lipide dans un mélange de chloroforme et d'éthanol (9:1, v/v). Nous rajoutons 1% (wt%) de lipides fluorescents (NBD-PC) à cette solution afin de pouvoir vérifier par la suite la qualité et l'homogénéité du dépôt à grande échelle. La solution est placée dans un ballon conique. Le solvant est évaporé avec rotation continue sous flux d'azote. Les lipides se déposent alors sur les parois du ballon. Nous rinçons deux fois au chloroforme et un troisième à l'éther en évaporant à chaque fois, et ce pour avoir un dépôt uniforme circulaire sur les parois du ballon.

Les lipides sont maintenues toute la nuit sous vide afin d'éliminer toute trace de solvant organique. Les lipides sont alors hydratés avec une solution tampon de Tris, HCl 15mM, pH 7.2, puis vortexés. Nous obtenons ainsi des MLV (*multilamellar large vesicles*) à une concentration de 20mg/ml.

Préparation de vésicules unilamellaires

Pour obtenir des vésicules unilamellaires (LUV), les MLV sont transférées dans des tubes Eppendorf, vortexées pendant 10 minutes, soumises à une congélation pendant 5 minutes dans un récipient contenant de l'azote liquide puis décongelées en chauffant pendant 10 minutes à 37°C dans un bain marie. Toute la procédure est répétée six fois, et entre chaque cycle, les LUV sont vortexées pendant une minute afin d'enlever une couche à chaque fois jusqu'à ce que l'on obtienne une seule couche lipidique.

Les vésicules sont alors extrudées avec un miniextruder (Avanti Polar Lipids). Les échantillons sont soumis à 19 passages successifs (à l'aide de deux seringues) à travers des membranes en polycarbonates (Avanti Polar Lipids) de 0.4 et 0.2 μm de diamètre respectivement afin d'obtenir des LUV les plus monodisperses possible. Les vésicules unilamellaires (LUV) résultantes sont dix fois diluées dans le tampon Tris/ HCl 15mM, pH7.2 et conservées sous azote à 4°C.

Préparation de bicouches (éclatement des vésicules)

Le dépôt des vésicules a été réalisé sur deux types de surfaces solides; le verre et le mica selon la procédure suivante : Les surfaces sont incubées pendant 1h avec la solution de LUV 10 fois diluée, c'est-à-dire 0.2mg/ml, à laquelle 2mM de Ca^{2+} (CaCl_2) sont ajoutés pour stimuler l'éclatement et la fusion des vésicules sur la surface. Le surplus de lipides est éliminé par rinçage en remplaçant le surnageant par la solution tampon Tris 15mM, pH 7.2. Les bicouches sont conservées à l'état hydraté dans le Tris, à pH7.2 et utilisées le jour même du dépôt.

Après dépôt, nous vérifions de manière systématique l'homogénéité des bicouches supportées par microscopie de fluorescence.

13. Principes de la chromatographie

Le nom de chromatographie dérive du mot grec *khrôma* qui signifie *couleur*, parce que le premier scientifique à utiliser cette technique, le botaniste russe Tswett, sépara en 1903 les pigments colorés d'une plante verte en filtrant un extrait de celle-ci sur une colonne de verre remplie de craie (CaCO_3) finement pulvérisée. Ce fut la première application de la chromatographie d'adsorption sur colonne.

Tandis que l'on perfectionnait la méthode primitive de chromatographie d'adsorption, d'autres chercheurs s'appliquaient à découvrir de nouveaux procédés chromatographiques basés sur des principes physiques différents. L'avènement des méthodes modernes de détection a également contribué à l'éclosion de plusieurs modes de chromatographie différents. Actuellement, certains types de chromatographe permettent la détection de quantités aussi infimes que des parties par billion (ppb) de composés. La découverte des principaux modes de chromatographie apparaît dans la liste suivante par ordre chronologique :

- la *chromatographie sur couche mince* (CCM) (1938). (*TLC : Thin Layer Chromatography*)
- la *chromatographie sur papier* (1944).
- la *chromatographie en phase gazeuse* (CPG) (1952). (*GC : Gas Chromatography*)
- la *chromatographie sur gel* (1959).
- la *chromatographie liquide à haute pression* (CLHP) (1967). (*HPLC : High Pressure Liquid Chromatography*)

DÉFINITION

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange, dans le but d'identifier ou de doser certains constituants du mélange.

Quel que soit le genre de chromatographie effectué, la séparation des composés d'un mélange est basée sur la distribution différente de ces composés entre une phase stationnaire et une phase mobile. Les composés seront séparés uniquement si certains d'entre eux sont plus fortement retenus par la phase stationnaire, pendant que les autres se déplacent plus rapidement au sein de la phase mobile.

MODES DE CHROMATOGRAPHIE

Dépendant du système chromatographique utilisé, on distingue trois modes de chromatographie : sur papier, sur couche mince, sur colonne (qui à cause de l'appareillage spécialisé, se subdivise en quatre catégories, soit la chromatographie dite traditionnelle sur colonne, la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et la chromatographie sur gel).

Chromatographie sur couche mince

Bien que découverte en 1938, ce n'est qu'en 1958 que fut popularisée la chromatographie sur couche mince, telle que nous la connaissons actuellement. Cette technique a rapidement supplanté la chromatographie sur papier, car elle est plus rapide et est utilisée autant pour les composés polaires que non polaires.

Les principales étapes d'une chromatographie sur couche mince sont (Fig. 122):

- Préparation de la plaque (activation par chauffage à l'étuve)
- Déposition des échantillons inconnus et des standards
- Préparation de l'éluant et de la cuve
- Éluion de la plaque
- Séchage de la plaque
- Révélation des taches (lampe U.V., iode ou réactifs chimiques spécifiques)

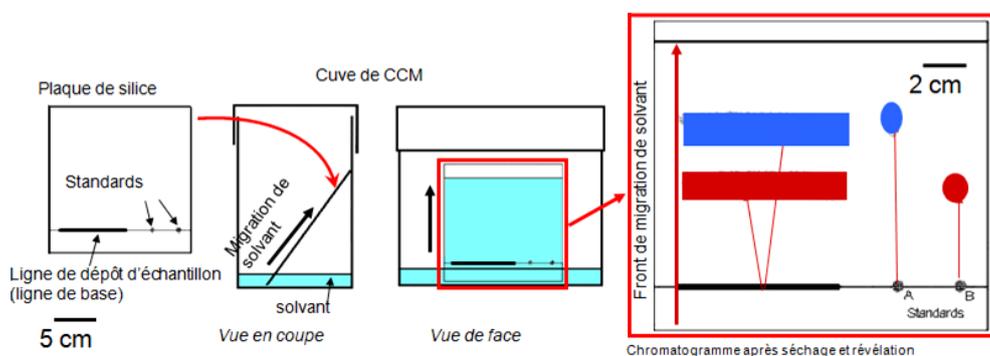


Figure 122. Principe de la chromatographie sur couche mince

Chromatographie sur colonne

Alors que la chromatographie sur couche mince sert essentiellement à l'analyse qualitative, la chromatographie sur colonne est utilisée non seulement pour identifier les composantes de mélanges inconnus, mais également pour les doser, c'est-à-dire pour l'analyse quantitative.

Les genres de chromatographie sur colonne sont variés et dépendent de l'appareillage utilisé. Les deux principaux sont :

- la chromatographie en phase gazeuse (GC)
- la chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est rapidement devenue l'une des meilleures méthodes analytiques dans le domaine scientifique, autant en recherche que dans le domaine industriel (industrie pharmaceutique, agriculture, environnement, etc.) Cette technique fut découverte en 1952 par James et Martin et a fait des progrès vertigineux, particulièrement grâce à la découverte des détecteurs ultrasensibles. Le seuil de détection de la chromatographie en phase gazeuse, de l'ordre des parties par billions, n'a pas encore été égalé. C'est également le seul type de chromatographie qui utilise un gaz comme phase mobile, ce qui nécessite un appareil spécial, appelé communément le chromatographe à gaz.

Dépendant de la phase stationnaire, il est possible d'exploiter les phénomènes d'adsorption ou de partition en chromatographie en phase gazeuse.

Principe de la GC : Le mélange de composés est introduit à l'aide d'une seringue de façon à ce qu'il entre dans la colonne sous forme vapeur. La phase mobile est un gaz chimiquement inerte, appelé gaz vecteur. Celui-ci entraîne avec lui le mélange de composés à travers la colonne qui contient une phase stationnaire. Les composés du mélange traversent la colonne à des vitesses différentes. Lorsqu'ils arrivent à la sortie de la colonne, ils sont détectés par un détecteur qui transmet un signal électrique à un enregistreur. Les résultats apparaissent sur le chromatogramme sous forme de pics. Quel que soit le chromatographe à gaz, on retrouve toujours les principales composantes indiquées dans la figure 123.

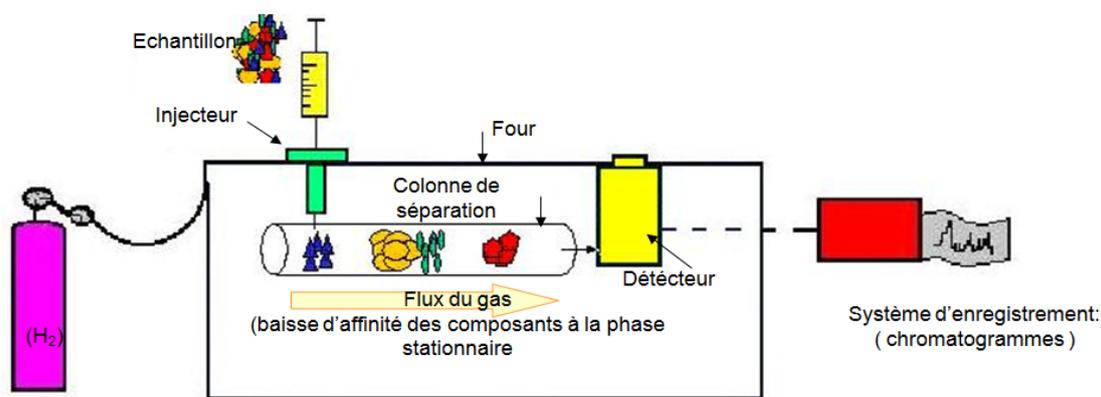
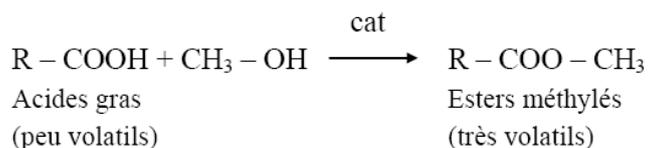


Figure 123. Principe de la chromatographie en phase gazeuse

Quant aux substances à très faible volatilité, on utilise la technique de formation de dérivés, qui consiste à transformer le composé en un dérivé chimique dont la volatilité est plus grande. Pour le cas des phospholipides, la transformation des acides gras composants leurs « queues » en leurs esters méthylés en est un exemple classique :



Ainsi, la GC est appliqué sur des dérivés méthylés des acides gras* qui forment les chaînes acyle des PLs. Sur le chromatogramme les acides gras sortent d'autant plus lentement :

- qu'ils sont longs ;
- qu'ils ont de doubles liaisons (voir schéma dans la fig. 124)

* Les esters méthyliques d'AG sont obtenus par méthylation à l'aide du méthanol ; ils ont un point de fusion plus petit que les AG donc seront plus volatils.

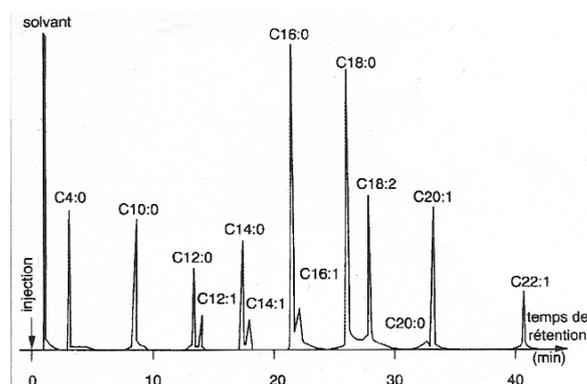


Figure 124. Exemple type de chromatogramme d'AG de PLs obtenue par chromatographie en phase gazeuse

Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

Mise au point vers 1967 par Huker et Hulsman, la chromatographie liquide à haute pression a rapidement fait une concurrence presque déloyale à la chromatographie en phase gazeuse. En effet, alors que la chromatographie en phase gazeuse ne s'applique qu'aux composés volatils, la chromatographie liquide à haute pression n'est pas limitée par cette contrainte et peut séparer pratiquement tous les mélanges, peu importe la volatilité des composés.

Comme pour la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide à haute pression s'effectue avec un appareil commercial, dont les principales composantes sont vendues en modules séparés (Fig. 125).

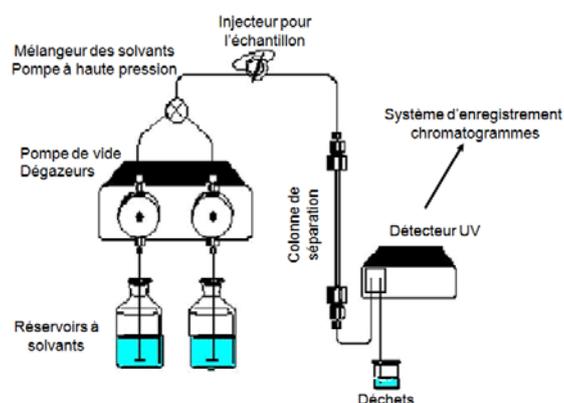


Figure 125. Principe de la chromatographie liquide à haute pression

L'appareil se compose principalement de :

- une pompe haute pression qui assure la propulsion de la phase liquide dans le système.
- un dispositif d'injection permettant d'injecter un faible volume (10-20 μL)
- une colonne renfermant la phase stationnaire (solide poreux sur lequel sont greffées les molécules actives qui dépendent du procédé choisi).
- un détecteur qui analyse en continu le flux sortant de la colonne (spectrophotomètre le plus souvent).
- un dispositif d'enregistrement et de traitement des données (enregistreur, intégrateur, ordinateur)

- un collecteur de fractions qui peut permettre, au besoin, de recueillir séparément les substances.

Cette technique se caractérise par l'utilisation de très petites quantités d'échantillon, l'utilisation de détecteurs extrêmement sensibles, des analyses rapides et une résolution élevée.

Le dispositif d'analyse et de traitement des données permet d'identifier et de quantifier les différentes substances séparées. Dans des conditions correctes (pics fins en particulier) (Fig. 126), la concentration des substances est proportionnelle à la surface des pics obtenus.

Une substance peut être caractérisée par son temps de rétention t_r qui est le délai entre l'injection et le maximum du pic considéré.

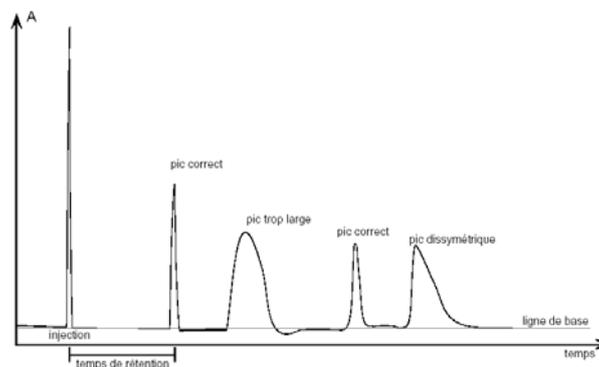


Figure 126. Exemple d'enregistrement obtenu pour une HPLC

La surface du pic est proportionnelle à la quantité de substance séparée. L'aire des pics peut être déterminée manuellement, mais actuellement tous les chromatographe pour HPLC sont dotés d'un intégrateur électronique qui réalise cette détermination de façon plus ou moins automatique.

Cette technique d'analyse est actuellement très utilisée car elle s'adapte à un très grand nombre de domaines du laboratoire : analyse alimentaire, recherche de toxiques, contrôles de pureté, etc.

14. Protocoles d'analyse lipidomique

A. Quantification de différentes classes de phospholipides (PLs) & de la composition en acides gras (AG) de leurs chaînes acyle.

Etapas :

- **Extraction/séparation des classes de phospholipides (2 CCM successives) : PC, PE, PI, PS, Sph, Ag-OH, diOH**
- **Analyse des espèces moléculaires (GC, HPLC)**

Séparation des composants par CCM (chromatographie sur couche mince), qui utilise la migration différentielle des composants à l'aide de: la **phase stationnaire** (gel de silice) : établit des liaisons +/- fortes avec les molécules à séparer et la **phase mobile (éluant)** : migre par capillarité et sépare les molécules liées à la phase stationnaire. On a donc la plaque de silice sur laquelle on fait le dépôt d'échantillon et les standards (substances pures des produits supposés exister dans l'échantillon).

La plaque est ensuite mise dans une cuve de CCM contenant l'éluant qui migre sur la plaque. Ainsi, après le séchage et la révélation sur la plaque on peut distinguer la migration des composants constituant l'échantillon initial, par rapport à la position des standards, sachant que **les composants séparés migrent à différentes vitesses; plus une molécule est soluble dans l'éluant plus elle est entraînée rapidement et migrera en haut de la plaque.**

Matériels

1. appareils

- a. centrifugeuse
- b. système d'évaporation sous azote
- c. Système de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC Hewlett Packard Séries 6890, colonne capillaire silice HP-5MS 30m x 0.25mm, gaz vecteur – hélium 0.5bar ; MS quadripolaire Hewlett Packard Séries 5973, gaz réactant – méthane, système informatique pour pilotage acquisition et traitement de données)
- d. réactifs
 - plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) – silica gel 60 (Merck, 200x200x0.25 mm)
 - boron trifluoride-methanol solution 14% in methanol (BF3, B1252 – 100ml, Sigma)
 - n-dodecyl β -D-maltoside (DDM, D5172-250mg, Sigma)
 - standard PE (Sigma)
 - standards internes PC (850360C – 200mg, Avanti Polar Lipids), PE (P8664 – 100mg, Sigma), PS (840028C – 10mg, Avanti Polar Lipids)
 - deferoxamine (D9533-1g, Sigma)

Extraction lipidique

Les lipides sont extraits à l'aide d'un mélange éthanol/chloroforme (3/6, v/v) contenant du BHT à la concentration finale de $5 \cdot 10^{-5}$ M, en milieu acide (pH = 3) (à l'aide d'acide acétique glaciale). On utilise comme standard interne 100µl PC (10mg/ml) et 50µl PE (1mg/ml) ajoutés dans chaque tube.

Après fermeture sous azote, vortex et centrifugation (5 min, 25°C, 1800tr/min) le mélange se sépare en deux phases. La phase aqueuse est récupérée et transférée dans un autre tube, ensuite évaporée sous jet d'azote ; une deuxième extraction est effectuée et les phases organiques obtenues sont réunies puis évaporées à sec et conservées sous azote à -20°C.

On ajoute à nouveau 3ml éthanol et 6 ml de chloroforme et l'échantillon est de nouveau centrifugé et ensuite le surnageant (la phase supérieure) est récupéré et la phase restante est ré-extraite 2 fois comme décrit précédemment.

Séparation par CCM (en phospholipides totaux, AgOH et diOH)

Les extraits lipidiques (évaporées à sec sous azote) sont repris dans un faible volume (250µl) du mélange méthanol/chloroforme (1/2, v/v) pour être déposées sur une plaque de silice de chromatographie en couche mince (CCM). Les standards de migration sont déposés simultanément à raison de 10µl LTB₄ et 8 µl 9-HODE. La séparation des lipides est effectuée par migration dans le système de solvants n-hexane/diéthyléther/acide acétique glaciale (25:75:1, v/v/v). Après la séparation, et le séchage des plaques, la révélation des standards de migration se fait par vaporisation de phosphomolibdate puis chauffage à 50°C. La zone de silice correspondant au dépôt est située à la même hauteur que le standard de migration plus 1 cm au dessus et au dessous (Fig. 127). Les bandes de silice correspondant aux phospholipides totaux et aux AgOH et diOH sont grattées et récupérées dans des tubes en verre à vis. La silice est réhydratée par un mélange de 2 ml méthanol/chloroforme (2/1, v/v) et ensuite 2 fois avec 2 ml chloroforme, pour les phospholipides totaux et 2 fois avec 3 ml méthanol pour les AgOH et diOH afin d'extraire ces composants de la silice. Les échantillons sont ensuite centrifugés (5min, 25°C, 1800tr/min). La phase supérieure est récupérée pour préparer la séparation CCM des phospholipides totaux et de l'autre coté pour préparer les échantillons pour HPLC (identification des marqueurs de l'oxydation des lipides). Les phases d'intérêt sont rassemblées et évaporées à sec sous azote.

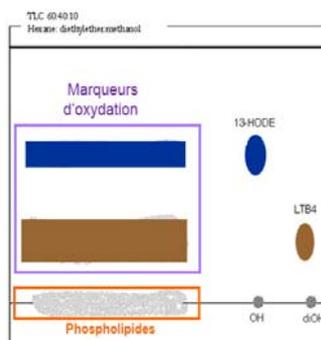


Figure 127. Schéma de la séparation CCM des phospholipides totaux et des acides gras mono- et di-hydroxylés contenu dans le FS

Séparation par CCM des phospholipides totaux

Les extraits de phospholipides totaux (évaporés à sec sous azote) sont reprises dans un faible volume (400 μ l) du mélange méthanol/chloroforme (1/2, v/v) pour être déposées sur une plaque de silice de chromatographie en couche mince (CCM). Les standards de migration sont déposés simultanément à raison de 30 μ l PE (1mg/ml) et 3 μ l PC (10mg/ml), 10 μ l PS (1mg/ml).

Pour la séparation des lipides on a utilisé deux protocoles (Fig. 128 A et B) :

1. le système de solvants chloroforme/méthanol/méthyle amine aqueuse 40% (61:19:5, v/v/v). Après la séparation, et séchage des plaques, la révélation des standards de migration se fait par vaporisation de dichlorofluoresceine, puis repos 5 min et puis visualisation en UV.
2. la plaque de CCM est imprégnée d'une solution d'acide borique à 0.8%, préparée dans un mélange eau/Et-OH (1 :1,v/v) ; après séchage 15 min, la plaque est « activée » à 100°C pendant 1h. Pour la séparation CCM des phospholipides on utilise un mélange de chloroforme/méthanol/eau/ammoniac 28% (60:37.5:4:1, v/v/v/v). La révélation des standards de migration se fait par vaporisation de dichlorofluoresceine, 0.03% puis repos 5 min et visualisation avec lampe UV.

La zone de silice correspondant au dépôt est située à la même hauteur que le standard de migration plus 1 cm au dessus et au dessous. Les bandes de silice correspondant aux phospholipides d'intérêt sont grattées et récupérées dans des tubes en verre à vis.

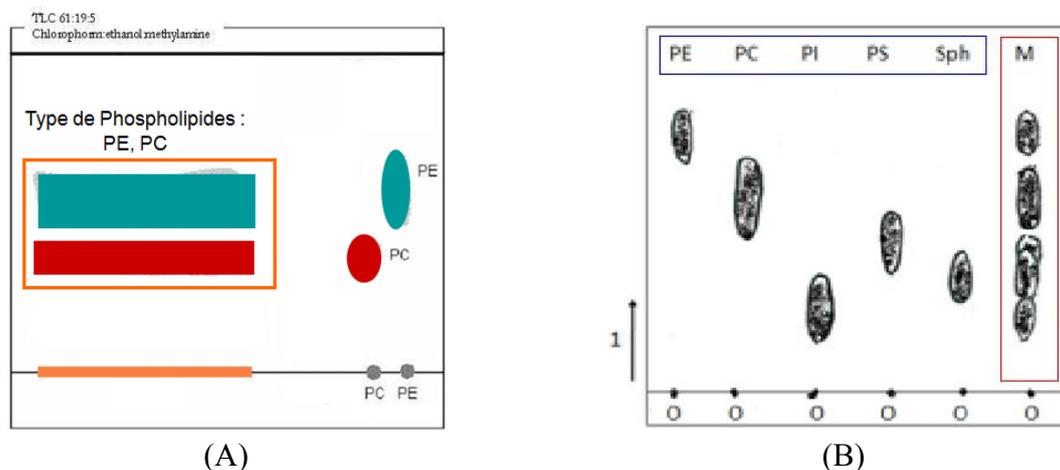


Figure 128. Séparation des classes de PLT contenus dans les échantillons de FS avec de protocoles de séparation CCM différentes (PE, PC, PI, PS, Sph = standards internes ; M : mélange analysé)

Trans-méthylation et quantification des AG par GC

Les acides gras des queues des PLs séparés par CCM sont transméthylés en présence de 750 μ l mélange toluène:méthanol (2/3, v/v), 750 μ l BF₃ 14%, après fermeture des tubes d'essais sous azote, à 100°C dans une cuve thermostatique pendant 90 min. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans de la glace et en ajoutant à la solution 1.5 ml de carbonate de

potassium (K_2CO_3) 10% afin de neutraliser le milieu. Les esters méthyliques d'acides gras ainsi obtenus sont extraits par 2 ml isooctane pestipure ensuite on referme les tubes sous azote. On applique une centrifugation (5min, 1800tr/min) et on obtient une séparation triphasique : la phase organique supérieure et récupérée dans des tubes en verre puis on fait une évaporation à sec du solvant sous jet d'azote.

Les extraits ainsi obtenus sont repris dans un volume d'isooctane puis quantifiés en analyse automatique par chromatographie gazeuse (GC). Les esters méthyliques des acides gras sont volatils et peuvent être séparés par GC : la séparation par GC se fait en fonction de la nature des chaînes hydrocarbonées qui forment les **acides gras** des « queues » des **phospholipides**.

Le lendemain on récupère le fichier informatique avec les résultats et à l'aide des tableaux de calculs (<http://www.cyberlipid.org/fattyt/fatt0003.htm>) on fait le calcul et on détermine la composition en acide gras des phospholipides analysés.

B. Séparation et quantification des classes de phospholipides en fonction de type de « tête » par une CCM 2D*

I-1- Extraction du matériel lipidique

Tous les solvants utilisés dans la partie « analyse biochimique » sont de qualité analytique et proviennent de chez SDS (Peypin, France) ou de chez Carlo Erba (Milan, Italie).

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

Les échantillons sont broyés dans 40 ml chloroforme/éthanol (2:1, v/v) avec un broyeur type Polytron équipé d'un barreau Inox (modèle PT OD 10). Le barreau est rincé entre chaque opération par 10 ml de chloroforme/méthanol (2:1, v/v), ajoutés ensuite au broyat précédent.

Après on met les échantillons à 4°C pendant 24h pour assurer une bonne extraction du matériel lipidique ; les échantillons sont ensuite filtrés sur papier filtre sans cendre avec rinçage du culot par 10 ml de chloroforme/méthanol (2:1, v/v).

I-2 - Purification de l'extrait lipidique:

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

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

- une phase inférieure, chloroformique, contenant les lipides ;
- une phase supérieure contenant l'eau, le méthanol et les contaminants hydrosolubles. Cette dernière est éliminée par aspiration à la trompe à vide.

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

I-3- Détermination du poids de lipides totaux:

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

* Bodennec J *et al*, A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges, *Journal of lipid research*, 41, 2000, 1524-1531.

† Folch *et al.*, *J Biol Chem* 1957, 226, 497

trompe laminaire). Une deuxième évaporation avec 10 ml d'éthanol absolu permet l'élimination de l'eau résiduelle par formation d'un azéotrope éthanol-eau.

La déshydratation est achevée à température ambiante sous vide plus poussé (produit par une cloche à vide !). La quantité totale des lipides purifiés est finalement déterminée par pesée, après équilibrage thermique.

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

II- Chromatographie couche mince en deux dimensions (CCM 2D) :

Les plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) en gel de silice G60 sans indicateur de fluorescence proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Les différents PLs sont séparés par CCM 2D* (Fig. 129):

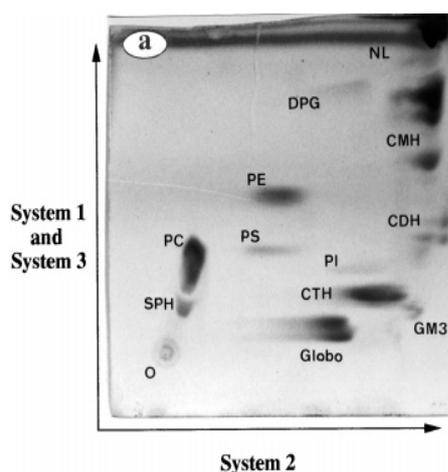


Figure 129. Plaquette de CCM 2D permettant la séparation de diverses classes de lipides dans l'échantillon analysé [Bodennec et al, 2000]

Pour cela, un aliquote de lipides totaux, correspondant à 15 μ g de phosphore lipidique (P_{lip}) est déposé sur une plaquette de CCM en gel de silice dans le coin inférieur gauche de la plaquette à environ 1,5cm du bord (point « O », origine, sur la figure 135). Une première migration est faite dans de l'éther diisopropylique jusqu'à fond de plaquette afin de séparer les lipides neutres (triglycérides, stérols, esters de stérols) des lipides polaires (phospholipides, glycolipides ...). Puis, la plaquette est séchée et une deuxième migration est effectuée perpendiculairement au premier solvant dans un autre système de solvant (tétrahydrofurane/acétone/méthanol/eau 50:20:40:6, v/v/v/v). Après séchage, une troisième migration est réalisée dans du chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50:20:10:15:5, v/v/v/v/v).

* selon Bodennec et al, 2000

Après cette dernière migration, la plaque est séchée et révélée par pulvérisation de réactif de Dittmer et Lester* qui permet de visualiser l'ensemble des phospholipides (Fig. 130).

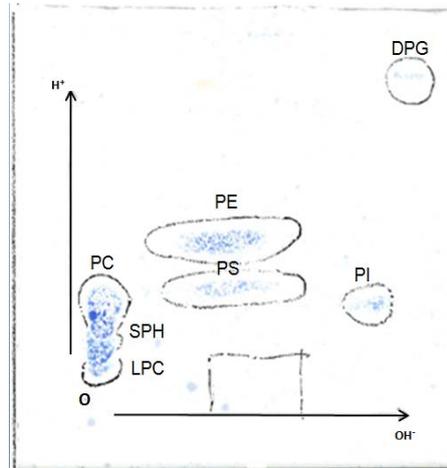


Figure 130. Séparation des classes de PLs par CCM 2D [*CI Matei, PFE 2009*]

III- Dosage du phosphore lipidique total et des différents phospholipides

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

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

Minéralisation :

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

- Acide sulfurique: 2 vol
- Acide Perchlorique: 1 vol
- Tétroxyde de vanadium (catalyseur): 1g/l de mélange

L'opération est effectuée sous hotte, par chauffage pendant environ 20 secondes sur bec Bunsen, jusqu'à l'apparition de fumées blanches abondantes. La même procédure est réalisée pour la gamme étalon contenant 0; 1,5; 3; 6 et 9 μg de phosphore (solution standard de phosphate monopotassique à $6\mu\text{g}$ de P/50 μl).

Dosage du phosphore:

Il est effectué sur les échantillons minéralisés par ajout de 5 ml de réactif ANSA dans chaque tube. Ce réactif est composé de :

- Mélange ANSA : (0,63 g),
- Heptamolybdate d'ammonium : (0,2 g)
- H₂O : 100 ml.

* *Dittmer and Lester, 1964*

Le mélange ANSA est quand à lui obtenu en homogénéisant à l'aide d'un mortier:

- 60 g de métabisulfite de sodium.
- 2 g de sulfite de sodium.
- 1 g d'acide amino naphthol sulfonique.

Sous forme de poudre, il se conserve plusieurs semaines au sec et à l'abri de la lumière. Après addition de la solution et agitation au vortex, la réaction colorée se développe après 8 min de chauffage à 100°C au bain marie. L'intensité de la coloration (bleu de molybdène) est mesurée au spectrophotomètre à 830 nm, soit directement sur les échantillons de lipides totaux, soit après élimination du gel par centrifugation (phospholipides séparés par CCM).

IV- Expression des résultats

Les teneurs en phosphore lipidique (P_{lip}) sont données en μg de P_{lip} pour 100 mg de protéines. Elles serviront pour le calcul des quantités de phospholipides totaux (PLT) en utilisant la relation:

$$\text{PLT} = \text{phosphore lipidique total} * 27$$

Les profils de répartition des phospholipides correspondent aux proportions relatives des divers phosphatides d'un échantillon, en % du phosphore lipidique total déposé. Les valeurs sont obtenues en rapportant les Densités Optiques (DO) individuelles corrigées de chaque phospholipide à la somme des DO totales corrigées. Les DO corrigées (DOc) pour chaque phospholipide sont obtenues selon la formule:

$$\text{DOc} = \text{DO lue} - [\text{DO blanc} * (\text{surface de la tâche} / \text{surface blanc gel})]$$

15. Principe de fonctionnement des AFM

Le principe du microscope à force atomique (AFM) (Fig. 131) est basé sur l'interaction avec une surface d'une pointe sonde, idéalement atomique, fixée à un microlevier flexible de raideur k , ou cantilever. La pointe balaye la surface, et les forces d'interaction, proportionnelles à la déflexion, sont suivies par un système de détection de la déflexion du microlevier. Un asservissement permet d'éloigner ou de rapprocher la surface de la pointe pour contrôler la force exercée par la pointe sur l'échantillon, et donc d'imaginer la topographie de la surface: il est possible de fonctionner avec des forces répulsives (contact) ou attractives (non-contact).

L'échantillon étudié est monté sur un tube piézo-électrique qui permet des déplacements dans les trois directions de l'espace. Lorsque la pointe est approchée de la surface, une force de quelques nanonewtons est exercée sur elle, ce qui entraîne une déflexion du levier. La détection des déflexions du levier est assurée par un système optique grâce aux déplacements d'un faisceau laser. Il est focalisé à l'extrémité du levier sur sa face supérieure puis est réfléchi via un miroir vers un système de détection optique constitué de photodiodes à quatre cadrans. Chaque cadran délivre une tension proportionnelle à sa surface éclairée ; on peut ainsi suivre les mouvements verticaux et horizontaux du faisceau laser associés respectivement aux déflexions et torsions du levier. Ce système permet d'obtenir une résolution verticale inférieure à 1 \AA .

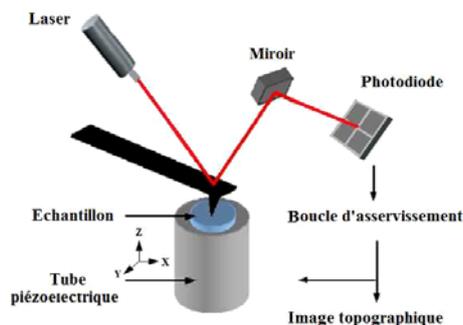


Figure 1312. Dispositif et principe de fonctionnement du microscope à force atomique

Imagerie AFM – le principe

Dans le mode de base d'imagerie à force constante (appelé mode contact), la force appliquée par la pointe sur la surface de l'échantillon est maintenue constante par des déplacements en z de la céramique piézo-électrique. La céramique déplace aussi l'échantillon ou la pointe dans le plan (x,y) . En AFM le signal de mesure est la position du faisceau laser réfléchi par le levier dans une photodiode à quatre quadrants. Toute déflexion verticale du levier se traduit par une variation de l'aire illuminée des quadrants du haut et du bas. La différence d'éclairage entre ces quadrants se traduit par une différence de courant (quelques nA) convertie en tension. Pour faire une image, la pointe balaie la surface à force constante (déflexion constante). Une boucle d'asservissement (boucle de contre-réaction électronique) maintient cette force constante en mode contact en commandant le déplacement en z de

l'échantillon par la céramique piézo-électrique. La mesure de ce déplacement selon z permet de retranscrire la topographie de l'échantillon.

En résumé, on obtient par AFM une image iso-force de la surface, qui permet de remonter à la topographie de la surface.

Courbes force-distance – principe

Ce mode consiste à construire une courbe d'approche-retrait (appelée aussi courbe de force) de la pointe par rapport à la surface. Le principe de la mesure de force AFM consiste à mesurer la déflexion du levier de l'AFM en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique. La boucle d'asservissement qui maintient constante la position du levier est coupée. La pointe ne balaie plus la surface de l'échantillon, elle sonde la surface en un point (x,y) grâce au déplacement en z de la céramique piézo-électrique. Le système d'acquisition du signal peut ainsi tracer les variations du signal en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon (Fig. 132).

Interprétation de la courbe force-distance : En partant d'une position éloignée de l'échantillon (1), la surface est progressivement rapprochée de la pointe. Entre les points 1 et 2, aucune déviation du levier n'est observée, car il n'y a aucune force d'interaction entre la pointe et l'échantillon. Entre les points 2 et 3, le levier commence à fléchir à cause des forces de Van Der Waals. Au point 3, la force attractive est maximale. Au-delà du point 3, la pointe pénètre dans le matériau, les forces répulsives croissent jusqu'au point 4 où elles compensent exactement les forces attractives : le microlevier est au repos comme en (1). Au-delà, l'interaction répulsive domine et le microlevier change de courbure ; la déviation augmente linéairement.

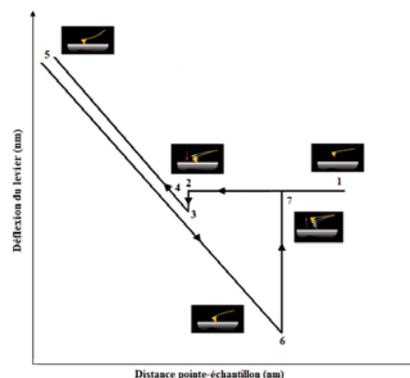


Figure 132. Courbe force-distance.

Lorsque la pointe s'approche de la surface, les forces de Van Der Waals, agissent à longue portée, le levier commence à fléchir (2) ; il se produit une instabilité. En effet, à ce moment, le gradient de la force attractive devient supérieur à la constante de rappel du microlevier et celui-ci est attiré brusquement à la surface de l'échantillon. Les conditions expérimentales vont varier la distance à laquelle intervient cette instabilité (la hauteur de cette déviation est proportionnelle à la force attractive). Le point (3) correspond à la force attractive maximale. Si la pointe continue à pénétrer dans le matériau, le sens de la déviation du levier s'inverse, les forces répulsives croissent jusqu'au point (4) où elles compensent exactement les forces attractives : le microlevier est au repos comme en (1). Au-delà, l'interaction répulsive domine et le microlevier change de courbure ; la déviation augmente linéairement.

A partir du point (5), le mouvement de l'échantillon est inversé ; l'échantillon continue à s'éloigner, et la pointe reste au contact de la surface grâce aux forces d'adhésion (F_{adh}) jusqu'au point (6) où il se produit une seconde instabilité : la force élastique du levier

l'emporte sur la force d'adhésion, ce qui ramène le microlevier au repos. La différence entre les points (6) et (7) donne une mesure des interactions à longue distance et permet, si on connaît la raideur du levier, de calculer la force d'adhésion maximale entre la sonde et la surface.

Les courbes force-distance ont été initialement surtout utilisées pour la mesure des forces d'adhésion puis ont rapidement été détournées pour être utilisées à l'indentation des surfaces grâce à la maîtrise des forces appliquées entre la pointe et la surface.

16. Principe de la Microscopie de Fluorescence

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie de fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Le principe de la microscopie de fluorescence est schématisé sur la figure 133.

La source de lumière de ce microscope est une lampe à vapeur de mercure qui émet une lumière ayant toute les longueurs d'onde du visible. Le diaphragme de champ d'ouverture nous aide à réaliser la mise au point du microscope et à focaliser le faisceau sur la surface d'un objet transparent (par exemple : surface de verre).

Dans les études effectuées, on a utilisé un microscope optique droit (Leica, DMLM) équipé d'une lampe à mercure, d'un objectif de grossissement commercial 20 (Leica PL Fluotar) et d'une caméra C.C.D refroidie (Leica DC 350F). Les observations ont eu lieu à température ambiante. Pour les visualisations on introduit deux filtres et un miroir dichroïque dans le « cube de fluorescence » (entouré sur la fig. 133).

La caméra de fluorescence enregistre les images issues du microscope en transformant les intensités de fluorescence en chaque pixel en nuances de gris : les zones plus claires correspondant à des détails plus fluorescents par rapport aux zones sombres qui ont moins de fluorescence. Il est important pour comparer les images prises avec le même objectif de garder toujours constants les paramètres principaux de la caméra qui sont le temps d'exposition, le gain, le minimum et le maximum de l'échelle enregistrée des niveaux de gris.

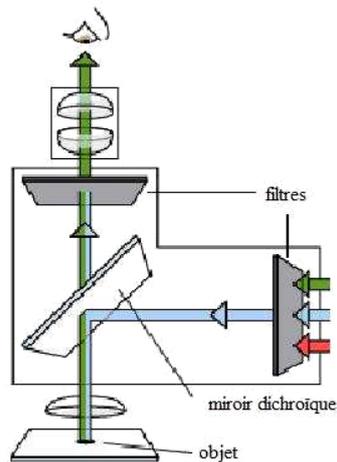


Figure 133. Principe de fonctionnement du microscope de fluorescence.

17. Principe de la technique de FRAPP

Le temps de retour de la fluorescence après photo blanchiment* peut être mesuré dans tout système optiquement transparent. Nous avons optimisé notre montage pour pouvoir effectuer des mesures dans des systèmes à 2D dont la dimension qui correspond au trajet optique est de quelques nanomètres.

On entend par photo blanchiment l'ensemble des processus par lesquels une molécule perd sa faculté d'émettre de la fluorescence à la suite d'une (forte) excitation lumineuse. Lors du processus de fluorescence, la molécule absorbe un photon, passant d'un état électronique fondamental (énergie la plus basse) à un état électronique excité (d'une énergie plus haute que celle de l'état initial d'un quantum $h\nu$). Elle peut alors se désexciter spontanément et retourner à son état fondamental en émettant un autre photon d'une énergie plus faible. Cependant, elle peut suivre d'autres voies de désexcitation, radiatives ou non, dont certaines peuvent conduire vers des états où la molécule quitte le cycle excitation-émission de fluorescence. C'est le processus de photoblanchiment, ou photodestruction (*photobleaching* en anglais). La variété des événements possibles au sein de la structure électronique d'une molécule explique que, de façon générale, on ne connaisse pas les processus conduisant au photoblanchiment. Dans le cas du NBD, le photoblanchiment est irréversible dans l'échelle de temps de nos mesures. Ce phénomène photochimique intervient lorsque les molécules sont soumises à une forte intensité d'éclairage et augmente avec la durée de l'exposition. Le photoblanchiment produit une zone dont la fluorescence est quasiment nulle. C'est cette propriété qui est mise à profit dans la technique de FRAP.

Dispositif expérimental

La technique de FRAP (Fig. 134) est utilisée depuis 1976[†] pour la mesure de la mobilité de molécules fluorescentes à l'échelle microscopique. Sa version basique (FRAP « en spot ») utilise un simple faisceau laser[‡]. Elle consiste à illuminer fortement une région de l'échantillon de façon à photoblanchir les molécules fluorescentes situées dans cette région puis à observer, avec une puissance d'excitation beaucoup plus faible, l'évolution de la fluorescence en fonction du temps. Si les molécules sont mobiles, celles qui sont restées hors de la zone d'exposition vont diffuser dans la zone blanchie et *vice-versa*, ce qui va conduire à un recouvrement de la fluorescence dans la région observée. La cinétique et la forme de la courbe de retour de fluorescence permettent alors de déterminer, avec un modèle théorique adéquat, le coefficient de diffusion des marqueurs dans l'échantillon.

Le système qui a été utilisé est un système de FRAPP en franges (Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching), plus optimisé que les FRAP classiques. Il permet d'utiliser des densités de marqueurs fluorescents beaucoup plus faibles et de quantifier plus facilement

* *Scomparin Carole, Dynamique des bicouches lipidiques supportées, Thèse de doctorat, Université de la méditerranée, décembre 2007, p. 95.*

† *D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Biophysical Journal 1976, 16, 1055-1069.*

‡ *J. Davoust, P.F. Devaux, L. Leger. Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules. The EMBO Journal 1982, 1, 1233-1238.*

les fractions mobiles et immobiles à l'aide d'un système de modulation en fréquence. Grâce à ces franges et à la modulation on détecte un seul mode, ce qui permet d'étudier la dépendance du temps de recouvrement avec le vecteur d'onde (Fig. 135).

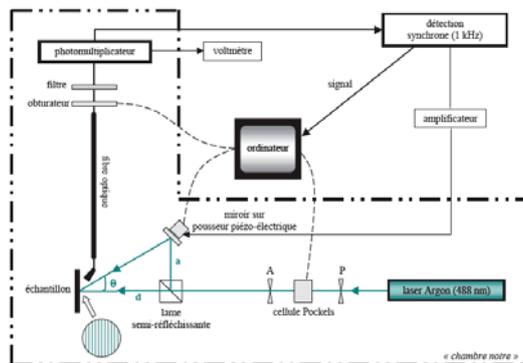


Figure 134. Schéma du dispositif de FRAP

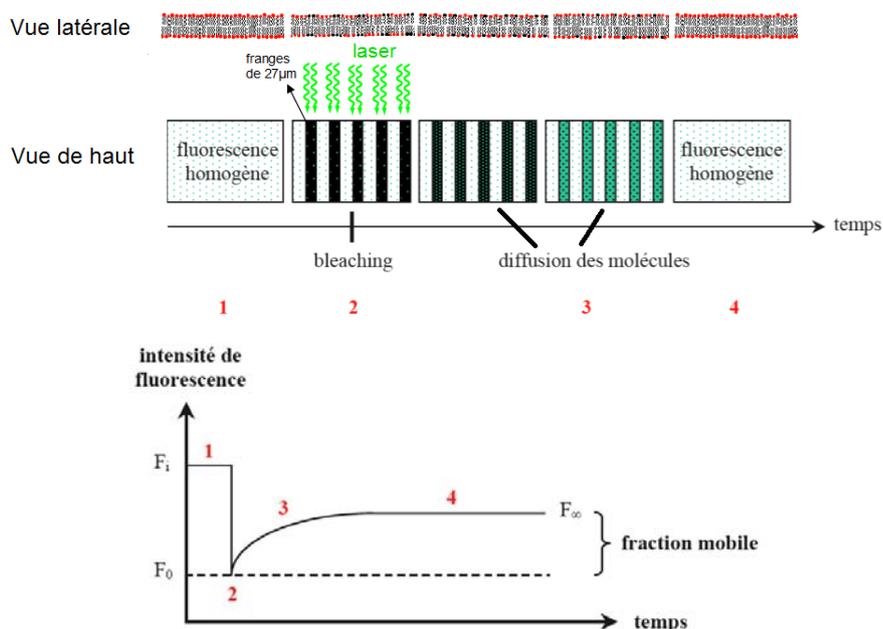


Figure 135. Principe du retour de fluorescence après photoblanchiment et courbe de remontée de fluorescence

Remarques sur les limitations de la technique :

- il faut éviter le photoblanchiment des molécules pendant la mesure qui risquerait de modifier la courbe de retour de fluorescence et de masquer certains phénomènes. Si au cours de la lecture les fluorophores sont dégradés, on obtiendra des temps de diffusion plus courts.
- le temps de photoblanchiment doit être court par rapport au temps caractéristique de diffusion des fluorophores.
- la région photoblanchie doit être petite par rapport à la taille de l'échantillon si l'on veut éviter les « effets de bords ».

Des substrats propres (nettoyage en milieu basique), des phospholipides purs (pas de pollution par des substances dissoutes), des bicouches de bonne qualité (balance de Langmuir-Blodgett) et un montage de FRAPP optimisé constituent un préalable à la réalisation de mesures fiables et reproductibles.

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

1. Aggarwal A., I. P. Sempowski, 'Hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. Systematic review of the literature' *Can. Fam. Physician* 50 (2004): 249-256 ;
2. Bahiri Rachid, Arthrose, cours CHU Rabat-Salé ; <http://www.medramo.ac.ma/fmp/images/docs/cours/arthrose.pdf>
3. Barbucci R et al, Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis, *Biomaterials*, 2002, 23, 4503-4513 ;
4. Berthier, Yves, Systèmes tribologiques, chapitre 1, Dans Matériaux et contacts : une approche tribologique, Paris, G. Zambelli et L Vincent Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 1998, p. 4-12 ;
5. Brannan SR, Jerrard DA, Synovial fluid analysis, *Journal of Emergency Medicine*, 30-3, 2006, 331-339 ;
6. Byars TD, Tyler DE, Whitlock RH, George JW, DeBuysscher EV, 1984: Non-erosive polysynovitis in a horse. *Equine Veterinary Journal* 16, 141-143 ;
7. Campbell J., N. Bellamy, T. Gee, 'Differences between systematic reviews/meta-analyses of hyaluronic acid/hyaluronan/hylan in osteoarthritis of the knee' *Osteoarthritis Cartilage* 15 12 (2007): 1424-1436 ;
8. Carter SD, Barnes A, Gilmore WH, 1999: Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 69,201-214 ;
9. Carter SD, Osborne AC, May SA, Bennett D, 1995: Rheumatoid factor, anti-heat shock protein (65 kDa) antibodies and anti-nuclear antibodies in equine joint diseases. *Equine Veterinary Journal* 27, 288-295 ;
10. Collo MC, Johnson JL, Finch WR, Felicetta JV, 1991: Evaluating arthritic complaints. *Nurse Practitioner* 16, 9-20 ;
11. Coudeyre E, Revel M, Rannou F, Prise en charge péri-chirurgicale dans l'arthroplastie de la hanche et de genou, Conference des exterts Sofmer, Sofcot et Sfr ;
12. Decker B., W. F. McGuckin, B. F. McKenzie, C. H. Slocumb, 'Concentration of hyaluronic acid in synovial fluid' *Clin. Chem.* 5 (1959): 465-469 ;
13. Dunlop D. D., L. M. Manheim, E. H. Yelin, J. Song, R. W. Chang, 'The costs of arthritis' *Arthritis Rheum.* 49 1 (2003): 101-113 ;
14. Forsley RW, Fisher J, Thompson J, Stone MH, Bell C, Ingham E, The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model, *Biomaterials*, 27, 2006, 4581-4590 ;
15. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *Journal of Internal Medicine*, 1997, 242, 27-33;
16. Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A, Lipid metabolism and osteoarthritis : lessons from atherosclerosis, *Progress in lipid research*, 50, 2011, 133-140 ;
17. <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2011/10/16/13869-arthrose-nouvelles-alternatives-chirurgie> ;
18. http://www.orthopedie-cochin.org/fr/affiche_texte.php?id=1 ;
19. Iñigo-Pavlovic Rafael, Monllau Joan C, Current Concepts of the Non-rheumatic Synovial Tissues of the Knee Joint in Different Scenarios, *US Musculoskeletal review, Touch Briefings 2009, Vol. 4, p. 55-57* ;
20. Jin Z, Williams S, Tipper J, Ingham E, Fisher J, Tribology of hip joints from natural hip joints, cartilage substitution, artificial replacements to cartilage tissue engineering, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 1/1, 2006, 69-81 ;
21. Joyce TJ, Wear tests of orthopaedic bopolymers with the biolubricant augmented by a visco-supplement, *Proc IMechE Vol 223, Part J : J. Engineering Tribology, Special Issue Paper*, 2009, 297-302 ;
22. Katta J, Jin Z, Ingham E, Fisher J, Biotribology of articular cartilage – A review of recent advances, *Medical Engineering & Physics*, 30, 2008, 1349-1363 ;
23. Kellgren JH, Osteoarthritis in patients and populations, *British Medical Journal (BMJ)*, 2(5243):1-6 ;

24. Khanna D et al., Natural products as a gold mine for arthritis treatment, *Current opinion in Pharmacology*, 7, 2007, 344-351 ;
25. Kitano T., G. A. Ateshian, V. C. Mow, Y. Kadoya, Y. Yamano, 'Constituents and pH changes in protein rich hyaluronan solution affect the biotribological properties of artificial articular joints' *J. Biomech.* 34 8 (2001): 1031-1037 ;
26. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC et al, Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States, *Arthritis Rheum*, 41, 1998, 778-799 ;
27. Lheureux Elise, L'arsenal pharmacologique dans le traitement de l'arthrose. Focus sur la chondroïtine, thèse en pharmacologie, Université de Lille 2, 2010, 120 p ;
28. LEVY E, FERME A, PERROCHEAU D, BONO I. Les coûts socio-économiques de l'arthrose en France. *Rev Rhum* 1993;60:63S-67S ;
29. Lubeck D. P., 'The costs of musculoskeletal disease: health needs assessment and health economics' *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 17 3 (2003): 529-539 ;
30. Mazzucco D., Scott R., Spector M., 'Composition of joint fluid in patients undergoing total knee replacement and revision arthroplasty: correlation with flow properties' *Biomaterials* 25 18 (2004): 4433-4445 ;
31. Miltner O, Schneider U, Siebert CH, Niedhart C, Nietdhard FU, Efficacy of intraarticular hyaluronic acid in patients with osteoarthritis : a prospective clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10, 680-686 ;
32. Nationale Peiling bewegingsapparaat 2006: Reumatische klachten in Nederland onderzocht. TNO release. 2006 ;
33. Nonaka T et al, Effects of sodium hyaluronic acid on fibrinolytic factors in the synovial fluid (in vivo), *Pathophysiology*, 1999, 6, 41-44 ;
34. Obara T., K. Mabuchi, T. Iso, T. Yamaguchi, 'In-creased friction of animal joints by experimental degeneration and recovery by addition of hyaluronic acid' *Clin. Biomech.* 12 4 (1997): 246-252 ;
35. Qvistgaard E., R. Christensen, S. Torp-Pedersen, H. Bliddal, 'Intra-articular treatment of hip osteoarthritis: a randomized trial of hyaluronic acid, corticosteroid, and isotonic saline' *Osteoarthritis Cartilage* 14 2 (2006): 163-170 ;
36. PEYRON JG. A new approach to the treatment of osteoarthritis: viscosupplementation. *Osteoarthritis Cart* 1993;1:85-7 ;
37. Reginster J.-Y., 'The prevalence and burden of arthritis' *Rheumatology* 41 (2002): 3-6 ;
38. 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. *Current Medicinal Chemistry* 10, 2123–2145 ;
39. Schiller, J.; Fuchs, B.; Arnold, K., 2006: The molecular organization of polymers of cartilage in health and disease. *Current Organic Chemistry* 10, 1771–1789 ;
40. Thanyaluck Phitak, Peraphan Pothacharoen, Prachya Kongtawelert, Comparison of glucose derivatives effects on cartilage degradation, *BMC Musculoskeletal Disorders* 2010, 11:162, online – 26012011 <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/11/162> ;
41. Trunfio Ana Maria, Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physicochimique des assemblages moléculaires du fluide synovial, thèse en biomécanique, INSA de Lyon - LaMCoS, 2006, 155 p ;
42. Trunfio A.-M., Berthier Y., Meurisse M.-H. and J.-P. Rieu, Multiscale analysis of the tribological role of the molecular assemblies of synovial fluid. Case of a healthy joint and implants. *Tribology International.* 40 (2007) 1500-1515 ;
43. Watanabe M, Leng CG, Toriumi H et al, Ultrastructural study of upper surface layer in rat articular cartilage by « in vivo cryotechnique » combined with various treatments, *The Clinical Electron Microscopy Society of Japan*, 2000, vol 33, p. 16-24 ;
44. Wieland H. A.; Michaels M.; Kirschbaum B. J.; Rudolph K. A. Osteoarthritis – an untreatable disease? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2005, 4, 331-343 ;

Partie A

1. Aspden RM, Sscheven BAA, Hutchison JD, Osteoarthritis as a systemic disorder including stromal cell differentiation and lipid metabolism, *The Lancet*, 355, 2001, 1118-1120 ;
2. Athesian GA, Hung CT, The natural synovial joint : properties of cartilage, *Proc IMechE Vol 220 Part J : J Engoneering tribology*, 2006, 657-669 ;
3. ATESHIAN G.A, SOLTZ M.A., Interstitial Fluid Pressurization During Confined Compression Cyclical Loading of Articular Cartilage, *Annals of Biomedical Engineering*, 2000, n° 28, p. 150–159 ;
4. Balazs EA (1974) In: *Disorders of the Knee* (A. J.Helfet) Lippincott Co., Philadelphia, 63-75 ;
5. Balcerzak M et al, The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process, *Acta biochimica polonica*, 50/4, 2003, 1019-1038 ;
6. Bali R, Shukla AK, Rheological Effects of Synovial Fluid on Nutritional Transport, *Tribology Letters* 9(3-4), 233 (2000) ;
7. Ballantine GC, Stachowiak GW, The effect of lipid depletion on osteoarthritic wear, *Wear*, 253, 2002, 385-393 ;
8. Ban RW, Synovial fluid control, US pattent n° 6,654,120 B2, 2003 ;
9. Basalo IM, Raj D, Krishnan R, Chen FH, Hung CT, Ateshian GA, Effects of enzymatic degradation on the frictional response of articular cartilage in stress oxidation, *Journal of biomechanics*, 38, 2005, 1343-1349 ;
10. Bassleer A., Lhoest-Gauthier M.P., Renard A.M., Heinen E., Goessens G. Histological structure and function of synovium. Department of histology, University of Liège, 1981, 15-22 ;
11. Batchelor, A.W. and Stachowiak, G.W. (1996). Arthritis and the interacting mechanisms of synovial joint lubrication. Part II: Joint lubrication and its relation to arthritis. *Journal of Orthopaedic Rheumatology* 9 , 11–21 ;
12. Beertsen W, van den Bos T, Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat, *J Clin Invest* 89, 1992, 1974-80 ;
13. Bereziat G, Diversity of phospholipases A2 and their functions, *CR Seances Soc Biol Fil*, 1996, 190-4, 409-416 ;
14. Berthier Y, Systèmes tribologiques, chapitre 1, Dans *Matériaux et contacts : une approche tribologique*, Paris, G. Zambelli et L Vincent Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 1998, p. 4-12 ;
15. Birken EA, Brookler KH: Surface tension lowering substance of the canine Eustachian tube. *Ann Otol Laryngol* 1972, 81(2):268-271 ;
16. Blewis ME, Lao BJ, Jardin D et al, semi-permeable membrane retention of synovial fluid lubricants hyaluronan and proteoglycan 4 for a biomimetic bioreactor, *Biotechnology and bioengineering*, 106/1, 2010, 149-160 ;
17. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, and Sak RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *European Cells and Materials* 2007;13:26-39 ;
18. Bloebaum RD, Radley KM, Three-dimensional surface analysis of young adult human articular cartilage, *J Anat*, 187, 1995, 293-301 ;
19. Blom BJ, van den Berg WB, The synovium an dits role in osteoarthritis, ch. 4 in *Bone and osteoarthritis*, Bronner F et Farach-Carson MC eds., vol 4, Springer-VerlagLondon, 2007, 65-79 ;
20. Bole GG, Synovial fluid lipids in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis rheum* 1962, 5:589-601 ;
21. Bomalaski JS, Clark MA, Phospholipase A2 and arthritis, *Arthritis Rheum*, 1993, 36/2, 190-198 ;

22. Bomalaski, J.S., and Clark M. In: *Biochemistry, Molecular Biology and Physiology of Phospholipase A2 and Its Regulatory Factors*. (A.B. Mukherjee, ed.) Plenum Press, New York, 1991, p. 231 ;
23. Bosetti M, Lloyd WA, Santin M, Denyer SP, Cannas M, Effects of phosphatidylsérine coatings on titanium on inflammatory cells and cell-induced mineralization in vitro, *Biomaterials*, 26, 2005, 7572-7578 ;
24. Bostan L et al, Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis, *Biophysical Chemistry*, 147, 1–2, 2010, 87–91;
25. Bostan L et al, Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels as articular cartilage substitutes, *Tribology International*, 46, 1, 2012, 215-224;
26. Bostan L, Matériaux polymères avec hydrophilie contrôlée. Applications en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Thèse doctorat, 2011, 189 p;
27. Bostan, M.; Galatiuc, C.; Hirt, M.; Constantin, M. C.; Brasoveanu, L. I.; Iordachescu, D., 2003: Phospholipase A2 modulates respiratory burst developed by neutrophils in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 7, 57–66 ;
28. Brannan SR, Jerrard DA, Synovial fluid analysis, *Journal of Emergency Medicine*, 30-3, 2006, 331-339 ;
29. Brian R. Genge, Licia N.Y. Wu, and Roy E. Wuthier, Separation and quantification of chicken and bovine growth plate cartilage matrix vesicle lipids by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection, *Analytical Biochemistry* 322 (2003) 104–115 ;
30. Briscoe WH, Titmuss S, Tiberg F, Thomas RK, McGillivray DJ, Klein J, Boundary lubrication under water, *Nature*, 444, 2006, 191-194 ;
31. Brown CP, Issues and advances in the early stage diagnosis of osteoarthritis, *International Journal of Nanoscience*, 9-1&2, 2010, 39-45 ;
32. Buckwalter JA, Mankin HJ (1997) Articular cartilage. Part II: degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 79: 612-632 ;
33. Burdick JA, Laberge M, Lickfield G, Biological lubricant composition and method of applying lubricant composition, US Patent n° 7,867,985 B2, 2011 ;
34. Cantagrel Alain, Arnaud Constanti, Membrane synoviale : des conditions physiologiques à l'inflammation de la polyarthrite rhumatoïde. Implications thérapeutiques, Service de Rhumatologie, CHU de Rangueil, Toulouse, www.medecine.ups-tlse.fr;
35. Charnley, J. (1959). The lubrication of animal joints. *Institution of Mechanical Engineers Symposium on Biomechanics* 17, 12–22 ;
36. Chen Y, Burke JR, Hills BA: Semi-permeability imparted by surface-active phospholipid (SAPL) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2002, 22:380-5 ;
37. Chen Y, Hills BA: Surgical adhesions: Evidence for adsorption of surfactant to peritoneal mesothelium. *Aust NZ J Surg* 2000, 70:443-7 ;
38. Chen Yi, Ross W Crawford, Adekunle Oloyede, Unsaturated phosphatidylcholines lining on the surface of cartilage, and its possible physiological roles, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2007, 2:14, doi:10.1186/1749-799X-2-14 ;
39. Chirou V, Mosnegutu V, Munteanu L, Ioan R, On a micromorphic model for the synovial fluid in the human knee, *Mechanics Research Communications*, 37, 2010, 246-255 ;
40. Corneci Magdalena-Carla , Dekkiche Fairouz, Trunfio-Sfarghiu Ana-Maria, Meurisse Marie-Hélène, Berthier Yves, Rieu Jean-Paul, Tribological properties of fluid phase phospholipid bilayers, *Tribology International*, 44, 12, 2011, 1959-1968;

41. Corneci M, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, M.-H. Meurisse, J.-P. Rieu, M. Guichardant, M. Lagarde, Analyse lipidomique de fluides synoviaux pathologiques pour améliorer le comportement tribologique des articulations pathologiques ou prothésées, Journées Francophones de Tribologie, Lyon, 20-22.05.2008
42. Corneci M. et al, Role of ions concentration and pH in the tribological operation of phospholipid biomimetic surfaces, 36th LEEDS-LYON SYMPOSIUM ON TRIBOLOGY, MULTI-FACETS OF TRIBOLOGY, Lyon : France, 2009;
43. Covert R.J., Ott R.D., Ku D.N., Friction characteristics of a potential articular cartilage biomaterial, *Wear*, 2003, vol 255, p. 1064–1068 ;
44. Creamer P. Osteoarthritis. *Lancet*. 1997, 350, 503-509 ; Hunter D. J.; Felson D. T. Osteoarthritis. *Br. Med. J.* 2006, 332, 639-642 ;
45. CRESCENZIA V., TAGLIENTI A., PASQUALI-RONCHETTI I., Supramolecular structures prevailing in aqueous hyaluronic acid and phospholipid vesicles mixtures: an electron microscopy and rheometric study, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2004, vol 245, p. 133–135 ;
46. Crockett R, Boundary lubrication in natural articular joints, *Tribol Lett*, 35, 2009, 77-84 ;
47. Crockett R, Grubelnik A, Roos S, Dora C, Born W, Troxler H, Biochemical composition of the superficial layer of articular cartilage, *Journal of biomedical materials research, Part A*, 2007, 958-964, DOI: 10.1002/jbm.a.31248 ;
48. Crockett R, Roos S, Rossbach P, Dora C, Born W, Troxler H, Imaging of the surface of human and bovine articular cartilage with ESEM and AFM, *Tribology Letters*, 19/4, 2005, 311-317 ;
49. Cummings NA, Nordby GL, Measurements of synovial fluid pH in normal and arthritic knees, *Arthritis Rheumatology*, 9, 1966, 47-56 ;
50. D’Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell CW Jr. Cartilage injury induces chondrocyte apoptosis. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83:S19 ;
51. Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Lindgren, J.A., and Samuelsson, B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3887, 1981 ;
52. Darley-Usman, V.M., Hogg, N., O’Leary, V.J., Wilson, M.I., and Moncada, S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can cause lipid peroxidation in human LDL. *Free Rad. Res. Comm.* 17:9, 1992
53. De Caterina R, Basta G, n-3 fatty acids and the inflammatory response – biological background, *European Heart Journal Supplements*, 2001, 3/supplement D, D42-D49 ;
54. De Seze S, Ryckewaert A, Kahn MF, Bardin T, Meyer O, Orcel P, Lioté F, l’actualité rhumatologique 2009, Elsevier Masson 2009, 482 p. ; Chapitre « Le synoviocyte revisité », H-K Ea, M Cohen-Solal, 319-330 ;
55. Decker B, McGuckin WF, McKenzie BF, Slocumb CH, Concentration of hyaluronic acid in synovial fluid, *Clin. Chem.* 5 (1959): 465-469 ;
56. Dekkiche F., Corneci M.C., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Munteanu B, Berthier Y., Kaabar W., 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, 15 October 2010, Pages 232-239;
57. Delecrin J, Oka M, Takahashi S, Yamamuro T, Nakamura T, 1994. Changes in joint fluid after total arthroplasty, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 307, 240–249 ;
58. DesJardins J., A. Aurora, S. L. Tanner, T. Pace, K. B. Acampora, M. LaBerge, 'Increased total knee arthroplasty ultra-high molecular weight polyethylene wear using a clinically relevant hyaluronic acid simulator lubricant' *Proc. IMechE, Part H: J. Engineering in Medicine* 220 (2006): 609-623 ;
59. Desmarais MHL. Value of intra-articular injections in osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1952;11:277-81 ;

60. Dessen, A, Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A(2), *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids*, 2000, 1488, 159-166 ;
61. Dobbie JW, Hind C, Meijers P, Bodart C, Tasiaux N, Perret J, Anderson JD (1995) Lamellar body secretion: ultrastructural analysis of an unexplored function of synoviocytes. *Br J Rheumatol* 34: 13-23 ;
62. Dobbie JW, Pavlina T, Lloyd J, Johnson RC: Phosphatidylcholine synthesis by peritoneal mesothelium: Its implications for peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1988, 12:31-6 ;
63. Domingues MRM, Reis A, Domingues P, Mass spectroscopy analysis of oxidized lipids, *Chemistry and Physics of lipids*, 156, 2008, 1-12 ;
64. Dowson D, A tribological day, Special issue, Leeds Lyon Symposium 2008, *Proc. IMechE Vol. 223 Part J: J. Engineering Tribology*, 2009, 261-273, doi : 10.1243/13506501JET557 ;
65. Dowson D, Jin ZM, Micro-elastohydrodynamic lubrication of synovial joints, *Eng Med*, 15/2, 1986, 63-65 ;
66. Dowson D, Wright V, Longfield MD, Human joint lubrication, *Biomed Eng*, 4, 1969, 160-165 ;
67. Dowson, D. and Wright, V. 'Bio-tribology'. *Proceedings of the Conference on The rheology of lubrication organised by The Institute of Petroleum, The Institution of Mechanical Engineers and the British Society of Rheology*, 1973, pp. 81-88 ;
68. Dowson D, Yao J.Q., A full solution to the problem of film thickness prediction in natural synovial joints., In *Mechanics of Coatings, Proceedings of 16th Leeds/Lyon Symposium on Tribology, Lyon 1989* , Amsterdam: Elsevier, 1990, p. 91–102 ;
69. Dowson D., Modes of lubrication in human joints, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*, 1967, n° 181, p. 45–54 ;
70. Dowson D., Analysis of boosted lubrication in human joints, *J. Mec. Eng. Sci.* 1970, n° 12, p. 364–369 ;
71. Dumbleton JH. *Tribology of natural and artificial joints*. New York: Elsevier Scientific Publishing Co; 1981 ;
72. Ea H.-K., C. Bazille, F. Lioté. *Histologie et physiologie de la membrane synoviale*. EMC (Elsevier Masson SAS), *Appareil locomoteur*, 14-004-A-10, 2008 ; Doi : 10.1016/S0246-0521(08)41701-1 ;
73. Fam H, Bryant JT and Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 2007;44/1-2:59-74 ;
74. Fernandez Julie, *Les condroprotecteurs dans le traitement de l'arthrose chez le chien. Etude bibliographique, Thèse – Diplôme d'état*, 22008, Université Paul Sabatier Toulouse ;
75. Firestein, G.S. In: *Textbook of Rheumatology*, 5th Edition. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. (W.N. Kelly, E.D. Harris, S. Ruddy and C.P. Sledge, eds.) W.B. Saunders, Philadelphia, 1997, p. 886 ;
76. Forester H, Fisher J, The influence of loading time and lubricant on the friction of articular cartilage, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*, 1996, 210, 109-119 ;
77. Forsey RW, Fisher J, Thompson J, Stone MH, Bell C, Ingham E. The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials* 2006;27:4581–4590 ;
78. Foster, H. and Fisher, J. (1999). The influence of continuous sliding and subsequent surface wear on the friction of articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers ar H 213* , 329–45 ;
79. Fraser JRE, Kimpton WG, Pierscionek BK, Cahill RNP, The kinetics of hyaluronan in normal and acutely inflamed synovial joints : observation with experimental arthritis in sheep, *Arthr Rheum*, 1993, 22 (suppl 1), 9-17 ;
80. Freeman M.E., Furey M.J., Love B.J. et al., Friction, wear, and lubrication of hydrogels as synthetic articular cartilage, *Wear*, 2000, vol 241, p. 129-135 ;

81. Fuchs B, Bondzio A, Wagner U, Schiller J, Phospholipid composition of sera and synovial fluids from dog, human and horse : a comparaisn by 31P-NMP and MALDI-TOF MS, *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 93, 2009, 410-422 ;
82. Fuchs, B.; Schiller, J.; Wagner, U.; Ha^ontzschel, H.; Arnold, K., 2005: The phosphatidylcholine / lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: Investigations by 31P NMR and MALDI-TOF MS. *Clinical Biochemistry* 38, 925–933 ;
83. Gaisinskaya A et al, Hydration lubrication : exploring a new paradigm, *Faraday Discussions*, 2012, doi 10.1039/C2FD00127F ;
84. Gale LR, Hills Ba, Crawford R, Boundary lubrication of joints, *Acta Orthopaedica* 2007; 78 (3) : 309-314 ;
85. Galois L., Freyria A.-M., Herbage D. et al. Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches, *Pathologie Biologie*, 2005, vol 53, p. 590– 598 ;
86. Gilman, S.S., Chang, J., Zigler, P.R., Uhl, J., and Mochran, E. Interleukin-1 activates phospholipase A2 in human synovial cells. *Arthritis Rheum.* 31:126, 1988 ;
87. Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A, Lipid metabolism and osteoarthritis : lessons from atherosclerosis, *Progress in lipid research*, 50, 2011, 133-140 ;
88. Gleghorn J.P., A.R.C. Jones, C.R. Flannery and L.J. Bonassar, Boundary mode frictional properties of engineered cartilaginous tissues, *European Cells and Materials* Vol. 14. 2007 (pages 20-29) ;
89. Gobezie R et al, High abundance synovial fluid proteome : distinct profiles in health and osteoarthritis, *Arthritis Research & Therapy*, 2007, 9 :R36, doi :10.1186/ar2172 ;
90. Goldberg, R., Schroeder, A., Barenholz, Y. and Klein, J., 'Interactions between adsorbed hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) vesicles at physiologically-high pressures and salt concentrations', *Biophysical J.*, 2011, 100, 2403-2411 ;
91. Gonzalez-Buritica H, Khamashta MA, Hughes GRV, Synovial fluid phospholipase A2s and inflammation, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 48, 1989, 267-269 ;
92. Goudoulas TB, Kastrinakis EG, Nychas SG, Papazoglou LG, Kazakos GM, Kosmas PV, Rheological Study of Synovial Fluid Obtained from Dogs: Healthy, Pathological, and Post-Surgery, after Spontaneous Rupture of Cranial Cruciate Ligament, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 38, No. 1, January 2010, 57–65 ;
93. Gurakar-Osborne, A., and Prete, P.E. Rapid assay phospholipase A2 activity in plasma and synovial fluid. *Clin. Chem.* 41:118, 1995 ;
94. Hakshur K, Benhar I, Bar-Ziv Y, Halperin N, Segal D, Eliaz N, The effect of hyaluronan injections into human knees on the number of bone and cartilage wear particles captured by bio-ferrography, *Acta biomaterialia*, 7, 2011, 848-857 ;
95. Hall RM, Bankes MJK, and Blunn G. Biotribology for joint replacement. *Curr Orth* 2001;15:281-290 ;
96. Haubeck HD, Kock R, Fischer DC, van de Leur E, Hoffmeister K, Greiling H (1995) Transforming growth factor β 1, a major stimulator of hyaluronan synthesis in human synovial lining cells. *Arthritis Rheum* 38: 669-677 ;
97. Hayek MG, Lepine AJ, Articular cartilage in health and disease, *Clinical Perspectives on Canine Joint Disease* (The North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, USA, January 17, 2001), 8-18 ;
98. He Y, Chen S, Hower JC, Bernards MT, Jiang S, Molecular simulation studies of nanoscale friction between phosphorylcholine self-assembled monolayer surfaces : correlation between surface hydration and friction, *J Chem Phys*, 127, 2007, 084708 ;
99. Heuberger M. P., M. R. Widmer, E. Zobeley, R. Glockshuber, N. D. Spencer, 'Protein-mediated boundary lubrication in arthroplasty' *Biomaterials* 26 10 (2005): 1165-1173 ;

127. Ionica E, Condac E, Dinischiotu A, Costache M, Johansen B, Preparation of PLA2 type IIA produced by recombinant Baculovirus-infected Sf21 Insect Cells, Roumanian Biotechnological Letters, 9/2, 2004, 1609-1616 ;
128. Jamal, O. S.; Conaghan, P. G.; Cunningham, A. M.; Brooks, P. M.; Munro, V. F.; Scott, K. F., 1998: Increased expression of human type Ila secretory phospholipase A2 antigen in arthritic synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases* 57, 550–558 ;
129. Jay GD, Britt DE, Cha DJ (2000) Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 27: 594-600 ;
130. Jay GD, Harris DA, Cha CJ. Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3) Gal-GalNAcoligosaccharides. *Glyco conjugate Journal* 2001;18:807–15 ;
131. Jay GD. Lubricin and surfacing of articular joints *Current Opinion in Orthopaedics*, 15 (5) (2004), 355–359 ;
132. Jin ZM, Medley JB, Dowson D, Fluid film lubrication in artificial hip joints (4.2.2. Effect of boundary lubricants) in *Tribology Series* 41, Dowson D, Priest M, Dalmaz G, Lubrecht AA eds., Elsevier, 2003, p. 249 ;
133. Jin ZM, Stone M, Ingham E, Fisher J, *Biotribology*, *Current orthopaedics*, 2006, 20, 32-40 ;
134. Jones CF, Stoffel KK, Ozturk HE, Stachowiak GW, The effect of surface-active phospholipids on the lubrication of osteoarthritic sheep knee joints : wear, *Tribology Letters*, 16/4, 2004, 291-296 ;
135. Kandelman D, *La dentisterie préventive*, Presses de l'Université de Montréal, 1989 ;
136. Katta J, Jin Z, Ingham E, Fisher J, *Biotribology of articular cartilage – A review of the recent advances*, *medical Engineering & Physics*, 30, 2008, 1349-1363 ;
137. Katta J, Pawaskar SS, Ingham E, Jin ZM, J Fisher, Effect of load variation on the friction properties of articular cartilage, *Proc IMechE Vol 221 Part J : J Engineering Tribology*, 2007, 175-181 ;
138. Kawai Y, Kubota E, Okabe E, Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibula joints in rats, *J Dent Res*, 2000, 79, 1489-1495 ;
139. Kawano T, Miura H et al, Mechanical effects of the intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipid on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, 48, 2003, 1923-1929 ;
140. Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB, Natural products as a goldmine for arthritis treatment, *Current opinion in pharmacology*, 2007, 7 :344-351 ;
141. Kitano T, Ateshian GA, Mow VC, Kadoya Y, Yamano Y, Constituents and pH changes in protein rich hyaluronan solution affect the biotribological properties of artificial articular joints, *J. Biomech.* 34 8 (2001): 1031-1037 ;
142. Kitano T, Ohashi H, Kadija Y, Kabayashi A, Yutaniand 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 A42*, 1998, 453-457 ;
143. Klein J, et al, *Hydration lubrication : exploring a new paradigm*, *Faraday Discussions*, 2012;
144. Klein J, *Molecular mechanisms of synovial joint lubrication*, *IMechE, JET*, 2006 ;
145. Kramer, R.M., Pepinsky, R.B., 1991, Assay and Purification of Phospholipase A2 from Human Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis, *Methods in Enzymology*, 197: 373-381 ;
146. Kraus V.B., Huebner J.L., Fink C., King J.B., Brown S., Vail T.P., Guilak F. Urea as a passive transport marker for arthritis biomarker studies. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, 420-427 ;
147. Krishnan R, Kopacz M, Ateshian GA, Experimental verification of the role of interstitial fluid pressurization in cartilage lubrication, *Journal of orthopaedic research*, 22, 2004, 565-570 ;
148. Kristen Friedrichs, *Joint fluide analysis* , *Clinical Pathology*, 2010, SAVMA Symposium, Madison, WI ;

149. Lai WM, Kuei SC, and Mow VC. Rheological equations for synovial fluids. *J Biomech Eng* 1998;100:169-186 ;
150. Lajeunesse D, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Osteoarthritis : a metabolic disease induced by local abnormal leptin activity ? *Current Rheumatology Reports* 7/2, 2005, 1-3, DOI: 10.1007/s11926-005-0057-0 ;
151. Landoni M.F., Foot R., Frea S., Lees P. Effects of flunixin, tolfenamic acid, R(-) and S(+) ketoprofen on the response of equine synoviocytes to lipopolysaccharide stimulation. *Equine Vet. J.*, 1996, 28, 468-75 ;
152. Laredo JD et al, *Arthrographie, arthroscanner, arthro-IRM*, Elsevier Masson, Paris 2001, 169p ; chapitre 10 – « Physiologie articulaire », Bizot P, Nizard R, 135 – 146 ;
153. Leslie CC, Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production, *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids*, 2004, 82, 1-17 ;
154. LEVICK J.R., Synovial fluid dynamics: the regulation of volume and pressure, ch. 5. In Edited by Maraudas A et Holborow EJ, *Studies in joint Disease 2*. London : Pitman, 1983, p. 153-240 ;
155. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M, The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage, *Metabolism*, 40/6, 1991, 571-576 ;
156. Luvec, J., Halloran, S.P., White, A.G., and Dormandy, T.L. Free radical oxidation (peroxidation) products in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 8:233, 1981 ;
157. MacConaill MA, The function of inter-articular fibrocartilages, with special references to the knee and inferior radio-ulnar joints, *J Anat*, 66, 1932, 210-227 ;
158. Maheu E, L'acide hyaluronique dans le traitement de la gonarthrose, *Le journal français de l'orthopédie* sur <http://www.maitrise-orthop.com/corpusmaitri/orthopaedic/95/maheu/maheu.shtml>, 18042011 ;
159. Mansour JM, Biomechanics of cartilage, in *Kinesiology : the mechanics and pathomechanics of human movement* (ed CA Oatis), 2003, ch. 5, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia ;
160. Maquet PGJ, *Biomechanics of the knee, with application to the pathogenesis and surgical treatment of osteoarthritis*, Springer-Verlag, 2nd edition, 1984 ;
161. Martin C, Riou B, Vallet B, *Physiologie humaine appliquée, Chapitre 7-Physiologie vasculaire et microcirculatoire*, Ed. Arnette, 2006 ;
162. Mason Burdick JA, Laberge M, Lickfield G, Biological lubricant composition and method of applying lubricant composition, *US Patent n° 7,867,985 B2*, 2011 ;
163. Mavraki A, Cann PM, Friction and lubricant film thickness measurements on simulated synovial fluids, *Proc IMechE ; Part J : J Engineering Tribology*, 2009, 233(J3), 325-335 ;
164. Mavraki A, Cann PM, Mischler S. Friction and lubricant film thickness measurements on simulated synovial fluid. *P I Mech Ing J-J Eng* 2009; 223:606-607 ;
165. Mazzucco D , Scott R, Spector M, Composition of joint fluid in patients undergoing total knee replacement and revision arthroplasty: correlation with flow properties, *Biomaterials*, 2004, 25:4433-4445 ;
166. McCutchen CW, The frictional properties of animal joints, *Wear*, 5, 1962, 1-17 ;
167. Medley JB, Dowson D, Wright V, Transient elastohydrodynamic lubrication model for the human ankle joint, *Eng Med*, 13/3, 1984, 137-151 ;
168. Migliaresi C., Nicodemo L., Nicolais et al, Physical characterisation of microporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1981, vol 15, p. 307-317.
169. Mircheva K, Minkov I, Ivanova Tz, Panaitov I, Proust JE, Verger R, Comparative study of lipolysis by PLA2 of DOPC substrates organized as monolayers, bilayer vesicles and nanocapsules, *Colloid and surfaces B: Biointerfaces*, 67, 2008, 107-114 ;
170. Mirea DA, Trunfio-Sfarghiu A-M, Matei CI, Munteanu B, Piednoir A, Rieu JP, Blanchin MG, Berthier Y. Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of the synovial fluid. *Tribology International (en cours de publication)*;

171. 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 59-68.
172. Momberger TS, Levick JR, Mason RM (2005) Hyaluronan secretion by synoviocytes is mechanosensitive. *Matrix Biol* 24: 510-519
173. Monds MK, Deficiency of lubricating surfactant lining the articular surfaces of replaced hips and knees, *British Journal of Rheumatology*, 1998, 37, 143-147 ;
174. Mow VC, Gu WY, Chen FH, Structure and function of articular cartilage and meniscus, in *Basic orthopaedic biomechanics and mechano-biology*, Mow VC et Huiskes R eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005, 181-258 ;
175. Mow VC, Ratcliffe A, Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures, *Biomaterials*, 1992, 13 (2), 67-97
176. Mow VC, Ratcliffe A, Structure and function of articular cartilage and meniscus, Ch 4 in *Basic orthopaedic biomechanics*, Philadelphia, Lippincott-Raven publishers, 1997, 113-179 ;
177. Murakami M, Sato H, Taketomi Y, Yamamoto K, Integrated Lipidomics in the Secreted Phospholipase A2 Biology, *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 1474-1495; doi:10.3390/ijms12031474 ;
178. Murakami T, Sawae Y, Horimoto M, Noda M, Role of surface layers of natural and artificial cartilage in thin film lubrication ; *Tribology Series*, 36, 1999, 737-747
179. Murakami T. The lubrication in natural synovial joints and joint prostheses *JSME International Journal Series III-Vibration, Control Engineering, Engineering for Industry*, 33 (1990), pp. 465-474
180. Murakami, T. et al. (1998a). Adaptive multimode lubrication in natural synovial joints and artificial joints. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H*, 212, 23-35
181. Neu CP, Komvopoulos K, Reddi AH, The interface of functional biotribology and regenerative medicine in synovial joints, *Tissue Engineering Part B*, 14/3, 2008, 235-247 ;
182. Neville A, Morina A, Liskiewicz T, Yan Y, Synovial joint lubrication – does nature teach more effective engineering lubrication strategies ?, *Proc IMechE Vol 221 Part C : J Mechanical Engineering Science*, 724, 2007, 1223-1230
183. Nitzan DW, Nitzan U, Dan P, Yedgar S, The role of hyaluronic acid in protecting surface-active phospholipids from lysis by exogenous phospholipase A2, *Rheumatology*, 2001, 40 ; 336-340
184. Ogston AG, Stanier JE (1953) The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid: viscous, elastic and lubricant properties. *J Physiol* 119: 244-252 ;
185. Oloyede A, Gudimetla P, Crawford R, Hills BA: Consolidation responses of delipidized articular cartilage. *Clin Biomech* 2004,19(5):534-42
186. Ostalowska A., E. Birkner, M. Wiecha, S. Kasperczyk, A. Kasperczyk, D. Kapolka, A. Zon-Giebel, Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint, *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(2), 2006, 139-145 ;
187. Ozturk HE, Stoffel KK, Jones CF, Stachowiak GW, The effect of surface-active phospholipids on the lubrication of osteoarthritic sheep knee joints : friction, *Tribology Letters*, 16/4, 2004, 283-289;
188. Panaiatov I, Verger R dans Baskin A Norde W (Eds.), *Physical Chemistry of biological interfaces*, Marcel Dekker, New York, Basel, 2000, ch. 12
189. Panula, H. E.; Lohmander, L. S.; Rönkkö, S.; Agren, U.; Helminen, H. J.; Kiviranta, I., 1998: Elevated levels of synovial fluid PLA2, stromelysin (MMP-3) and TIMP in early osteoarthrosis after tibial valgus osteotomy in young beagle dogs. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 69, 152-158 ;

190. Pascovici MD, Cicone T, Squeeze-film of unconformal, compliant and layered contacts, *Tribology International*, 2003, n° 36, p. 791–799.
191. Pascual E, Synovial fluid analysis, *Best practice & Research Clinical Rheumatology*, 19-3, 2005, 371-386 ;
192. Pasquali-Ronchetti I. et al. *Journal of structural biology* 120 (1997); PASQUALI-RONCHETTI I., QUAGLINO D., MORI G., Bacchelli B, Hyaluronan–Phospholipid Interactions, *Journal of structural biology*, 1997, vol 120, p. 1–10;
193. Pawlak Z et al, The ultra low friction of the articular surface is pH-dependent and is built on a hydrophobic underlay including a hypothesis on joint lubrication mechanism, *Tribology International*, 43, 2010, 1719-1725;
194. Pawlak Z, Kotynska J, Figaszewski ZA, Gadomski A, Gudaniec A, Oloyede A, A biochemical model for characterising the surface-active phospholipid bilayer of articular cartilage relative to acid-base equilibrium, *Archives of materials science and engineering*, 29/1, 2008, 24-29
195. Pawlak Z, pai R, Bayraktar E, Kaldonski T, Oloyede A, Lamellar lubrication in vivo and vitro : friction testing of hexagonal boron nitride, *BioSystems*, 94, 2008, 202-208
196. Peress N.S., H.C. Anderson, S.W. Sajdera, *Calcif. Tissue Res.* 14 (1974) 275–281
197. Perrot S, *Rhumatologie Med-Line*, Ed. Estem & Med-Line, Paris, 2002 ;
198. Peyron JG. A new approach to the treatment of osteoarthritis: viscosupplementation. *Osteoarthritis Cart* 1993;1:85-7
199. Petkovic´ M, Müller J, Schiller J, Arnhold J. Application of matrixassisted laser desorption and ionization time-off-flight mass spectrometry for the characterization of the substrate specificity of neutrophil phospholipase A2. *Microchem J* 2005;80:31–7 ;
200. Prete PE, Gurakar-Osborne Arzu, The contribution of synovial fluid lipoproteins to the chronic synovitis of rheumatoid arthritis, *Prostaglandins*, 1997, 54, 689-698
201. Pruzanski W, Vadas P, Kim J, Jacobs H, Stefanski E, Phospholipase A2 activity associated with synovial fluid cells, *J Rheumatol*, 15/5, 1988, 791-794
202. Pruzanski, W.; Bogoch, E.; Wloch, M.; Vadas, P., 1991: The role of phospholipase A2 in the physiopathology of osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 18, 117–119;
203. Pruzanski, W.; Vadas, P.; Browning, J., 1993: Secretory non-pancreatic group II phospholipase A2: role in physiologic and inflammatory processes. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 8, 161–167;
204. Pruzanski, W.; Vadas, P.; Stefanski, E.; Urowitz, M. B., 1985: Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme. *Journal of Rheumatology* 12, 211–216;
205. Punzi L, Todesco S et al, Phospholipids in inflammatory synovial effusions, *Rheumatol Int*, 1986, 6, 7-11
206. Radin EL, Paul IL, Swann DA, Schottstaedt ES, Lubrication of synovial membrane, *Ann Rheum, Dis*, 30/3, 1971, 322-325 ;
207. Rakhimov MM, Pen´kova Liu, Iakubov IT, [Change in phospholipid composition of synovial fluids in children with various types of arthritis], article in Russian, *Vopr Med Khim*, 1995; 41(2):51-4;
208. Raviv U, S. Giasson, N. Kampf, J.-F. Gohy, R. Jérôme and J. Klein. Lubrication by charged polymers. *Nature* 2003. 425:163-165,
209. Raviv, U. and Klein, J., Fluidity of bound hydration layers, *Science* 297, 1540-1543 (2002)
210. Regan EA, Bowler RP, Crapo JD, Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury, *Osteoarthritis and cartilage*, 16, 2008, 515-521 ;

211. Reilly M. P., J. A. Lawson, G. A. Fitzgerald, Eicosanoids and iso-eicosanoids: indices of cellular function and oxidant stress *J. Nutr.*, 128, 1998, 434S-438S ;
212. Rhee D.K., J. Marcelino, MA. Baker, Y. Gong, P. Smits, V. Lefebvre, G.D. Jay, M. Stewart, H. Wang, M.L. Warman, and J.D. Carpten, The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth of synovial cell growth, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 115, No 3, March 2005 : 622–631
213. Roba M, Naka M, Gautier E, Spencer ND, Crockett R, The adsorption and lubrication behavior of synovial fluid proteins and glycoproteins on the bearing-surface materials on hip replacements, *Biomaterials*, 30, 2009, 2072-2078
214. Robinson DR, Tashjian AH Jr, Levine L: Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia. *J Clin Invest* 56:1181, 1975
215. Rodman GP, Benedek TG, and Panetta F. The early history of synovial (joint fluids). *Ann Intern Med* 1995;65:821-842
216. Ropes MW, Rossmcisi EC, and Bauer W. The origin and nature of normal human synovial fluid. *J Clin Invest* 1940;19:795-799
217. Sahapatik, O. Leukotriene B4 and prostaglandin E2 like activity in synovial fluid of osteoarthritis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 39:25, 1990;
218. Sarma AV, Powell GL, LaBerge M. Phospholipid composition of articular cartilage boundary lubricant. *J Orthop Res* 2001; 19:671–676.
219. Sarzi-Puttini P et al, Osteoarthritis : an overview of the disease and its treatment strategies, *Semin Arthritis Rheum*, 35/1, 2005, 1-10
220. Schiller J, Zschörnig O, Petkovic M, Müller M, Arnhold J, Arnhold K, Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and 31P NMR, *J Lipid Res*, 2001, 42 :1501-1508 ;
221. 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. *Current Medicinal Chemistry* 10, 2123–2145
222. 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. *Current Medicinal Chemistry* 10, 2123–2145 ;
223. Schmid T, Lindley K, Su J, Soloveychik V, Block J, Kuettner K, Schumacher B (2001a) Superficial zone protein (SZP) is an abundant glycoprotein in human synovial fluid and serum. *Trans Orthop Res Soc* 26: 82 ;
224. Schmid T, Soloveychik V, Kuettner K, Schumacher B (2001b) Superficial zone protein (SZP) from human cartilage has lubrication activity. *Trans Orthop Res Soc* 26: 178;
225. Schmidt TA, Gastelum NS, Nguyen QT, Schumacher BL, Sah RL, Boundary lubrication of articular cartilage – Role of synovial fluid constituents, *Arthritis & Rheumatism*, 56/3, 2007, 882-891 ;
226. Schneider N, Lejeune JP, Deby-Dupont G., Serteyn D, Le rôle des synoviocytes dans l'articulation diarthrodiale enflammée, *Ann Méd Vet*, 2007, 151, 24-43;
227. Schneider N, Pathogénie cellulaire et moléculaire du stress oxydatif dans l'ostéo-arthropathie dégénérative équine, Université de Liège, thèse 2007
228. Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE (1994) A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 311: 144-152;

- 229.Schumacher BL, Hughes CE, Kuettner KE, Caterson B, Aydelotte MB (1999) Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *J Orthop Res* 17: 110-120
- 230.Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL (2005) Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res* 23: 562-568
- 231.Schur PH, Sandson J. Immunological studies of the proteins of human synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1963;6:15-129
- 232.Schwartz Iris, Dalia Seger, Shmuel Shaltiel, Molecules in focus : Vitronectin, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (1999) 539-544
- 233.Schwarz IM, Hills BA (1996) Synovial surfactant: lamellar bodies in type B synoviocytes and proteolipid in synovial fluid and the articular lining. *Br J Rheumatol* 35: 821-827;
- 234.Schwarz IM, Hills BA (1998) Surface-active phospholipids as the lubricating component of lubricin. *Br J Rheumatol* 37: 21-26 ;
- 235.Sinha P, Singh C, Prasad KR, Lubrication of human joints – a microcontinuum approach, *Wear*, 80/2, 1982, 159-181 ;
- 236.Smith GM, Ward RL, McGuigan L, Rajkovic IA, Scott KF, Measurement of human phospholipases A2 in arthritis plasma using a newly developed sandwich ELISA, *British Journal of Rheumatology*, 1992, 31, 175-178
- 237.Stratton CJ: Morphology of surfactant producing cells and of the alveolar lining. In *Pulmonary Surfactant* Edited by: Robertson K, van Golde L MG, Battenburg JJ. Amsterdam, Elsevier; 1984:68-118
- 238.Suso S, Segur J, Carbonell JA, Manero JM, Planell JA, Cartilage appearance using an environmental scanning electron microscope, *Cell preservation technology*, 2/1, 2004, 51-54 ;
- 239.Svenson, K.L.G., Lithell, H., Hallgren, R., Selinus, I., and Vessby, B. Serum lipoproteins in active rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory arthritides. *Arch. Int. Med.* 147:1912, 1987;
- 240.Swann DA, Bloch KJ, Swindell D, Shore E, The lubricating activity of human synovial fluids, *Arthr Rheum*, 27, 1984, 552-556 ;
- 241.Swann DA, Radin EL. The molecular basis of articular lubrication. *The Journal of biological chemistry* 1972; 247(25):8069-8073 ;
- 242.Swann DA, Silver FH, Slayter HS, Stafford W, Shore E (1985) The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem J* 225: 195-201;
- 243.Swann DA, Sotman S, Dixon M, Brooks C. The isolation and partial characterization of the major glycoprotein (LGP-I) from the articular lubricating fraction from bovine synovial fluid. *Biochemical Journal* 1977;161:473–85
- 244.Sylvette Bas, Diagnostic des affections articulaires, 2009, CHU Genève, <http://www.ar-l.ch/Docs/synovial.pdf>, consulté le 18042011
- 245.Sylvie Bas, Contribution de l'analyse du liquide synovial au diagnostic des affections articulaires, Notes de cours, Hôpital de Geneve, <http://www.ar-l.ch/Docs/synovial.pdf>, consulté le 18042011 ;
- 246.Tandford C., 1980, *The hydrophobic effect : formation of micelles and biological membranes*, Wiley, New York ;
- 247.Tiku ML, Shah R, Allison GT, Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis, *The Journal of Biological Chemistry*, 275/26, 2000, 20069-20076;
- 248.Tolosano E. and Altruda F., Hemopexin: Structure, Function, and Regulation, *DNA and cell biology*, 2002, vol 21, n° 4, p. 297-306

249. Trudelle P, Beaucoup de bruit autour du bruit articulaire, *Kinésithérapie – les cahiers*, 29-30, 2004, p. 76-80
250. Trumble TN, Brown MP, Merritt KA ; Billingham RC, Joint dependent concentration of bone alkaline phosphatase in serum and synovial fluids of horses with osteochondral injury : an analytical and clinical validation, *Osteoarthritis and cartilage*, 16, 2008, 779-786 ;
251. Trunfio Sfarighiu A.M., *Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physico-chimique des assemblages moléculaires du fluide synovial*, thèse INSA de Lyon, 2006 ;
252. Trunfio-Sfarighiu A.M, and al., Analysis of the tribological role of molecular assemblies of synovial fluid in the healthy joints operation, 3rd International Conference on Biomaterials and Medical Devices BIOMMEDD'2008, Bucarest : Roumanie (2008);
253. Ueda S, Kawamura K, Ishi N, Matsumoto S, Hayashi K, Okayasu M, Saito M, Sakurai I: Ultrastructural studies on surface lining layer of the lungs. Part IV. Resected human lung. *Jpn Med Soc Biol Interface* 1985, 16:36-60;
254. Unsworth A, Dowson D, Wright V, Frictional Behaviour of human synovial joints.I. Natural joints, *Trans Asme Ser F*, 97, 1975, 369-376 ;
255. Unsworth A, Tribology of human and artificial joints, *J Eng Med*, 205, 1991, 163-172 ; Simkin PA, Friction and lubrication in synovial joints, *J Rheum*, 27, 2000, 567-568
256. Vacklin HP, Tiberg F, Fragneto G, Thomas RK, Phospholipase A2 hydrolysis of supported phospholipid bilayers : a neutron reflectivity and ellipsometry study, *Biochemistry*, 2005, 44, 2811-2821
257. Vadas P, Browning J, Edelson J et al, Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation : the relationship with associated disease states, *J Lipid Mediators*, 1993, 8, 1-30
258. Vadas, P., Pruzanski, W., Kim, J., Fornasier, V., 1989, The proinflammatory effect of intra-articular injection of soluble human and venom phospholipase A2, *The American Journal of Pathology*, 134:807-811
259. Verbene G, Merker Y, Halperin G, Maroudas A, Etsion I, Techniques for assessment of wear between human cartilage surfaces, *Wear*, 266, 2009, 1216-1223 ;
260. Viel E. et al, *La marche humaine, la course et le saut*, Ed. Elsevier Masson, Paris, 2000
261. Vikari, J., Jalava, S., and Terho, T. Synovial fluid lipids in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheum.* 9:164, 1980;
262. Wade, C.R., Jackson, P.G., Highton, J., and Van Ry, A.M. Lipid peroxidation and malondialdehyde in the synovial fluid and plasma of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta.* 164:245, 1987;
263. Waite M, DJH Anahn (Ed.), *The Phospholipases*, Plenum, New York, 1987; Dennis EA (ed.), *Phospholipases. Method in enzymology*. Academic Press, New York, 1991, p. 197 ;
264. Walker PS, 1973, A comparison of normal and artificial human joints. *Acta Orthopédica Belgica Supplementum* 39, 43-54
265. Walker PS, Dowson D, Longfield MD, Wright V, Boosted lubrication in synovial joints by fluid entrapment and enrichment, *Ann Rheum Dis*, 27, 1968, 512-520
266. Wang H, Ateshian GA. The normal stress effect and equilibrium friction coefficient of articular cartilage under steady frictional shear. *J Biomech* 1997;30: 771-776.
267. Watanabe M, Leng CG, Toriumi H, Hamada Y, Akamatsu N, Ohno S, Ultrastructural study of upper surface layer in rat articular cartilage by « in vivo cryotechnique » combined with various treatments, *Med Electron Microsc*, 33, 2000, 16-24 ;
268. Weston T, *Atlas d'Anatomie*, Ed. Vox, Bucarest, 2001
269. Wieland H. A.; Michaels M.; Kirschbaum B. J.; Rudolph K. A. Osteoarthritis – an untreatable disease? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2005, 4, 331-343 ;

270. Williamson, M. P.; Humm, G.; Crisp, A. J., 1989: ¹H nuclear magnetic resonance investigation of synovial fluid components in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and traumatic effusions. *British Journal of Rheumatology* 28, 23–27 ;
271. Wuthier R.E., Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 409 (1975) 128–143;
272. Young AA, McLennan S, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Read RA . Proteoglycan 4 downregulation in a sheep meniscectomy model of early osteoarthritis *Arthritis Research and Therapy*, 8 (2) (2006), p. R41
273. Zallen G, Moore EE, Johnson JL, Tamura DY, New mechanisms by which secretory phospholipase A2 stimulates neutrophils to provoke the release of cytotoxic agents, *Arch Surg*, 1998, 133 :1229-1233 ;
274. Zappone B, Ruths M, Greene G.W, Jay G.D, Israelachvili J.N, Adsorption, Lubrication, and Wear of Lubricin on Model Surfaces: Polymer Brush-Like Behavior of a Glycoprotein, *Biophysical Journal*, Mar 1, 2007

Partie B

1. Agranoff B.W., Benjamins J.A. and Hajra A.K., Basic Neurochemistry Molecular, Cellular, and Medical Aspects. In: G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher and M.D. Uhler, Editors (6th ed.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (1999), pp. 47–67
2. Athanamena A., *Communication personnelle*, 2010
3. Avanti Polar Lipids, site internet avantilipids.com ;
4. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, and Sak RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *European Cells and Materials* 2007;13:26-39
5. Bligh EG, Dyer WJ, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 37 :1959, 911-917
6. Bodennec J et al, A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges, *Journal of lipid research*, 41, 2000, 1524-1531
7. Bole GG, Synovial fluid lipids in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis and rheumatism*, 5 (6), 1962, 589-601
8. Bomalaski, J.S., and Clark M. In: *Biochemistry, Molecular Biology and Physiology of Phospholipase A2 and Its Regulatory Factors*. (A.B. Mukherjee, ed.) Plenum Press, New York, 1991, p. 231
9. Bordet, Guichardant, 1990
10. Burke JE, Dennis EA, Phospholipase A₂ structure/function, mechanism and signaling, *Journal of Lipid Research*, 2009, 50, S237-S242
11. Chen et Hills, 2004 ;
12. Corneci M et al, Analyse lipidomique des fluides synoviaux pathologiques pour améliorer le comportement tribologique des articulations pathologiques ou prothésées, Journées Francophones de Tribologie - " tribologie et développement durable ", Villeurbanne : France (2008) ;
13. P.R. Cullis and B. de Kruijff. (1976). ³¹P NMR Studies of Unsonicated Aqueous Dispersions of Neutral and Acidic Phospholipids: Effects of Phase Transitions, 2H and Divalent Cations on the Motion in the Phosphate Region of the Polar Headgroup. *Biochim. Biophys. Acta*; 436:523-540.
14. Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Lindgren, J.A., and Samuelsson, B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3887, 1981
15. de Kruijff B., P.R. Cullis and G.K. Radda. (1975). Differential Scanning Calorimetry and ³¹P NMR Studies on Sonicated and Unsonicated Phosphatidylcholine Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*: 406:6-20.
16. Devaux, 1994
17. Diez E, Chilton FH, Stroup G, Mayer RJ, Winkler JD, Fonteh AN, Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A₂ enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate, *Biochem J*, 301, 1994, 721-726
18. Domingues MRM, Reis A, Domingues P, Mass spectroscopy analysis of oxidized lipids, *Chemistry and Physics of lipids*, 156, 2008, 1-12
19. Eehalt R et al, Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nano electrospray-tandem mass spectrometry, *Scand J Gastroenterol*, 2004, 39, 737-742
20. Eldho, N. V., S. E. Feller, S. Tristram-Nagle, I. Polozov, and K.Gawrisch. 2003. Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid—differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. *J. Am. Chem. Soc.* 126:6409–6421
21. Everts, S., and J. H. Davis. 2000. H-1 and C-13 NMR of multilamellar dispersions of polyunsaturated (22: 6) phospholipids. *Biophys. J.* 79:885–897
22. Eymard Sylvie, Mise en évidence et suivi d'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard : choix des procédées, Thèse de doctorat. Nantes. Ecole Polytechnique de l'Université de Nantes, 2003, 151 p.

23. Feller, S. E., K. Gawrisch, A. D. MacKerrell. 2001. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J. Am. Chem. Soc.* 124:318–326
24. Fenske, 1993
25. Filipov A, Orådd GG, Lindblom G, Domain formation in model membranes studied by pulsed-field gradient-NMR : role of lipid polyunsaturation, *Biophysical Journal*, 93, 2007, 3182-3190
26. Fuchs B et al, *J Chromatography A*, 2010, doi :10.1016/j.chroma.2010.11.066
27. Fuchs B, Bondzio A, Wagner U, Schiller J, Phospholipid composition of sera and synovial fluids from dog, human and horse : a comparison by ³¹P-NMR and MALDI-TOF MS, *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 93, 2009, 410-422
28. Fuchs B, Schiller J ; Wagner U, Häntzchel H, Arnold K, The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ration in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis : investigations by ³¹-P NMR and MALDI-TOF MS, *Clinical Biochemistry* 38, 2005, 925-933
29. Fuchs B, Schiller J, *Mini-Rev Med Chem* 9, 2009, 17
30. Funk CD, prostaglandins and leukotrienes : advances in eicosanoid biology, *Science*, 294, 2001, 1871-1975
31. Furey, 1997
32. Gaiani Claire, Le Roux Yves, Animal-modèles animaux et produits animaux, Journée de la recherche ENSAIA, Université de Nancy, 2009, en ligne sur http://www.ensaia.inpl-nancy.fr/fileadmin/public/recherche/Animal-Modeles_AnimauxV3.ppt, le 15/12/2011)
33. Gale LR; Chen Y, Hills BA; Crawford R. Boundary lubrication of joints: Characterization of surface-active phospholipids found on retrieved implants. *Acta Orthopaedica* 2007;78:309-14
34. Garrett RH, Grisham CM, *Biochemistry*, traduction en français DeBoeck Université, 2000
35. Genge BR Wu NYL, Wuthier R, Separation and quantification of chicken and bovine growth plate cartilage matrix vesicle lipids by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection, *Analytical Biochemistry*, 332, 2003, 104-115
36. Girodet PO, Molimard M, Anti-inflammatoires non stéroïdiens, Dépt de Pharmacologie, CHU Bordeau, en ligne sur <http://www.respir.com/doc/abonne/pathologie/ains.asp>
37. Gonzalez-Buritica H, Khamashta MA, Hughes GRV, Synovial fluid phospholipase A and inflammation, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 48, 1989, 267-269
38. Gurakar-Osborne, A., and Prete, P.E. Rapid assay phospholipase A2 activity in plasma and synovial fluid. *Clin. Chem.* 41:118, 1995
39. Han, Liu, 2007
40. Hicks AM et al, Unique molecular signature of GPL species in different rat tissues analysed by tandem mass spectroscopy, *BBA* 1761, 2006, 1022-1029
41. Higgs, G.A., Moncada, S., and Vane, J.R. The role of arachidonic acid metabolites in inflammation. In: *Advances in Inflammation Research Vol 1.* (Weissmann G., ed.) Raven Press, New York, 1979, p. 413
42. Hills 1984
43. Hills 1991
44. Hills 1998
45. Hills BA, Boundary lubrication in vivo, *Proc IMechE, Part H : J Eng Med*, 214/1, 2000, 83-94
46. Hills BA, Crawford RW (2003) Normal and prosthetic synovial joints are lubricated by surface-active phospholipid: a hypothesis. *J Arthroplasty* 18: 499-505
47. Holthius JC, Levine TP, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6, 209-220
48. http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_azide
49. Hulbert AJ, Rana T, Couture P, The acyl composition of mammalian phospholipids : an allometric analysis, *CBP Part B*, 132, 2002, 515-527
50. Hultin, H.O. (1994) Oxidation of lipids in seafoods. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality* ; Shahidi, F. & Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic & Professional, New York; 49-74
51. Huster, D., K. Arnold, and K. Gawrisch. 1998. Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures. *Biochemistry.* 37:17299–17308

52. Israelachvili, J. N. Intermolecular and surface forces; 2nd ed.; Academic Press, 1992
53. Kariel, N., E. Davidson, and K. M. W. Keough. 1991. Cholesterol does not remove the gel-liquid crystalline phase transition of phosphatidylcholines containing two polyenoic acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1062:70–76
54. Katta J, Jin Z, Ingham E, Fisher J, *Biotribology of articular cartilage – A review of the recent advances, Medical Engineering & Physics*, 30, 2008, 1349-1363
55. Kim HY, Bigelow J, Kevala JH, *Biochemistry*, 2004, 43, 1030-1036
56. Kingsley, G. R., and Schaffert, R. R.: Determination of free and total cholesterol by direct chloroform extraction. *J. Biol. Chem.* 180:315, 1949
57. Kramer RM, Hession C et al, Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipases A2, *J Biol Chem*, 264/10, 1989, 5768-5775
58. Kuehl, F.A., Jr, and Egan, R.W. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science* 210:978, 1980
59. Lagarde M, réunions Lipotribo, personal communication 2007&2010
60. Lai WM, Kuei SC, and Mow VC. Rheological equations for synovial fluids. *JBiomech Eng* 1998;100:169-186
61. Lefur Agnès, Arnaud Jean-Pierre, Les lipides polaires : actifs et vecteurs cosmétiques, *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. Volume 11, Number 6, 436-9, NOVEMBRE-DÉCEMBRE 2004
62. Leslie CC, Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production, *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids*, 2004, 82, 1-17
63. Lipowsky, R., Sackmann, E. Structure and dynamics of membranes; Elsevier sciences B.V, 1995
64. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M, The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage, *Metabolism*, 40(6), 1991, 571-576
65. Ma Y.-C. and Kim H.-Y., Development of the On-Line High-Performance Liquid Chromatography/Thermospray Mass Spectrometry Method for the Analysis of Phospholipid Molecular Species in Rat Brain, *Anal. Biochem.* 226 (1995), pp. 293–301
66. Matei Ionut, stage PFE, INSA de Lyon, 2009
67. Matei Ionut, Recherche des assemblages moléculaires actifs en biolubrification en vue du diagnostic et de la thérapeutique précoce de pathologies articulaires, thèse en cours, INSA de Lyon
68. Mazzucco D., Scott R., Spector M., 'Composition of joint fluid in patients undergoing total knee replacement and revision arthroplasty: correlation with flow properties' *Biomaterials* 25 18 (2004): 4433-4445 ;
69. Middelkoop, 1986
70. Mills et al 2005a,b
71. Mircheva K et al, Comparative study of lipolysis by PLA2 of DOPC substrates organized as monolayers, bilayer vesicles and nanocapsules, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 67, 2008, 107-114
72. Nordbäck J, Lundberg E, Christie WW, *Mar. Chem.* 60, 1998, 95
73. Ogston and Stanier, 1953
74. Peress N.S., H.C. Anderson, S.W. Sajdera, *Calcif. Tissue Res.* 14 (1974) 275–281
75. Petković M, Müller J, Schiller J, Arnhold J. Application of matrixassisted laser desorption and ionization time-off-flight mass spectrometry for the characterization of the substrate specificity of neutrophil phospholipase A2. *Microchem J* 2005; 80:31–7
76. Picard, 1998
77. Pitman, M. C., F. Suits, A. D. MacKerrell, and S. E. Feller. 2004. Molecular-level organization of saturated and polyunsaturated fatty acids in a phosphatidylcholine bilayer containing cholesterol. *Biochemistry*.43:15318–15328
78. Postle, A.D., Phospholipids lipidomics in health and disease, *Eur J Lipid Sci Technol*, 2009, 111, 2-13
79. Prete PE, Gurakar-Osborne Arzu, The contribution of synovial fluid lipoproteins to the chronic synovitis of rheumatoid arthritis, *Prostaglandins*, 1997, 54, 689-698
80. Prete, P.E., Ananth, L., and Kashyap, M.L. Apolipoproteins AI and B and cholesterol in synovial fluid. *Metabolism* 42:803, 1993

81. Prete, P.E., Gurakar-Osborne, A., and Kashyap, M.L. Synovial fluid lipoproteins: Review of current concepts and new directions. *Sem. Arthritis Rheum* 23:79, 1993;
82. Pulfer M, Murphy RC, Electrospray mass spectrometry of phospholipids, *Mass Spectroscopy Reviews*, 2003, 22, 332-364
83. Rappolt, M.; Pabst, G.; Rapp, G.; Kriechbaum, M.; Amenitsch, H. et al. New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines. *Eur. Biophys. J.* 2000, 29, 125-133
84. Rouser G, Simon G, Kritchevsky G, Species variations in phospholipid class distribution of organs : I. Kidney, liver and spleen, *Lipids*, 4(6), 1969, 599-606
85. Sahapatik, O. Leukotriene B4 and prostaglandin E2 like activity in synovial fluid of osteoarthritis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 39:25, 1990
86. Sarma AV, Powell GL, LaBerge M. Phospholipid composition of articular cartilage boundary lubricant. *J Orthop Res* 2001; 19:671–676.
87. Sawae et al, *Trib Int*, 41, 2008, 648-656
88. Schiller J, Zschörnig O, Petkovic M, Müller M, Arnhold J, Arnold K. Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and ³¹P NMR. *J Lipid Res* 2001;42:1501-1508
89. Schiller, J Fuchs, B, Arnold, K., The molecular organization of polymers of cartilage in health and disease. *Current Organic Chemistry* 10, 1771–1789, 2006
90. Scomparin Carole, Dynamique des bicouches lipidiques supportées, Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II, Faculté des Sciences de Luminy, 2007
91. Shechter, E. *Biochimie et Biophysique des membranes*; 2nd ed.; Masson, 1993
92. Shelley N. Jackson, Hay-Yan J. Wang and Amina S. Woods, In Situ Structural Characterization of Phosphatidylcholines in Brain Tissue Using MALDI-MS/MS, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Volume 16, Issue 12, December 2005, Pages 2052-2056
93. Small, D.M., Cohen, A.S., and Schmid, K. Lipoproteins of synovial fluid as studied by ultracentrifugation. *J. Clin. Invest.* 17:9, 1964
94. SOLON Jérôme, Interactions entre membranes lipidiques chargées : Instabilités, déformations et mouvement. Thèse de doctorat. Paris : Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, UFR de Physique, 2003, 217p
95. Stillwell W, Wassall SR, Docosahexaenoic acid : membrane properties of a unique fatty acid, *Chem Phys Lipids*, 126, 1-27
96. Svenson, K.L.G., Lithell, H., Hallgren, R., Selinus, I., and Vessby, B. Serum lipoproteins in active rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory arthritides. *Arch. Int. Med.* 147:1912, 1987;
97. Swartz, 1998 Schwartz et al, 1998 ;
98. Vance DE, Vance JE Eds., *Biochemistry of lipoproteins and membranes*, Elsevier, 1996
99. Vance JE, Steenbergen R, Metabolism and function of phosphatidylserine – review, *Progress in lipid research*, 44, 2005, 207-234
100. Vikari, J., Jalava, S., and Terho, T. Synovial fluid lipids in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheum.* 9:164, 1980
101. Waite M, The Phospholipases in *Handbook of lipid research*, Hanahan DJ ed., vol 5, 1030-1041, Plenum Press, NY, 1987
102. Wang WQ, Gustafson A, *J Chromatogr*, 581, 1992, 139
103. Williamson, M. P.; Humm, G.; Crisp, A. J., 1989: ¹H nuclear magnetic resonance investigation of synovial fluid components in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and traumatic effusions. *British Journal of Rheumatology* 28, 23–27
104. Wuthier R.E., *Biochim. Biophys. Acta* 409 (1975) 128–143;
105. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Phospholipase.jpg>
106. Xianlin Han, Richard W Gross, Shotgun lipidomics : multidimensional MS analysis of cellular lipidomes, Expert review of proteomics, avril 2005, vol 2, no 2, 253-264

107. Yi Chen, Ross W Crawford, Adekunle Oloyede, Unsaturated phosphatidylcholines lining on the surface of cartilage, and its possible physiological roles, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2007, 2:14, doi:10.1186/1749-799X-2-14
108. Yorek MA, in Cevc G (Ed.), *Phospholipids handbook*, Marcel Dekker Inc., New York, 1993, p. 745-766 ;
109. Zuidam, N. J.; Gouw, H. K.; Barenholz, Y.; Crommelin, D. J., 1995: Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1240, 101–110 ;

Partie C

1. Audran M, Chappard D, Hypophosphatasie : diagnostic et conduite à tenir, *Revue du Rhumatisme Monographies*, 78/4, 2011, 267-273
2. Bayerl TM, Bloom M. Physical properties of phospholipid bilayers adsorbed to microglass beads. *Biophys J* 1990;58:357-62.
3. Bergmann G., Deuretzbacher G., Heller M., and all., Hip contact forces and gait patterns from routine activities, *Journal of Biomechanics*, 2001, Vol. 34, p. 859-871.
4. Berthier Y, Systèmes tribologiques, chapitre 1, Dans *Matériaux et contacts : une approche tribologique*, Paris, G. Zambelli et L Vincent Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 1998, p. 4-12
5. Böckmann R. A., A. Hac, T. Heimbürg, H. Grubmüller, Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer, *Biophys. J.* 85 (2003) 1647–1655
6. Borta Iuliana, stage PFE, LaMCoS, INSA de Lyon, 2008
7. Bostan L et al, Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels as articular cartilage substitutes, *Tribology International*, 46, 1, 2012, 215-224;
8. Bostan L, *Matériaux polymères avec hydrophilie contrôlée. Applications en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Thèse doctorat*, 2011, 189 p;
9. Briscoe WH, Titmuss S, Tiberg F, Thomas RK, McGillivray DJ, Klein J, Boundary lubrication under water, *Nature*, 444, 2006, 191-194
10. Castellana Edward T., Paul S. Cremer, Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surface science reports*, 61, 2006, 429-444
11. Chen M., W. H. Briscoe, S. P. Armes, J. Klein, Lubrication at Physiological Pressures by Polyzwitterionic Brushes, *Science* 323 (2009) 1698-1701
12. Cheze L., Comparison of different calculations of three-dimensional joint kinematics from video-based system data, *Journal of Biomechanics*, 2000, n°33, p. 1695-1699
13. Corneci M. et al, Role of ions concentration and pH in the tribological operation of phospholipid biomimetic surfaces, 36th LEEDS-LYON SYMPOSIUM ON TRIBOLOGY, MULTI-FACETS OF TRIBOLOGY, Lyon : France, 2009;
14. Cramer 2009
15. Cremer P.S., S.G. Boxer, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 2554
16. Crisan Nicoleta, Master, Master Spécialisé Biomécanique, LaMCoS, 2009
17. Dayot Camille, Master Spécialisé Biomécanique, LaMCoS, 2009
18. Dekkiche F, Corneci MC, Trunfio-Sfarghiu AM, Munteanu B, Berthier Y, Kaabar W, Rieu JP. Stability and tribological performances of fluid phospholipid bilayers: Effect of buffer and ions. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;80:232-9
19. Dekkiche F, Etude de l'adsorption des protéines à l'interface solide/liquide et des propriétés des membranes phospholipidiques supportées, *Université Constantine, thèse* 2011
20. Freeman Mark E., Michael J. Furey, Brian J. Love, Jeanne M. Hampton, Friction, wear, and lubrication of hydrogels as synthetic articular cartilage, *Wear* 241 _2000. 129–135
21. Gaisinskaya A et al, Hydration lubrication : exploring a new paradigm, *Faraday Discussions*, 2012, doi 10.1039/C2FD00127F

22. Gale LR; Chen Y, Hills BA; Crawford R. Boundary lubrication of joints: Characterization of surface-active phospholipids found on retrieved implants. *Acta Orthopaedica* 2007;78:309-14
23. Garcia-Manyes S., G. Oncins, F. Sanz, Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy, *Biophys. J.* 2005 (89) 1812–1826
24. Goldberg, R., Schroeder, A., Barenholz, Y. and Klein, J., 'Interactions between adsorbed hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) vesicles at physiologically-high pressures and salt concentrations', *Biophysical J.*, 2011, 100, 2403-2411
25. Gomori, G., Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. *Methods Enzymol.*, **1**, 138-146 (1955).
26. Grant L.M., F. Tiberg, Normal and Lateral Forces between Lipid Covered Solids in Solution: Correlation with Layer Packing and Structure, *Biophys. J.* 82 (2002) 1373–1385
27. He Y, Chen S, Hower JC, Bernards MT, Jiang S, Molecular simulation studies of nanoscale friction between phosphorylcholine self-assembled monolayer surfaces: correlation between surface hydration and friction, *J Chem Phys*, 127, 2007, 084708
28. Higaki H, Murakami T, Nakanishi Y. Lubricating ability of Langmuir-Blodgett films as boundary lubricating films on articular surfaces. *JSME Int J* 1997;40:776-81.
29. Hills B.A. (1989) Oligolamellar lubrication of joints by surface active phospholipid. *J. Rheumatol.*, 16, 82-91.
30. Hills B.A. (1995) Remarkable antiwear properties of joint surfactant. *Ann. Biomed. Eng.*, 23, 112–115.
31. Hodge, W. A. et al. Contact pressures in the human hip joint measured in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2879-2883 (1986).
32. http://www.nanoandmore.fr/Pages/Pages_produits/Pages_PointesAFM/Fichiers_NanoWorld/Pointes_nitrures.html
33. Johnston S.A. (1997) Osteoarthritis, joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet. Clin. North Am. Small Animal Pract.*, 27, 699-723.
34. Kitano T, Ateshian GA, Mow VC, Kadota Y, Yamano Y. Constituents and pH changes in protein rich hyaluronan solution affect the biotribological properties of artificial articular joints. *J Biomech* 2001;34:1031-37
35. Klein, Molecular mechanisms of synovial joint lubrication, *IMEchE, JET*, 2006
36. Lagerholm B.C., T.E. Starr, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, *Biochemistry* 39 (2000) 2042
37. Le'Floch S, Master Spécialisé Biomécanique, INSA de Lyon, 2005
38. Munteanu B, stage PFE, LaMCoS, INSA de Lyon, 2010
39. Pawlak Z., J. Kotynska, Z.A. Figaszewski, A. Oloyede, A. Gadomski, A. Gudaniec. Impact of the charge density of phospholipid bilayers on lubrication of articular cartilage surfaces, *JAMME J.* 23 (2007) 47-50
40. Raviv U., J. Klein, Fluidity of Bound Hydration Layers, *Science* 297 (2002) 1540-1543
41. Richter PR, Berat R, Brisson RA. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* 2006;22:3497-05.
42. Sambrook, J. and Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., CSHL Press (Cold Spring Harbor, NY: 2001),
43. Schönherr H, Johnson JM, Lenz P, Frank CW, Boxer SG. Vesicle adsorption and lipid bilayer formation on glass studied by atomic force microscopy. *Langmuir* 2004;20:11600-6.
44. Schwarz I.M., B.A. Hills (1998) Surface-active phospholipid as the lubricating component of lubricin. *British Journal of Rheumatology*, 37, 21-26.
45. Swann D.A., F.H. Silver, H.S. Sayter (1985) The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem. J.* 225, 195-201;
46. Tamm J.K., H.M. McConnell, *Biophys. J.* 47 (1985) 105 ;
47. Tiberg F., I. Harwigsson, M. Malmsten (2000) Formation of model lipid bilayers at the silica-water interface by co-adsorption with non-ionic dodecyl maltoside surfactant. *Eur. Biophys. J.*, 29, 196-203.
48. Mirea D, Nanophysical analysis to study evolution of vascular and articular inflammatory pathologies, these Université Claude Bernard, 21-12-2011

49. Trunfio A.-M., Berthier Y., Meurisse M.-H. and J.-P. Rieu, Multiscale analysis of the tribological role of the molecular assemblies of synovial fluid. Case of a healthy joint and implants. *Tribology International*. 40 (2007) 1500-1515 ;
50. Trunfio Ana Maria, Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physicochimique des assemblages moléculaires du fluide synovial, thèse en biomécanique, INSA de Lyon - LaMCoS, 2006, 155 p ;
51. Trunfio-Sfarghiu AM, Berthier Y, Meurisse MH, Rieu JP. Role of nanomechanical properties in the tribological performance of phospholipid biomimetic surfaces. *Langmuir* 2008;24:8765-71
52. Vacklin H. P., F. Tiberg, R.K. Thomas, Formation of supported phospholipid bilayers via co-adsorption with β -D-dodecyl maltoside, *Bioch. Biophys. Acta* 1668 (2005) 17–24.
53. Watanabe M. et al, *Med Electron Microsc* 33 (2000)
54. Yoshizawa H, Chen YL, Israelachvili J. Fundamental mechanisms of interfacial frottement. 1. Relation between adhesion and frottement. *J Phys Chem* 1993;97:4128-40
55. Zasadzinski A.N., C.A. Helm, M.L. Longo, A.L. Weisenhorn, S.A.C. Gould, P.K. Hansma, *Biophys. J.* 59 (1991) 755; H. Egawa, K. Furusawa, *Langmuir* 15 (1999) 1660
56. Zimmermann R., D. Küttner, L. Renner, M. Kaufmann, J. Zitzmann, M. Müller, *Biointerphases*, 4 (2009) 1-6
57. Zohara A.C., McCarthy D.M., Kwak S.D., and all., Knee cartilage topography, thickness, and contact areas from MRI: in-vivo calibration and in-vivo measurements, *Osearthristis and Cartilage*, 1999, Vol. 7, p. 95–109
58. Mirea DA, Trunfio-Sfarghiu A-M, Matei CI, Munteanu B, Piednoir A, Rieu JP, Blanchin MG, Berthier Y. Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of the synovial fluid. *Tribology International* (en cours de publication);

ANNEXES

1. ["The Nobel Prize in Chemistry 2002". Nobelprize.org. 21 Feb 2011] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002
2. Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW, Nomenclature of hyaluronic acid, *Biochem J* 1986, 235 :903
3. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A et al. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* 2005 April 1;174(7):4345-55
Bassleer A, Lhoest-Gauthier MP, Renard AM, Heinen E, Goessens G, Histological structure and function of synovium, Department of hystology, Notes de cours, University of Liège :Liège, 1981, 15-22
4. Benz M, Chen N, Israelachvili J, Lubrication and wear properties of grafted polyelectrolytes, hyaluronan and hylan, measured in the surface force apparatus, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71A-1, 2004, 6-15
Bleijerveld OB et al, Metabolipidomics : profiling metabolism of glycerophospholipid species by stable isotopic precursors and tandem mas spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 352, 2006, 1-14
5. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, and Sak RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *European Cells and Materials* 2007 ; 13 :26-39.
6. Böckmann R.A., A. Hac, T. Heimbürg, H. Grubmüller (2003) Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophys. J.* 85, 1647-1655
Brannan SR, Jerrard DA, Synovial fluid analysis, *Journal of Emergency Medicine*, 30-3, 2006, 331-339
7. Brügger B et al, Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Proc Nat Acad Sci USA*, 94, 1997, 2339-2344
8. Burdick JA, Laberge M, Lickfield G, Biological lubricant composition and method of applying lubricant composition, US Pattend n° 7,867,985 B2, 2011
Cantagrel Alain, De la membrane synoviale normale à la membrane synoviale inflammatoire (synovite), *Module Appareil Locomoteur – 2008*
9. Cohen AS, Brandt KD, Krey PK: Synovial fluid in laboratory diagnostic procedures. In Cohen, AS (ed): *The Rheumatic Diseases*, 2nd ed. Boston, Little, Brown & Co, 1975

10. Collins MN, Birkinshaw C, Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels, *J Mater Sci: Mater Med*, 2008, 19, 3335-3343
11. Constantin A, Cantagrel A, Membrane synoviale : des conditions physiologiques à l'inflammation de la polyarthrite rhumatoïde. Implications thérapeutiques, 2008 ;
12. De Seze S, Ryckewaert A, Kahn MF, Bardin T, Meyer O, Orcel P, Lioté F, l'actualité rhumatologique 2009, Elsevier Masson 2009,482 p. ; Chapitre « Le synoviocyte revisité », H-K Ea, M Cohen-Solal, 319-330
13. Dobbie et al 1995 ;
14. Ea H.K, Bazille C, Lioté F, Hystologie et physiologie de la membrane synoviale, EMC, Appareil locomoteur, Doi : 10.1016/S0246-0521(08)41701-1 ;
15. Ettema AM, Amadio PC, Zhao C, Wold LE, An KN, A histological and immunohistochemical study of the subsynovial connective tissue in idiopathic carpal tunnel syndrome, *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*, 86, 2004, 1458-1466
16. Fam H, Bryant JT and Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids, *Biorheology* 2007;44/1-2:59-74
17. Fenn, J.B., Electro spray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* 2003, 42, 3871-3894.
18. Filipov A, Orädd GG, Lindblom G, Domain formation in model membranes studied by pulsed-field gradient-NMR : role of lipid polyunsaturation, *Biophysical Journal*, 93, 2007, 3182-3190
19. Fraser JRE, Kimpton WG, Pierscionek BK, Cahill RNP, The kinetics of hyaluronan in normal and acutely inflamed synovial joints : observation with experimental arthritis in sheep, *Arthr Rheum*, 1993, 22 (suppl 1), 9-17
20. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *Journal of Internal Medicine*, 1997, 242, 27-33
21. Fuchs B et al, *J Chromatography A*, 2010, doi :10.1016/j.chroma.2010.11.066
22. German JB, Gillies LA, Smilowitz JT et al. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr Opin Lipidol* 2007 February;18(1):66-71
23. Gleghorn JP, Jones ARC, Flannery CR, Bonassar LJ. Boundary mode frictional properties of engineered cartilaginous tissues. *Eur Cell Mater* 2007;14:20-8; discussion 28-9
24. Goa KL, Benfield P, Hyaluronic acid, *Drugs*, 1994, 47, 536-566
25. Goudoulas TB, Kastrinakis EG, Nychas SG, Papazoglou LG, Kazakos GM, Kosmas PV, Rheological Study of Synovial Fluid Obtained from Dogs: Healthy, Pathological, and Post-Surgery, after Spontaneous Rupture of Cranial Cruciate Ligament, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 38, No. 1, January 2010, 57-65
26. Grant L.M., F. Tiberg (2002) Normal and lateral forces between lipid covered solids in solution: Correlation with layer packing and structure. *Biophys. J.*, 82, 1373-1385
27. Gross, 1984.1985
28. Hakshur K, Benhar I, Bar-Ziv Y, Halperin N, Segal D, Eliaz N, The effect of hyaluronan injections into human knees on the number of bone and cartilage wear particles captured by bio-ferrography, *Acta biomaterialia*, 7, 2011, 848-857
29. Han et al, 1996, 2000, 2001, 2002
30. Han X, Gross RW, Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry : a bridge to lipidomics, *Journal of lipid research*, 44, 2003, 1071-9
31. Hazen et al, 1993,
32. Hermansson M, Uphoff A, Kakela R, Somerharju P. Automated quantitative analysis of complex lipidomes by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2005 April 1;77(7):2166-75
33. Hills B.A. (2000) Boundary lubrication in vivo. *Proc Inst Mech Eng H-J Eng Med.*, 214(1), 83-94.
34. Hills et Crawford, 2003
35. http://fr.wikipedia.org/wiki/Nombre_d%27Avogadro
36. http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=231&Itemid=207&catnumber=850375
37. <http://www.maitrise-orthop.com/corpusmaitri/orthopaedic/95/maheu/maheu.shtml>

38. Hu C et al, Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery – review, *Journal of Chromatography B*, 877, 2009, 2836-2846
39. Iñigo-Pavlovic R, Monllau JC, Current Concepts of the Non-rheumatic Synovial Tissues of the Knee Joint in Different Scenarios, *US Musculoskeletal review, Touch Briefings 2009*, Vol. 4, p. 55-57
40. Johnson J. M., T. Ha, S. Chu, S.G. Boxer (2002) Early steps of supported bilayers formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophys. J.*, 83, 3371-3379
41. Kessick, R.; Fenn, J.; Tepper, G., The use of AC potentials in electrospraying and electrospinning processes. *Polymer* 2004, 45, 2981-2984
42. Lai WM, Kuei SC, and Mow VC. Rheological equations for synovial fluids. *JBiomech Eng* 1998;100:169-186
43. Laredo JD et al, *Arthrographie, arthroscanner, arthro-IRM*, Elsevier Masson, Paris 2001, 169p ; chapitre 10 – « Physiologie articulaire », Bizot P, Nizard R, 135 - 146
44. Laurent TC, Laurent UBG, Fraser JRE, Functions of hyaluronan, *Ann Rheum Dis*, 1995, 54, 429-432
45. Levick JR, Synovial fluid dynamics: the regulation of volume and pressure, ch. 5, *Studies in joint Disease 2*, Edited by Maraudas A et Holborow EJ, 1983: 153-240
46. Lichtenberg D., E. Opatowski, M.M. Kozlov (2000) Phase boundaries in mixtures of membraneforming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, 1508, 1-19
47. Martindale D, A large look at lipids – major grant will found team effort to characterize human lipidome, *The Scientist* 17, 15, 2003
48. McNamara JR, Warnick GR, Cooper GR, A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta (CCA)*, 369, 2006, 158-167
49. Mow VC, Athesian GA, Lubrication and wear of diarthrodial joints, in MOW VC, Hayes WC eds., *Basic orthopaedic biomechanics*, 2nd ed, Philadelphia, PA : Lippincott-Raven, 1997, 275-315
50. Newman PJ, Grana WA, The changes in human synovial fluid osmolarity associated with traumatic or mechanical abnormalities of the knee, *Arthroscopy : the journal of arthroscopic and related surgery*, 4/3, 1988, 179-181
51. Nguyen, S.; Fenn, J.B., Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 2007, 104, 1111-1117
52. Nitzan DW, Nitzan U, Dan P, Yedgar S, The role of hyaluronic acid in protecting surface-active phospholipids from lysis by exogenous phospholipase A2, *Rheumatology*, 2001, 40 ; 336-340
53. Pascual E, Synovial fluid analysis, *Best practice & Research Clinical Rheumatology*, 19-3, 2005, 371-386
54. Perlmann GE, Ropes MW, Kaufman D, BauerW, The electrophoretic patterns of proteins in synovial fluid and serum in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 1954, 33, 319
55. Postle, A.D., Phospholipids lipidomics in health and disease, *Eur J Lipid Sci Technol*, 2009, 111, 2-13
56. Pulfer M, Murphy RC, Electrospray mass spectrometry of phospholipids, *Mass Spectroscopy Reviews*, 2003, 22, 332-364
57. Rand RP, Parsegian VA, Hydration forces between phospholipid bilayers, *BBA*, 988 (1989), 351-376
58. Renard AM, Heinen E, Goessens G, Histological structure and function of synovium, Department of hystology, Notes de cours, University of Liège :Liège, 1981, 15-22
59. Sfarghiu-Trunfio, thèse INSA de Lyon, 2006
60. Schiller J, Suss R, Arnhold J et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res* 2004 September;43(5):449-88
61. Schiller, J.; Fuchs, B.; Arnold, K., The molecular organization of polymers of cartilage in health and disease. *Current Organic Chemistry* 10, 1771–1789, 2006
62. Schmid K, Macnair MB, Characterization of the protein of human synovial fluid in certain disease states, *J Clin Invest.* 1956, 35(7): 814–824
63. Schneider N, Lejeune JP, Deby-Dupont G., Serteyn D, Le rôle des synoviocytes dans l'articulation diarthrodiale enflammée, *Ann Méd Vet*, 2007, 151, 24-43
64. Schönherr H., J. M. Johnson, P. Lenz, C.W. Frank, S. G. Boxer (2004) Vesicle adsorption and lipid bilayer formation on glass studied by atomic force microscopy. *Langmuir*, 20, 11600-11606
65. Schurtz J, Ribitsch V, Rheology of synovial fluid, *Biorheology*, 1987, 24 (4), 385-399

66. Schwartz et Hills, 1996, 1998
67. Seppanen-Laakso T, Oresic M. How to study lipidomes. *J Mol Endocrinol* 2009 March;42(3):185-90
68. Serhan CN, Hong S, Lu Y. Lipid mediator informatics-lipidomics: novel pathways in mapping resolution. *AAPS J* 2006;8(2):E284-E297
69. Sinn C.G., M. Antonietti, R. Dimova (2006) Binding of calcium to phosphatidylcholine–phosphatidylserine membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 282–283, 410-419
70. Spencer F., M. Lagarde, A. Geloën, M. Record, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003) 481-482
71. Stillwell W, Wassall SR, Docosahexaenoic acid : membrane properties of a unique fatty acid, *Chem Phys Lipids*, 126, 1-27
72. Tiberg F., I. Harwigsson, M. Malmsten (2000) Formation of model lipid bilayers at the silica-water interface by co-adsorption with non-ionic dodecyl maltoside surfactant. *Eur. Biophys. J.*, 29, 196-203
73. Trunfio Sfarighiu A.M, thèse 2006;
74. van Meer G., Cellular lipidomics. *EMBO J* 2005 September 21;24(18):3159-65
75. Watson AD. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res* 2006 October;47(10):2101-11
76. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov* 2005, July;4(7):594-610
77. Wilson JF, Long-suffering lipids gain respect, *The Scientist* 17, 5, 2003,
78. Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 1985 March;57(3):675-9
79. www.medecine.ups-tlse.fr
80. Xianlin Han, Richard W Gross, Shotgun lipidomics : multidimensional MS analysis of cellular lipidomes, Expert review of proteomics, avril 2005, vol 2, no 2, 253-264 ; doi : 10.1586/14789450.2.2.253
81. Xianlin Han, Richard W Gross, Shotgun lipidomics :Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples, *Mass Spectroscopy Reviews*, 2005, 24, 367-412
82. Zhan, D.L.; Fenn, J.B., Gas phase hydration of electrospray ions from small peptides. *International Journal of Mass Spectrometry* 2002, 219, 1-10
83. Zhioua R, Ortiz-Bravo E, Bardin T, Liquide synovial normal et pathologique, <http://www.em-consulte.com/article/8103>, consulté le 18042011

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : **CORNECI**

DATE de SOUTENANCE : **21/09/2012**

Prénoms : **Magdalena-Carla**

TITRE : **Fonctionnement tribologique des articulations synoviales pathologiques : rôle des interfaces phospholipidiques**

NATURE : **Doctorat**

Numéro d'ordre : **2012-ISAL-0083**

Ecole doctorale : **MEGA**

Spécialité : **Biomécanique**

Cote B.I.U. - Lyon : T 50/210/19 /

et bis

CLASSE :

RESUME : Afin d'améliorer l'efficacité des traitements des pathologies articulaires, en tenant compte de leur complexité et de leur ampleur, des études récentes ont mis en évidence le **rôle des assemblages lipidiques associés à la structure discontinue du fluide synovial** dans les performances tribologiques du fonctionnement articulaire. Ceci a conduit à la mise au point d'un modèle tribologique *ex vivo* (*thèse AM Sfarghiu, 2006*), proposant un « motif élémentaire » pour la biolubrification articulaire, constitué de l'empilement des interfaces phospholipidiques et des couches aqueuses.

En utilisant ce modèle, **l'objectif de ce travail a été d'étudier l'évolution des interfaces phospholipidiques du fluide synovial en présence de pathologies**. Pour ce faire, une méthodologie nano-bio-tribologique alliant des analyses **biochimiques, physicochimiques, nano-mécaniques** et **tribologiques** a été utilisée.

Les résultats de ces analyses montrent : l'influence de la faible rugosité des surfaces frottantes caractérisant les stades précoces des pathologies et celle des propriétés des interfaces phospholipidiques (liées à la variation de leur composition) sur la résistance mécanique, l'évolution au cours de frottement et la dégradation *in situ* des assemblages lipidiques des fluides synoviaux pathologiques. Le comportement des assemblages lipidiques est accentué par l'action des enzymes associées aux pathologies. Par conséquent, **le fonctionnement articulaire dépend de la résistance mécanique des interfaces phospholipidiques** et pour obtenir des coefficients de frottement très bas, l'accommodation de vitesse doit se faire au niveau des couches d'hydratation qui entourent les ions présents dans la couche aqueuse.

Ces résultats permettront de **comprendre**, à court terme **l'évolution des interfaces phospholipidiques dans les pathologies articulaires** et, à plus long terme le bon **enchaînement cause/conséquence responsable d'une pathologie articulaire** afin de développer des traitements plus efficaces, ciblés et non prothétiques.

MOTS-CLES : nano-bio-tribologie, analyse lipidomique, articulation synoviale pathologique, fluide synovial, assemblages lipidiques, lubrification par couches d'hydratation, triplet bio-tribologique, modèle *ex vivo*, phospholipides, coefficient de frottement, microscopie optique en fluorescence, microscopie de force atomique (AFM).

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS),
INSA – Lyon, CNRS UMR5259
18-20 rue des Sciences
F69621 Villeurbanne Cedex FRANCE
<http://lamcos.insa-lyon.fr/>

Directeur de thèse: Yves BERTHIER

Président de jury : Michel LAGARDE

Composition du jury : Michel LAGARDE, Bernard TINLAND, Dumitru OLARU, Michel GUICHARDANT, Yves BERTHIER, Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU, Jean Paul RIEU