



**HAL**  
open science

## Etude structurale en Microscopie Confocale Raman du cartilage produit par ingénierie tissulaire

Jean N'Dre

► **To cite this version:**

Jean N'Dre. Etude structurale en Microscopie Confocale Raman du cartilage produit par ingénierie tissulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier; Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2021. Français. NNT: 2021MONTT001 . tel-03342131

**HAL Id: tel-03342131**

**<https://theses.hal.science/tel-03342131>**

Submitted on 13 Sep 2021

**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.

# **THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

**En BIOLOGIE SANTE**

**École doctorale :  
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2) et  
Odontologie et Matières fondamentales**

**Unité de recherche :  
Laboratoire Bioingénierie et Nanosciences UR\_UM104  
UFR Odontostomatologie Abidjan, Côte d'Ivoire**

**En partenariat international avec  
Université Félix HOUPHOUET BOIGNY (UFHB), COTE D'IVOIRE**

## **ETUDE STRUCTURELLE EN MICROSCOPIE CONFOCALE RAMAN DU CARTILAGE PRODUIT PAR INGENIERIE TISSULAIRE**

**Présentée par N'DRE Jean N'DRE  
Le 26 mars 2021**

**Sous la direction des  
Pr. Frédéric CUISINIER et Pr. Yolande KOFFI-GNAGNE**

**Devant le jury composé de**

<b>Mme la Professeure DOSSO Mireille, PUPH, Université FHB Abidjan</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mr. le Professeur YAO GNANGORAN Victor, PUPH, Université de Bouaké</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. le Docteur Youri ARNTZ, MCU, Université de Strasbourg</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. le Professeur DJEREDOU Kouadio Benjamin, PUPH, UFHB Abidjan</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme le Docteur Danièle NOEL, HDR, Université de Montpellier</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme le Docteur Hamideh SALEHI, HDR, Université de Montpellier</b>	<b>Examineur</b>



**UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER**





---

**Thèse**  
**pour l'obtention du Diplôme de Doctorat d'Université**

*Domaine "Biologie Santé"*

*Mention "Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé"*

---

**ETUDE STRUCTURELLE EN MICROSCOPIE  
CONFOCALE RAMAN DU CARTILAGE PRODUIT  
PAR INGENIERIE TISSULAIRE**

---

**Présentée et soutenue le 26 Mars 2021**

**par**

**N'DRE N'DRE Jean**

Sous la Direction des :

**Professeur Frédéric CUISINIER, PUPH**

Directeur Laboratoire Bioingénierie et Nanosciences LBN EA4203, Montpellier

**Professeure Yolande KOFFI-GNAGNE, MCA**

Directrice de la Faculté Dentaire Abidjan, Côte d'Ivoire

## Préambule

Le travail qui suit est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire Bioingénierie et Nanosciences (LBN EA4203, désormais UR\_UM104 depuis une date récente) et l'Equipe Danièle de l'Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies (IRMB) du CHU de Montpellier, dont les travaux sont axés sur la « Biologie de la cellule souche mésenchymateuse et thérapies du cartilage » dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régénération des maladies ostéo-articulaires.

Dans cette collaboration, l'équipe de l'IRMB a produit et fournit tous les échantillons (les cellules et les tissus cartilagineux) qui ont servi à la conduite de cette étude. Les analyses immunohistochimie et moléculaire ont été réalisé également à l'IRMB. Au LBN, notre travail a consisté à caractériser les échantillons reçus à partir de la microscopie confocale Raman.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une cotutelle entre les universités de Montpellier (FRANCE) et Félix Houphouët BOIGNY d'Abidjan (COTE D'IVOIRE). Selon les clauses de la convention, le travail a été effectué durant ces trois années par période alternée de 6 mois entre les deux universités

## RESUME

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif, non innervé et non vascularisé, qui recouvre les extrémités des os au sein des articulations. Les fortes contraintes auxquelles est soumis le cartilage provoquent souvent l'altération de la matrice articulaire. Les défauts du cartilage articulaire sont généralement associés à la douleur et à une perte de la mobilité articulaire, et ont un impact sur la qualité de la vie, y compris le bien-être physique, social et économique. En raison du défaut de régénération ou de cicatrisation spontanée du cartilage, le recours à des techniques d'ingénierie tissulaire semble une voie prometteuse pour répondre aux besoins cliniques des patients souffrant d'arthrose et de troubles de l'articulation temporo-mandibulaire (TATM). Pour optimiser l'ingénierie du tissu cartilagineux, des techniques (nanométriques) non invasives, non destructives et à haute résolution sont nécessaires, afin d'évaluer la qualité et l'arrangement structurel du cartilage fabriqué in vitro. L'objectif de notre étude était de suivre la maturation du cartilage artificiel sous charges mécaniques avec des méthodes innovantes de microscopies, dont la microscopie confocale Raman, une technique d'analyse sans contact, non destructive et sans aucune préparation de l'échantillon. Nous avons, à partir des spectres et des images hyperspectrales Raman, caractériser les différences morphologiques des chondrons suivant les différentes zones de la matrice du cartilage et établir une cartographie représentative de la distribution spatiale des composants biochimiques de ladite matrice sur toute sa profondeur. Le calcul de l'épaisseur de la matrice péricellulaire a mise en évidence des variations croissantes dépendantes de la profondeur (zone superficielle est =  $2,7 \pm 0,8$ , zone intermédiaire =  $3,6 \pm 1,1$  et la zone profonde =  $4,9 \pm 1,8$ ,  $p < 0,001$ ). Sur la base des données spectrales Raman, il a été possible de suivre en temps réel les mécanismes sous-jacents au développement de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire, notamment la dédifférenciation des chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) différenciées en chondrocytes. Les résultats ont été comparés à des tests immunohistologiques et de réaction en chaîne polymérase (RT-PCR). En comparant le cartilage dégradé versus le cartilage normal, il a été possible de caractériser les modifications subtiles de la structure moléculaire du tissu cartilagineux précédant les modifications morphologiques de la matrice dans l'arthrose. Ces résultats montrent à la fois la capacité et la sensibilité de la microscopie confocale Raman a caractérisé la structure du cartilage articulaire et fournit des informations précieuses pouvant servir de base dans la conception de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire et un outil diagnostique pour détecter de façon précoce les modifications subcellulaires liées à l'arthrose.

**Mots clés : Cartilage articulaire, ingénierie tissulaire, microscopie confocale Raman**

## ABSTRACT

Articular cartilage is connective tissue, non-innervated and non-vascularized, that covers the ends of the bones within the joints. The high stresses to which the cartilage is subjected often lead to the alteration of the articular matrix. Defects in articular cartilage are generally associated with pain and loss of joint mobility, and have an impact on quality of life, including physical, social and economic well-being. Due to the lack of spontaneous regeneration or healing of cartilage, the use of tissue engineering techniques appears to be a promising avenue to address the clinical needs of patients with osteoarthritis and temporomandibular joint disorders (TMD). To optimize cartilage tissue engineering, non-invasive, non-destructive, high-resolution (nanometric) techniques are needed to evaluate the quality and structural arrangement of cartilage manufactured *in vitro*. The objective of our study was to follow the maturation of artificial cartilage under mechanical loads with innovative microscopy methods, including confocal Raman microscopy, a non-contact, non-destructive analysis technique without any sample preparation. Using Raman spectra and hyperspectral images, we have been able to characterize the morphological differences of the chondrons according to the different zones of the cartilage matrix and to establish a representative mapping of the spatial distribution of the biochemical components of the said matrix over its entire depth. Calculation of the thickness of the pericellular matrix revealed increasing depth-dependent variations (superficial zone is =  $2.7 \pm 0.8$ , intermediate zone =  $3.6 \pm 1.1$  and deep zone =  $4.9 \pm 1.8$ ,  $p < 0.001$ ). On the basis of Raman spectral data, it was possible to follow in real time the mechanisms underlying the development of cartilage tissue by tissue engineering, in particular the dedifferentiation of chondrocytes and mesenchymal stem cells (MSCs) differentiated into chondrocytes. The results were compared to immunohistological and polymerase chain reaction (RT-qPCR) assays. By comparing degraded cartilage versus normal cartilage, it was possible to characterize the subtle changes in the molecular structure of cartilage tissue preceding the morphological changes of the matrix in osteoarthritis. These results show both the ability and sensitivity of confocal Raman microscopy to characterize the structure of articular cartilage and provide valuable information that can be used as a basis for tissue-engineered cartilage tissue design and a diagnostic tool for early detection of subcellular changes related to osteoarthritis.

**Keywords : Articular cartilage, tissue engineering, Raman confocal microscopy**

## TABLE DES MATIERES

RESUME.....	4
ABSTRACT .....	5
DEDICACES ET REMERCIEMENTS .....	8
LISTES DES ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	12
1 LE CADRE THEORIQUE ET PROBLEMATIQUE.....	17
1.1 Cadre théorique.....	17
1.1.1 Le Cartilage articulaire et sa constitution.....	17
1.1.2 La substance fondamentale du cartilage articulaire .....	21
1.1.3 Organisation zonale.....	33
1.1.4 Développement du cartilage.....	36
1.1.5 Physiopathologie et épidémiologie du cartilage arthrosique.....	38
1.1.6 Stratégies thérapeutiques des lésions cartilagineuses.....	42
1.2 Les techniques d'évaluation du cartilage articulaire et des constructions de génie tissulaire.....	54
1.2.1 Les moyens classiques .....	54
1.2.2 Microscopie confocale Raman .....	58
1.2.3 Impacts sur la sphère oro-faciale.....	67
1.3 Problématique.....	73
2 METHODES EXPERIMENTALES .....	75
2.1 Source des échantillons .....	76
2.2 Préparation des échantillons pour les mesures microscopiques .....	77
2.2.1 Méthode de fixation et congélation des échantillons .....	77
2.2.2 Méthode de fixation des échantillons sur la lame CaF <sub>2</sub> .....	79
2.3 Microscopie multiphotonique (MMP).....	79
2.4 Microscopie à force atomique (AFM).....	81
2.5 Microscope confocal Raman .....	83
2.5.1 Méthodes d'analyse des échantillons .....	85
2.5.2 Analyse du signal Raman.....	85
2.5.3 Traitements des données spectrales.....	86
2.5.4 Prétraitement des données spectrales .....	87

2.5.5	Analyse des données .....	92
2.5.6	Analyses multivariées .....	92
3	RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	97
3.1	Caractérisation de la matrice du cartilage articulaire : Cartographie des principaux marqueurs de la matrice du cartilage articulaire à partir de la Microscopie Confocale Raman 98	
3.1.1	Introduction .....	99
3.1.2	Matériel et méthodes .....	100
3.1.3	Résultats et Discussion.....	105
3.1.4	Conclusion partielle 1.....	123
3.2	Caractérisation des mécanismes sous-jacents au développement de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire : dédifférenciation des chondrocytes et différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) en chondrocytes.....	124
3.2.1	Introduction .....	125
3.2.2	Matériels et Méthodes .....	126
3.2.3	Analyses statistiques .....	129
3.2.4	Résultats .....	129
3.2.5	Discussion .....	137
3.2.6	Conclusion partielle 2.....	145
3.3	Caractérisation de cartilage articulaire arthrosique humain .....	146
3.3.1	Introduction .....	147
3.3.2	Matériel et méthodes .....	148
3.3.3	Analyse statistique.....	151
3.3.4	Résultats et Discussion.....	151
3.3.5	Conclusion partielle 3.....	158
4	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	159
5	REFERENCES .....	163
6	LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX.....	187



## **DEDICACES ET REMERCIEMENTS**

### **JE DEDIE CE TRAVAIL,**

#### **AU DIEU TOUT-UISSANT**

Pour la force qu'Il m'a accordé pour tenir jusqu'au bout de cette thèse malgré les nombreux obstacles. Qu'à travers ce travail, oh mon **JESUS**, ton Précieux **NOM** soit magnifié et glorifié. Merci mon **JESUS** pour ta grâce dans ma vie.

#### **A MA PETITE FAMILLE,**

Mon Epouse **KOFFI ADJOUA MARIE MICHELE** et à nos merveilleux enfants **QETOURA AHONON MARIE PENIELLE BERAKA** et son petit frère **MIELISSAGNON CHRIST MAEL EVAN**, je tiens à vous traduire toute mon affection. Vous avez porté le poids de l'éloignement et vous avez tenu jusqu'au bout, malgré les pleurs à chaque fois que je devais prendre un vol... vous m'avez toujours accompagné de vos prières. Nous y sommes arrivés par la grâce de **DIEU**. Ce travail est le **VOTRE** ! Trouvez ici, mes chers **ADORE**s, l'expression de tout mon **AMOUR**.

**A mon Père N'DRE KOUADIO PAUL**, qui très tôt m'a encouragé à aller le plus loin possible dans les études. Tout ce temps, tu m'as soutenu à tous les niveaux. Aujourd'hui où je couronne mes formations avec une thèse d'université, je voudrais tout simplement te dédié le fruit de ce travail. Que le Tout-puissant te garde le plus longtemps possible pour profiter de l'ombre de l'arbre que tu as planté.

### **IN MEMORIUM**

**A ma DEFUNTE MERE, KOFFI AHONON Brigitte**, Oh combien nous étions proches ! Voilà deux soutenances de thèse que je réalise dans ma vie de l'élève que tu aimais accompagner à l'école. Tout ceci se passe sans voir et toucher ton bébé. Je sais que Tu es toujours auprès de moi et Tu aurais sans doute voulu embrasser ton enfant, mais la Vie te maintient de l'autre côté de la rive. Je te dédie tout ce travail et demande au Bon **DIEU** te prendre dans sa plénitude pour contempler avec **LUI** la grâce dont **IL** me comble. Reposes en Paix Très chère **MERE**

**Au Professeure TRE YAVO Mireille,**

Oh d'où nous sort cette pandémie à corona virus ? Lors de notre première rencontre où j'ai profité pour vous suggérer de m'accompagner dans mon aventure, vous avez aussitôt dit oui sans tenir compte de vos diverses occupations à la Fac de Médecine en tant Directrice du Département d'Histologie et d'embryologie, entre autres. Voilà qu'au moment où nous échangeons à propos de la tenue de cette soutenance, que ce virus nommé covid-19 est venu vous terrasser. Vous êtes partie sans avoir sûrement eu le temps d'ouvrir le dernier mail que je vous avais envoyé. Nous voilà au terme de ce travail ! Que le Bon DIEU vous accepte auprès de LUI pour vous reposer de tout le travail que vous avez abattu durant votre passage sur terre.

### **MES REMERCIEMENTS**

Au **Professeur CUISINIER**, Directeur de thèse, qui les moments les plus difficiles m'a accueilli dans son laboratoire pour réaliser mon stage de Master 2. Tout le temps de cette thèse, au-delà de la connaissance scientifique que vous inspirez et vous transmettez à tous ceux qui vous fréquentent, vous m'avez enseigné une vertu capitale de la Vie : L'HUMILITE ! Vous m'avez fait confiance en me confiant ce travail qui m'a permis de sortir de mon champ et de m'ouvrir à d'autres connaissances. Vous avez été très attentif à tous mes besoins et vous avez toujours réagi positivement. Cette aventure au LBN, à vos côtés, m'a enseigné la VIE. Vous êtes un Grand Homme. Par ces petits écrits, je vous exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude.

**Au Professeure KOFFI-GNAGNE Yolande**, Co-directrice, chère Professeure, nous y voilà ! Un parcours parsemé d'obstacles certes, mais le Tout-puissant nous a toujours donné les forces nécessaires pour surmonter tout ce qui se présentait à nous. Alliés sur le plan ethnique, vous n'avez manqué aucune occasion pour me manifester votre soutien face à certaines difficultés qui se dressaient sur mon chemin. Sachez chère Maître que je vous serai toujours reconnaissant pour tout le soutien à m'apporter. Que le DIEU TOUT-PUISSANT a qui vous êtes attaché, vous comble de ses bénédictions. Merci beaucoup pour votre soutien indéfectif et inconditionnel. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et ma gratitude. DIEU VOUS COMBLE !

**A Hamideh SALEHI**, mon encadrante ! Hami, oh combien tu as été spéciale tout le temps de la thèse ! Grande motivatrice, toujours rassurante, disponible et très maternelle parfois. Tu m'as

permis de me familiariser au Raman et de tirer profit. Un nouveau et vaste domaine qui m'a ouvert sur d'autres connaissances. Nous avons passé de bons moments en compagnie de cet outil Raman dans l'anti-chambre du LBN. Une pièce, quand on y est, on semble parfois coupé de tout et on passe inaperçu au LBN. Mais, il nous a appris de nouvelles choses et des choses intéressantes. Merci beaucoup pour ton coaching, pour ta gentillesse et cet amour de la science.

### **Danièle NOEL et Marie MAMMUS (Equipe IRMB)**

Ce travail que nous pouvons présenter aujourd'hui est le fruit de votre collaboration et votre grande disponibilité. Vous avez toujours répondu positivement et avec promptitude à nos sollicitations. Je tiens à vous remercier de tout mon cœur pour tout le soutien que vous m'avez apporté pour que cette thèse aille jusqu'à son terme.

### **A tous les membres du LBN,**

Ne pouvant remercier individuellement tous ceux qui m'ont entouré de leur affection au cours de cette thèse, je tiens par ces quelques lignes, vous traduire mes remerciements et toute ma gratitude. Contrairement aux idées reçues, une thèse n'est pas le résultat d'un travail purement personnel. Au-delà d'être une expérience scientifique incroyable, c'est également une aventure humaine inoubliable qui m'a permis de rencontrer et côtoyer des personnes extraordinaires, qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail. C'est donc naturellement et en toute sincérité que je remercie l'ensemble des équipes du LBN, et plus particulièrement **Ivan** avec qui j'ai beaucoup travaillé sur d'autres thématiques. Je n'oublie pas ces petites histoires drôles que tu aimes raconter et qui permettaient d'évacuer les stress à travers les rigolades. A tous, merci pour ces bons moments partagés au cours de cette aventure scientifique.

Cette thèse est le fruit d'une collaboration entre deux laboratoires : le Laboratoire Bioingénierie et Nanosciences et l'Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies (IRMB), notamment l'équipe Danièle, principalement. Cependant, ce travail nous a ouvert à d'autres collaborations. A ce titre, je voudrais exprimer ici toute ma reconnaissance et ma gratitude à tous les membres du Laboratoire Charles Colomb (LCC), particulièrement au **Professeur Csilla, aux Docteurs Thiery et Béla** qui m'ont apporté leurs expertises dans la réalisation de certaines expérimentations, et l'Institut de Neurosciences de Montpellier (INM), notamment Chantal RIPOLL qui a été toujours présente toutes les fois que nous l'avons sollicité. A tous et individuellement, je tiens à vous dire GRAND MERCI pour votre soutien et votre apport considérable.

## LISTES DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse des composantes principales
AFM	Microscope force atomique
ATM	Articulation temporo-mandibulaire
CMC	Carboxyméthylcellulose
CSMs	Cellules souches mésenchymateuses
DPSCs	Cellules souches de la pulpe dentaire
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier
GAG	Glycosaminoglycanes
ICA	Implantation de chondrocytes autologues
IFOP	FTIR couplée à une sonde optique infrarouge
INM	Institut de Neurosciences Montpellier
IRMB	Institut de Médecine régénérative et biothérapies
IRM	Imagerie par Résonance magnétique
LBN	Laboratoire Bioingénierie et Nanosciences
LCC	Laboratoire Charles Coulomb
MC	Matrice cartilagineuse
ME	Microscopie électronique
MEC	Matrice extracellulaire
MCR	Microscopie Confocale Raman
OCT	Tomographie par cohérence optique
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PGs	Protéoglycanes
UFR	Unité de formation de recherche

## INTRODUCTION GENERALE

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif unique qui, tout comme l'os, est présent dans de nombreux sites du corps des vertébrés, notamment au niveau des articulations où il fournit une interface sans frottement entre les os et dissipe ainsi les charges lors de la locomotion. La capacité du cartilage à remplir ses diverses fonctions est directement liée à son organisation zonale complexe en fonction de la profondeur. La plupart des études sur la morphologie et la biologie du cartilage articulaire décrivent une structure élaborée et hautement ordonnée, constituée principalement de trois zones : superficielle, moyenne et profonde, selon la forme différente des cellules, la composition biochimique de la matrice extracellulaire (MEC) et l'orientation des fibrilles de collagène <sup>1-4</sup>. L'organisation structurelle et la distribution spatiale des principaux composants sur toute la profondeur du tissu lui confèrent ses propriétés biomécaniques et l'amortissement des chocs.

La perturbation de cet équilibre est le début de l'initiation et de la progression des maladies dégénératives, telles que l'arthrose, un trouble impliquant des articulations mobiles, caractérisé par un stress adhésif et la dégradation de la matrice extracellulaire, résultant de macro, et de microdommages qui activent des réponses restauratrices adaptatives anormales, y compris les voies pro-inflammatoires du système immunitaire <sup>5</sup>. En raison de sa particularité à ne pas être innervé, ni vascularisé, le cartilage se régénère peu et cicatrice difficilement de façon spontanée, notamment à l'âge adulte. Les lésions du cartilage sont irréversibles et peuvent causer des dommages irréparables, pouvant aboutir à l'arthrose, une maladie débilitante associée à une perte de la fonctionnalité de l'articulation. Toutes les stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage consistent à régénérer un tissu de remplacement du cartilage qui soit mécaniquement fonctionnel et réparer cliniquement les défauts de cartilage articulaire dans le cas d'arthrose. Le défi majeur actuel consiste à développer des substituts biologiques qui soient la réplique fidèle du tissu natif de sorte à faciliter l'intégration et les fonctions mécaniques de celui-ci une fois implanté dans l'environnement natif.

Avec les dernières avancées de la recherche, il est connu aujourd'hui que les cellules ont la capacité de se réorganiser en structures complexes spécifiques aux tissus, avec un minimum de facteurs de croissance inductifs <sup>6</sup>. Cependant, le manque d'organisation structurée et de taille du tissu raisonnable constitue un obstacle majeur à la réalisation d'une fonctionnalité véritablement *in vivo*. La capacité de caractériser fidèlement l'organisation biochimique et la distribution de la MEC cartilagineux est essentielle pour non seulement comprendre les processus physiopathologiques sous-jacents de l'initiation et de la progression des maladies

dégénératives, notamment l'arthrose, et développer ainsi de nouvelles stratégies de réparation du cartilage pour traiter la dégénérescence et restaurer la fonctionnalité des articulations.

A ce jour, deux sources de cellules progénitrices sont exploitées pour la réparation des lésions cartilagineuses pour des applications cliniques : les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses. Le principe consiste à encapsuler des cellules chondrogéniques dans un échafaudage polymère *in vitro* et supplémentés avec des facteurs de croissance pour induire la formation de la MEC cartilagineux. Le cartilage artificiel est réimplanté dans le défaut cartilagineux généralement situé dans l'espace intra-articulaire, dans lequel des indices chondro-inducteurs en termes de cytokines et de stimulations mécaniques existent pour favoriser la chondrogenèse spontanée des cellules implantées et maintenir leur phénotype et leur fonction chondrogéniques. Les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses humaines. La qualité de la matrice est appréciée sur la base de la présence des principaux composants de la matrice : les glycosaminoglycanes (GAGs, en particulier l'aggrécane) et le collagène, notamment le collagène de type II.

Histologiquement, les techniques de caractérisation du GAG et du collagène se limitent souvent à des dosages biochimiques et une coloration des tissus. Bien que ces techniques soient capables d'apprécier ou quantifier la distribution de collagènes et de glycosaminoglycanes spécifiques, ces méthodes restent de nature qualitative ou semi-quantitative, nécessitant un étiquetage et se prêtant difficilement à des analyses approfondies précises de la distribution des composants de la MEC <sup>7,8</sup>.

Ces dernières années, de nombreuses autres méthodes d'imagerie non-invasive, notamment la microscopie confocale par fluorescence, la microscopie à lumière polarisée (PLM), la tomographie par cohérence optique (OCT), la génération du second harmonique (SHG), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) ont été développées pour des applications plus directes dans le diagnostic de l'arthrose <sup>9-13</sup>. Par exemple, le microscope confocale par fluorescence permet de suivre certaines molécules. L'un des inconvénients de cette technique réside dans l'utilisation de marqueurs fluorescents qui peuvent modifier le mécanisme des activités liées aux composés chimiques à cause de la taille des fluorophores qui sont souvent de plus grande que les molécules étudiées. Une autre difficulté, c'est l'existence de photo-blanchiment. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est une technique d'imagerie chimique utilisant un rayonnement infrarouge transmis ou diffusé pour obtenir des images. Ce rayonnement provient des états de vibration des molécules. La difficulté avec cette technique est sa résolution spatiale de longueur d'onde infrarouge (10-20  $\mu\text{m}$ ) qui

semble élever pour observer des structures subcellulaires. De plus, l'eau paraît opaque dans l'infrarouge, de sorte que les molécules biologiques sont impossibles à étudier. Or, une sensibilité moléculaire élevée est une condition indispensable pour améliorer non seulement le diagnostic de l'arthrose, mais également pour permettre une meilleure compréhension des changements biochimiques au cours du développement et de la progression de l'arthrose pour une meilleure prise en charge.

La spectroscopie Raman est une technique d'imagerie non-invasive et sans étiquette qui offre un potentiel unique pour quantifier la distribution des produits de la MEC dans les tissus cartilagineux. Cette technique spectroscopique fournit une «empreinte» spectroscopique représentant l'ensemble de la composition moléculaire des échantillons d'intérêt <sup>14</sup>, sur la base de la diffusion inélastique de la lumière (ou effet Raman). De plus, sa haute résolution permet non seulement d'observer la morphologie des cellules et des tissus, mais d'extraire une richesse d'informations biomoléculaires (c'est à dire une conformation biochimique spécifique des protéines, des glucides, des lipides, des acides nucléiques, etc..) dans des cellules et des tissus utilisant des biomolécules endogènes comme contraste et avec une résolution spatiale submicrométrique. De plus, comme la diffusion Raman peut être décrite par un tenseur de polarisabilité, contrôler la polarisation de l'incident et la lumière détectée permet d'extraire des informations structurelles <sup>15</sup>.

Le plus intéressant, chaque spectre unique comporte une quantité d'information se rapportant à l'endroit où le spectre est enregistré. L'intensité et le profil des pics Raman fournissent des indications sur les quantités relatives d'espèces chimiques présentes dans l'échantillon, ainsi que sur leurs environnements de liaison <sup>16</sup>. De ce fait, les mesures de spectroscopie Raman peuvent être capables de fournir une mesure de la concentration relative de constituants moléculaires dans une région tissulaire localisée. En raison de sa compatibilité avec l'eau, la spectroscopie Raman autorise l'analyse des échantillons de tissus non fixés et hydratés, permettant ainsi l'élimination des techniques laborieuses de préparation d'échantillons et d'éviter les artefacts de fixation chimiques. De plus, cette technique spectroscopique Raman offre l'avantage de réaliser des images rapides, sans artefact et à haute résolution de la matrice et d'en extraire une foule d'informations sur l'organisation structurelle et la distribution des GAGs et du collagène. L'une des complexités de cette technique réside dans l'analyse et l'interprétation des signaux qui se chevauchent dans le spectre Raman du cartilage. Dans le cartilage, la MEC est fortement dominé par les signaux de collagène alors que les GAG sont enfouis et difficiles à résoudre. A cet effet, diverses techniques d'analyses uni ou multivariées

ont été associées à la spectroscopie Raman pour mettre en évidence les principaux biomarqueurs du cartilage. Les nombreuses études qui ont été réalisées jusque-là, aucune n'a fourni une cartographie de l'organisation structurale et de la distribution des composants principaux de la matrice cartilagineuse, à part quelques informations en vrac sur pour établir un diagnostic précoce de l'arthrose ou sur quelques changements biochimiques.

Le but de notre étude était de suivre la maturation du cartilage articulaire produit par ingénierie tissulaire. De toute évidence, il est difficile voire impossible de savoir si nous avons produit un cartilage si nous ne savons pas de quoi le cartilage est fait. Notre démarche scientifique a consisté à caractériser la matrice du cartilage articulaire, en évaluant l'organisation structurale et la concentration des biomolécules et en identifiant les principaux biomarqueurs et leur distribution spatiale sur toute la profondeur tissu. Secondairement, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la maturation du cartilage produit par ingénierie tissulaire. Ainsi, la production de collagène de type II et de GAG a été quantifier dans des constructions de cartilage par ingénierie à partir d'échafaudage et, à l'inverse les phénomènes de dédifférenciation des chondrocytes ont été appréciés. Ces derniers résultats ont été comparés à des analyses de quantification de l'expression des gènes des composants principaux du cartilage grâce à des tests de réaction en chaine polymérase et immunohistochimiques réalisés.

En sommes, les travaux décrits dans cette thèse se sont concentrés sur l'utilisation de la microscopie confocale Raman pour étudier la microstructure du cartilage articulaire et la caractérisation de ses principaux composants moléculaires sur des explants de cartilage articulaire natif humain et des constructions de tissu cartilagineux par ingénierie tissulaire. La première partie de ce travail est consacrée au cadre théorique et problématique du notre sujet qui passe en revue certaines notions fondamentales. Cette partie est consacrée à une revue de la littérature qui présente une description anatomique et physiopathologique du cartilage articulaire, les différentes stratégies thérapeutiques engagées jusqu'à ce jour. Faut-il le préciser, il existe trois types de cartilage (hyalin, élastique et fibrocartilage). Une description brève du cartilage élastique et fibrocartilagineux a été cependant faite, pour marquer la différence entre ces trois types de cartilage. Au-delà, tout le travail, a concerné essentiellement le cartilage articulaire hyalin. Pour répondre à notre objectif, le choix des moyens efficaces et pertinents d'évaluation semble essentiel pour l'évaluation du cartilage articulaire et les constructions de tissu cartilagineux par ingénierie tissulaire. A ce titre, en rappelant les moyens actuels, différents moyens d'investigation du cartilage articulaire et des constructions de matrices cartilagineuses sont décrits, avec un point d'honneur sur les techniques de microscopie



innovante, telles que la microscopie confocale Raman, les microscopies multiphotonique (MMP) et à force atomique (AFM) pour leur caractère non-invasif et non destructif, ne nécessitant pas de marquage spécifique des tissus étudiés et capable de déterminer à la fois la composition chimique, les interactions moléculaires et les propriétés biomécaniques sur des échantillons micrométriques à haute résolution.

La seconde partie de notre étude concerne les méthodes expérimentales. Elle vise à décrire notre protocole d'étude et les moyens d'analyse associés. Dans cette partie, nous présentons les types et le traitement des échantillons utilisés et le système d'acquisition et de traitement des données spectrales. A ce stade, il faut préciser que les spectres Raman contiennent diverses bandes Raman qui se chevauchent. De sorte qu'il est difficile d'inspecter et d'interpréter visuellement les données spectrales. En effet, la microscopie Raman fournit des informations spécifiques sur les vibrations moléculaires au sein des groupes fonctionnels, ce qui entraîne des absorptions des bandes caractéristiques dans les spectres qui sont corrélées à la composition. Par conséquence, des méthodes d'analyses chimiométriques, telles que l'analyse de la composante principale (ACP), l'analyse discriminante linéaire (en abrégée LDA en anglais), l'analyse des grappes ou k-means clustering analysis en anglais (KMCA) et la dérivée seconde, ont été décrites et utilisées pour traiter les spectres Raman et faciliter ainsi l'interprétation des données à la lumière des données spectroscopiques référencées, biologiques, anatomiques et physiopathologiques du cartilage articulaire.

La troisième partie rapporte les résultats de nos différentes expérimentations discutées à la lumière de la littérature. Les résultats sont présentés sous forme d'article de revue en cours de soumission et sont axés sur : (1) l'évaluation des mécanismes sous-jacents au développement de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire, notamment sur les processus de dédifférenciation des chondrocytes et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM), (2) caractérisation de la matrice du cartilage articulaire et la cartographie des principaux marqueurs de la matrice cartilagineuse à partir de la Microscopie Confocale Raman et enfin (3) la différenciation entre le cartilage dégradé versus le cartilage non dégradé (normal).

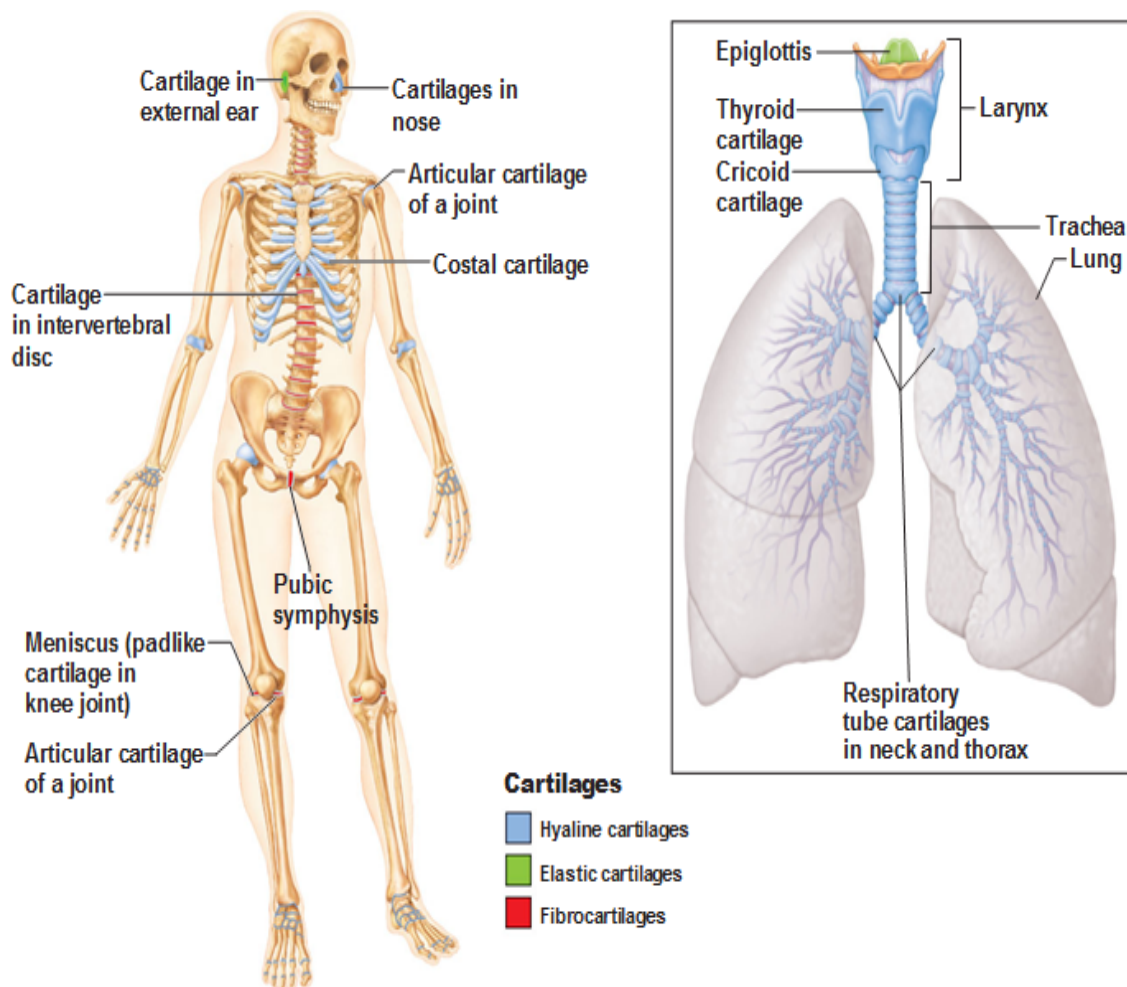
Ces trois parties de notre étude sont en adéquation et démontrent le potentiel de la microscopie confocale Raman en tant technique à haute résolution et non invasive pour sonder et discriminer les caractéristiques biochimiques entre différents types cellulaires, suivre la maturation du cartilage artificiel et identifier de subtiles différences au sein de la matrice du cartilage, essentielles à la compréhension de la pathophysiologie du tissu.

# 1 LE CADRE THEORIQUE ET PROBLEMATIQUE

## 1.1 Cadre théorique

### 1.1.1 Le Cartilage articulaire et sa constitution

Le cartilage est un tissu conjonctif tout comme l'os, présent dans de nombreux sites du corps des vertébrés, y compris les articulations articulaires entre les os, la cage thoracique, l'oreille, le nez, les bronches et les disques intervertébraux (*Figure.1*).



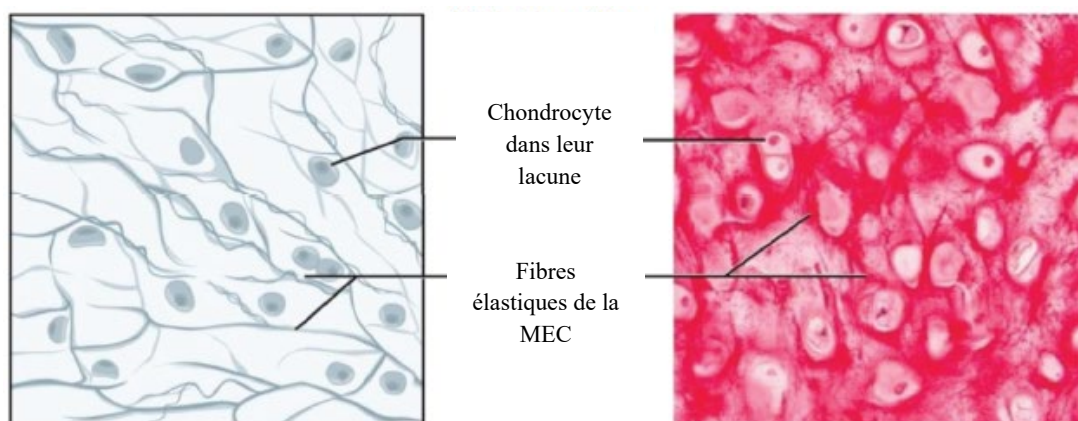
**Figure 1 :** Différentes localisations du cartilage dans le corps humain (source : *Cartilage and Bones* September 27, 2011 <https://antranik.org/cartilage-and-bones/>)

Le cartilage articulaire est un tissu hautement spécialisé dont la fonction principale est de fournir une interface sans frottement entre les os et de dissiper la charge lors de la locomotion. En général, les cartilages du corps peuvent être classés en trois types différents en

fonction des propriétés biochimiques : cartilage élastique, fibreux et hyalin. Bien que tous ces cartilages partagent des caractéristiques générales, ils diffèrent par l'histomorphologie, la composition biochimique et les propriétés biomécaniques. Cependant, il existe une relation intrinsèque et forte entre les différentes fonctions que ces cartilages remplissent dans le corps et les caractéristiques des tissus. Parlant de cartilage articulaire, sa fonction de tissu porteur et dissipateur de stress a un effet direct sur sa composition biochimique, sa structure et son comportement biomécanique, comme en témoignent ses propriétés de traction, de cisaillement et de compression.

#### 1.1.1.1 Le cartilage élastique

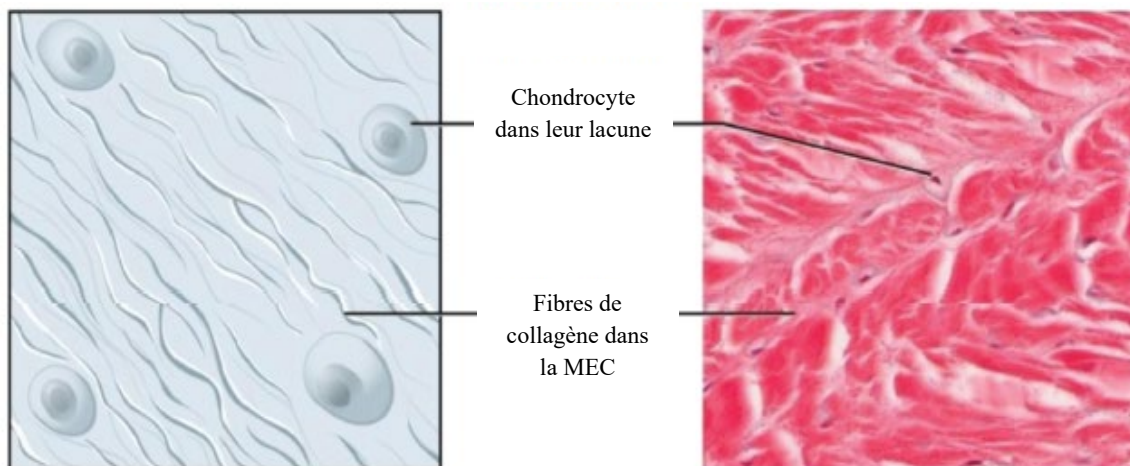
Le cartilage élastique se distingue des autres types de cartilage par une matrice contenant de grandes quantités d'élastine tissées dans un maillage de collagène<sup>17,18</sup>, qui existe sous forme de fibre hautement ramifiée, lui permettant ainsi de conserver la forme de la structure qu'il compose tout en lui assurant une grande flexibilité, comme c'est le cas pour le pavillon de l'oreille externe, le larynx et l'épiglotte. Le cartilage élastique tire son nom de la grande flexibilité présente dans le tissu en raison de la teneur en élastine, mais se développe chez le fœtus à partir d'un précurseur de cartilage hyalin<sup>19</sup>. Les fibres d'élastine peuvent souvent avoir des concentrations suffisamment élevées pour non seulement conférer une couleur jaunâtre au cartilage élastique, mais également empêcher la coloration d'autres composants de la matrice du cartilage élastique (par exemple, le collagène de type II et les glycosaminoglycanes (GAG)). Les chondrocytes du cartilage élastique sont plus nombreux que dans les autres cartilages et sont orientés entre les fibres d'élastine. Une des particularités du cartilage élastique est qu'il est recouvert de périchondre, contrairement aux autres types de cartilages.



*Figure 2 : Cartilage élastique*

### 1.1.1.2 Le fibrocartilage

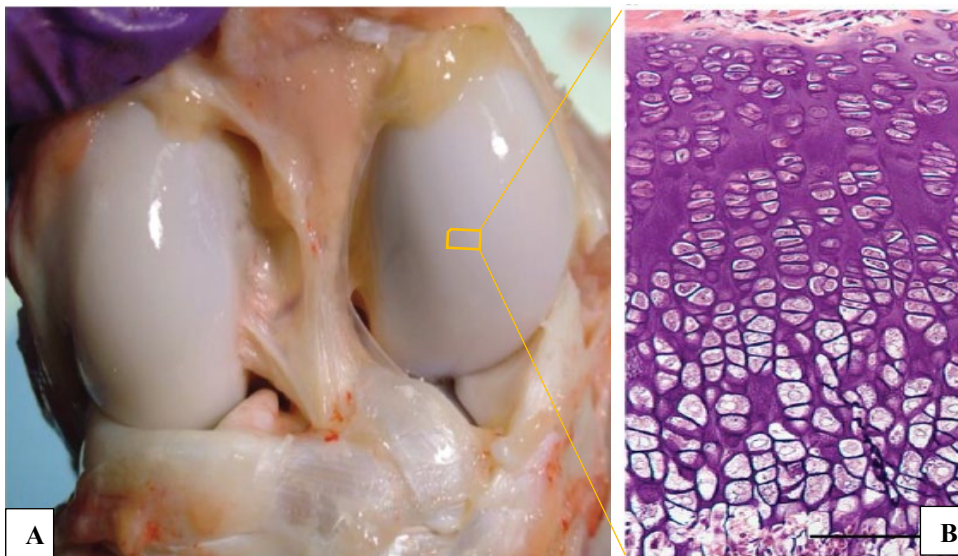
Le fibrocartilage diffère du cartilage hyalin par la présence de grosses fibres de collagène de type I disposées plus ou moins parallèlement dans le sens des contraintes qu'elles subissent et, dans une moindre mesure, de collagène de type II. Ces faisceaux de collagène confèrent une grande capacité à ce type de cartilage pour résister à des contraintes de traction élevées. La teneur en GAG du fibrocartilage est souvent très inférieure à celle du cartilage hyalin. Les chondrocytes du fibrocartilage (fibrochondrocytes) sont dispersés parmi les faisceaux de tissu conjonctif; ce sont ces faisceaux qui aident à absorber les charges mécaniques. Le fibrocartilage se trouve dans le corps au niveau de la symphyse pubienne, de l'anneau fibreux du disque intervertébral, du ménisque du genou <sup>20</sup> et du disque de l'articulation temporo-mandibulaire <sup>21</sup>. Contrairement au cartilage élastique et hyalin, le fibrocartilage manque généralement d'une couverture du périchondre. Dans les stratégies d'ingénierie tissulaire, le fibrocartilage peut constituer un tissu de réparation du cartilage articulaire endommagé bien qu'il ne possède pas les propriétés biomécaniques adéquates pour fonctionner en tant que remplacement du cartilage articulaire à long terme. Cette structure qui se rapproche de celle du tissu conjonctif dense orienté, lui permet de résister à des forces de traction et de compression.



*Figure 3 : Fibrocartilage*

### 1.1.1.3 Le cartilage hyalin

Le cartilage hyalin est le plus représenté dans le corps humain et le mieux caractérisé des différents types de cartilage. Il est plus localisé au niveau des articulations, de la trachée et de la cage thoracique, essentiel pour la respiration, l'ouïe et la locomotion. Sur le plan macroscopique, le cartilage articulaire hyalin apparaît, à l'ouverture d'une articulation, blanc nacré brillant ou légèrement blanc translucide, lisse à l'œil nu, ferme mais légèrement dépressible à la palpation (*Figure 4*). Avec l'âge, il varie d'un blanc bleuâtre à un tissu légèrement jaunâtre-blanc cassé. A la périphérie de l'articulation, il se poursuit par une zone de transition avec la couche fibreuse de la capsule synoviale et avec le périoste épiphysaire. Son épaisseur est variable selon l'articulation ; elle est plus importante aux articulations des membres inférieurs, plus chargées. Elle est maximale sur la rotule où il atteint jusqu'à 7 millimètre (mm). Dans une articulation donnée, l'épaisseur du cartilage est maximale dans les zones supportant le maximum de charges. Les cartilages articulaires sont un peu plus épais chez l'homme que chez la femme, ils ne s'amincissent pas avec l'âge.



*Figure 4 : (A) Image macroscopique du cartilage articulaire des condyles fémoraux bovins juvéniles, démontrant la nature scintillante du cartilage hyalin. (Kyriacos AA et coll, 2016), (B) Image microscopique du cartilage montrant les chondrocytes dans leurs logettes*

La surface du cartilage articulaire joue un rôle important dans la physiologie de ce tissu puisque c'est elle qui reçoit en premier les pressions, c'est elle qui est soumise aux forces de cisaillement. Elle est le filtre sélectif à travers lequel passe les substances nutritives venant du liquide synovial, seule source d'alimentation des chondrocytes, dans des conditions



physiologiques. Elle joue enfin un rôle majeur, avec le fin film du liquide synovial qui la recouvre, dans la lubrification de l'articulation. C'est à son niveau qu'apparaissent les premiers signes histologiques de la désorganisation structurale de l'arthrose. Sur le plan microscopique, le cartilage hyalin est décrit comme un tissu homogène sans vaisseau et sans nerf, dans lequel sont dispersées des cellules (chondrocytes) enchâssées dans des logettes (les chondroplastiques), avec une orientation particulière à mesure qu'on s'éloigne de la surface articulaire.

A l'opposé de la surface, le cartilage est intimement en contact avec l'os sous-chondral dont on distingue bien la structure. Ces cellules vivent en milieu anaérobie et ne que représentent environ 2-10% du volume total du cartilage<sup>22</sup>, seules responsables de la synthèse et du renouvellement de la matrice cartilagineuse.

Le cartilage articulaire hyalin est composé de protéines et de macromolécules spécialisées qui permettent au tissu de fonctionner dans les environnements biomécaniques rigoureux des articulations articulaires, comme le genou, la hanche et l'épaule. Les principales caractéristiques biochimiques comprennent la présence prédominante de collagène de type II et de grandes quantités de protéoglycanes<sup>23</sup>. Les collagènes et les protéoglycanes interagissent avec un environnement fluide chargé pour donner au cartilage articulaire son caractère biomécanique unique.

### **1.1.2 La substance fondamentale du cartilage articulaire**

La matrice du cartilage est constituée d'une matrice extracellulaire composée en majorité de collagène (principalement le type II) qui confère au tissu sa forme et sa résistance et des protéoglycanes (dont le principal est l'aggrécane), assurant une résistance aux contraintes mécaniques<sup>24</sup>. Au voisinage des cellules individuelles, la MEC est organisée en zone immédiatement péricellulaire et en une matrice interterritoriale entre les cellules.

#### **1.1.2.1 La matrice extracellulaire et sa composition**

La matrice extracellulaire est une substance qui existe chez tous les animaux pluricellulaires dans les espaces extracellulaires. Elle constitue la principale composante des tissus conjonctifs. Dans le cartilage articulaire, la MEC est subdivisée en deux compartiments matriciels : matrice territoriale (MT), formant la majeure partie de la MEC et la matrice interterritoriale (MIT) entre les cellules. La MEC est composée en majorité de collagène (50-60% du poids sec), de protéoglycanes (15-30% du poids sec) et d'eau (H<sub>2</sub>O)<sup>25</sup>.

**Tableau I : Composition fractionnelle approximative du cartilage hyalin**<sup>26</sup>

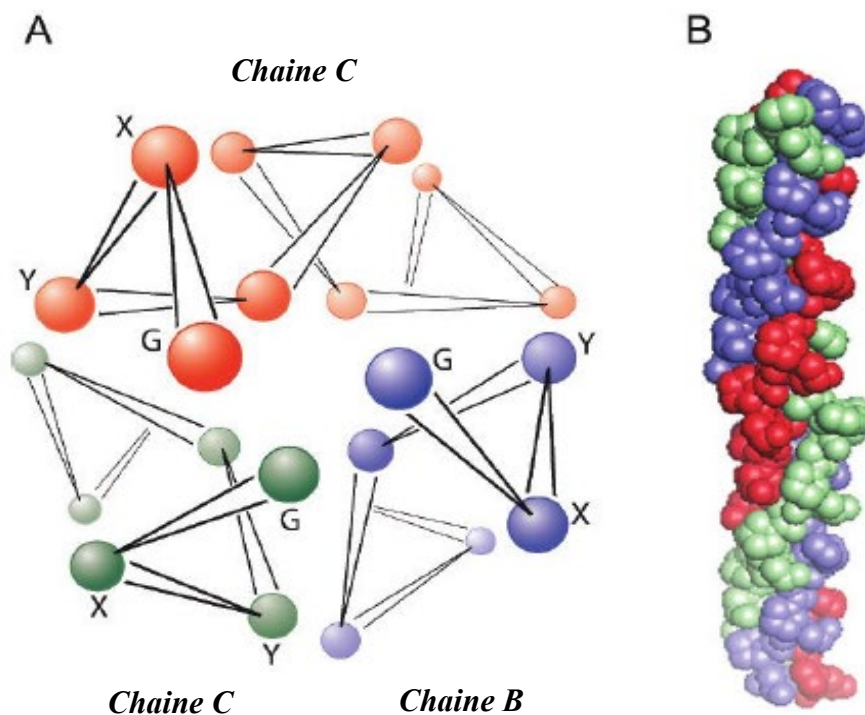
<i>Composants</i>	<i>Fraction (%)</i>
<i>Eau</i>	80
<i>Collagène de type II</i>	10
<i>Protéoglycanes</i>	8
<i>Autres collagènes spécifiques du cartilage (IX, X, XI)</i>	<1
<i>Autres protéines</i>	<1
<i>Sels inorganiques</i>	<1

La majeure partie du collagène est constituée par le collagène de type II (environ 90-95%), fait de fines fibrilles et, des types mineurs VI, IX et XI (ensemble 5%) dans le cartilage minéralisé complété par des quantités mineures de collagène de type X, le collagène typique du cartilage hypertrophique. La nature micro-fibrillaire de la matrice de collagène confère les propriétés de résistance à la traction et la viscoélasticité de ce tissu. Les protéoglycanes, dont la plus importante est l'aggrécane sont impliqués dans la liaison des molécules d'eau et fournissent une résistance à la compression du cartilage et à l'amortissement des chocs. Ils confèrent également au tissu cartilagineux une turgescence élastique et participent aussi à la transmission des signaux, à la différenciation et la prolifération cellulaire.

#### 1.1.2.1.1 Le collagène

Le collagène est la protéine structurale par excellence chez les vertébrés. Chez les mammifères, il s'agit même de la protéine la plus abondante<sup>27,28</sup> puisqu'on la retrouve dans toutes les matrices extracellulaires. Cette ubiquité du collagène provient de sa capacité à former divers assemblages hiérarchisés à partir d'une seule et même molécule (tropocollagène). La superfamille des collagènes est constituée des protéines présentant une séquence peptidique caractéristique. Ils sont constitués de séquences d'acides aminés répétitives (glycine, proline, hydroxyproline, etc.) et présentent une structure caractéristique en triple hélice. La superfamille des collagènes compte près de 23 types de collagène, assemblés à partir de 41 chaînes  $\alpha$  génétiquement distinctes et subdivisée en deux classes :

- Les collagènes fibrillaires (collagène I, II, III, V, XI) qui s'assemblent en fibrilles puis en fibres,
- Les collagènes des membranes basales, (collagène IV).



**Figure 5 :** Structure triple hélicoïdale du collagène. (A) Vue de l'axe moléculaire ( $\alpha$ -carbones uniquement), montrant les chemins des chaînes polypeptidiques individuelles et les emplacements des résidus dans les triplets Gly-X-Y (G = Gly; de (Beck et Brodsky, 1998), avec permission). (B) Vue de côté (molécule inclinée vers le lecteur en haut; représentation remplissant l'espace), montrant la torsion hélicoïdale à droite <sup>29</sup>

Le collagène de type II est un composant majeur du cartilage assurant l'intégrité structurelle du tissu. Le procollagène de type II est synthétisé sous deux formes (IIA et IIB) générées par épissage différentiel de l'exon 2 dans le transcrit du gène primaire. La forme IIA contient un grand domaine (69 amino-acides) riche en cystéine du propeptide NH<sub>2</sub>-terminal, tandis que la forme IIB n'en contient pas. Dans une étude réalisée par Sandell et ses collaborateurs (1991), ils ont pu montrer que ces deux formes étaient exprimées spatialement au cours du développement et une distribution distincte au cours de la chondrogenèse avec le type IIB principalement exprimé par les chondrocytes, tandis que la forme IIA est exprimée dans les cellules chondroprogénitrices (cellules entourant le cartilage des préchondrocytes) <sup>30</sup>. Il apparaît clairement que la localisation cellulaire distincte des deux procollagènes de type II différents indique qu'ils peuvent jouer des rôles fonctionnels différents dans des tissus distincts.

Dans le cartilage articulaire, 90 à 95% du collagène est de type IIB. Il est considéré, avec l'aggrécane, comme le principal marqueur du phénotype chondrocytaire et est l'un des



collagènes fibrillaires <sup>31</sup>. Une molécule de collagène de type II est composée de trois chaînes,  $\alpha 1$ , associées pour former une triple hélice (*Figure 5*). Après la synthèse, les molécules de collagène de type II se rejoignent pour former des fibrilles qui se rejoignent ensuite par des ponts covalents pour former des fibres de collagène. Ces fibres sont organisées en un réseau maillé serré qui s'étend à travers le tissu et fournit au cartilage articulaire sa rigidité et sa résistance à la traction, et contribue également à la cohésion tissulaire en piégeant mécaniquement les grandes PGs. L'orientation des fibres de collagène varie à travers la profondeur du cartilage articulaire, la zone superficielle contenant des fibres disposées tangentiellement, la zone profonde contenant des fibres orientées radialement et la zone médiane ayant à la fois une structure en arcade et des fibres orientées de façon aléatoire qui forme la transition entre les autres zones <sup>32</sup> Le collagène de type II interagit avec les chondrocytes par l'intermédiaire de membres de la famille des intégrines et du récepteur du collagène non-intégrine, le récepteur du domaine discoïdine-2 (DDR2; un récepteur tyrosine kinase; examiné par *Leitinger et Hohenester (2007)* <sup>33</sup>. Il est nécessaire à la survie des cellules, comme le démontre l'utilisation de souris nulles Col2a1 <sup>34</sup>.

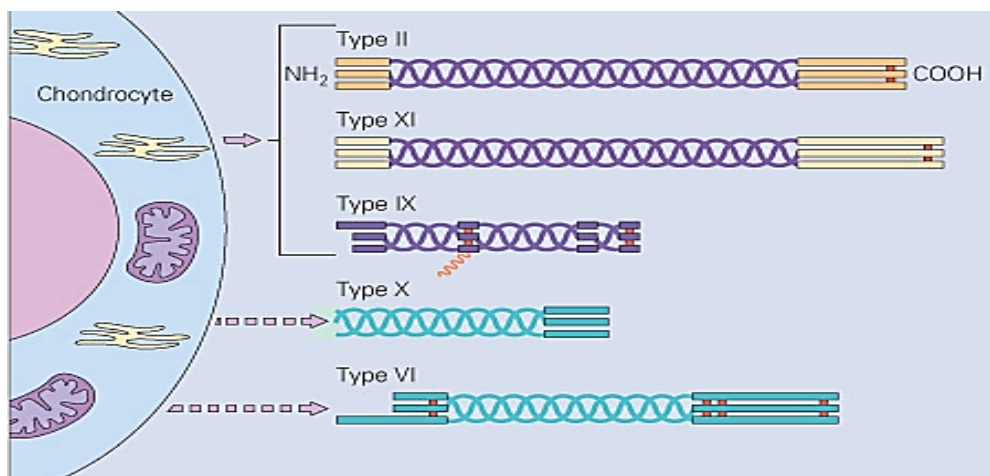


Figure 6 : Les différents types de collagènes du cartilage

Dans le cartilage, il existe également d'autres types de collagène fibrillaire et globulaire, tels que les types V, VI, IX et XI, dits mineurs, car constituant seulement 10% du tissu de collagène. Le collagène non fibrillaire de type VI, plus abondamment retrouvé dans la matrice péricellulaire, présente des concentrations péricellulaires élevées par rapport à la matrice extracellulaire globale et interagit directement avec le chondrocyte via ses interactions avec un

grand nombre de molécules matricielles. Les molécules de collagène de type IX sont liées par covalence aux fibres de collagène de type II <sup>35</sup> et connectent le réseau maillé des fibrilles de collagène aux PGs. Les molécules de collagène de type XI sont localisées au sein des fibres de collagène de type II et assurent la cohésion des fibres. Ces collagènes dont le rôle est incomplètement connu, semble cependant capital dans le maintien de la structure entre les PGs et le collagène de type II, ainsi que dans la limitation de la croissance du collagène de type II. Ils semblent également jouer un rôle dans le développement fœtal <sup>36,37</sup>, leur nombre diminuant au cours de la vie adulte. Les collagènes de types IX et XI sont présents à la surface des chondrocytes et lient les cellules à la matrice environnante. Le type IX joue un rôle particulier dans la régulation du diamètre des fibres de type II et permet probablement la formation des fines fibres de collagène présentes dans la matrice péricellulaire. Le type X est le plus répandu dans la plaque de croissance et est nécessaire à l'ossification endochondrale <sup>38</sup>. Cependant, on ne le trouve généralement pas dans le cartilage articulaire normal, sauf dans l'arthrose. A côté de ceux-ci, on trouve aussi les collagènes de type V, XII et XIV, mais en très faible quantité.

#### 1.1.2.1.2 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont un sous-groupe de glycoprotéines contenant des chaînes polysaccharidiques spécialisées liées, appelées glycosaminoglycanes (GAG), qui sont de longs polymères linéaires constitués de répétitions disaccharidiques spécifiques (Lodish B et coll, 2005). Les PG sont des molécules qui consistent en un axe protéique liant une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycane (GAG) <sup>39</sup>. Les chaînes GAG sont de longues chaînes de charges négatives (groupes carboxylate ou sulfate), qui repoussent les autres charges négatives et attirent les cations. La plupart de ces chaînes latérales glucidiques sont constituées de chondroïtine sulfate (CS) et de sulfate de kératane (KS) <sup>40</sup>. A l'extrémité N-terminale, il existe deux domaines globulaires (appelés G1 et G2), le domaine G1 se liant de manière non covalente à l'hyaluronane (HA). Cette liaison est stabilisée par une protéine compagnon appelée protéine de liaison protéoglycane, qui contient 345 acides aminés <sup>41</sup>. Le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératane sont les chaînes les plus courantes. Le sulfate de chondroïtine est un glycosaminoglycane relativement spécifique du cartilage et est composé d'environ 25 à 30 dimères de sucre (N-acétyl-galactosamine et acide glucuronique).

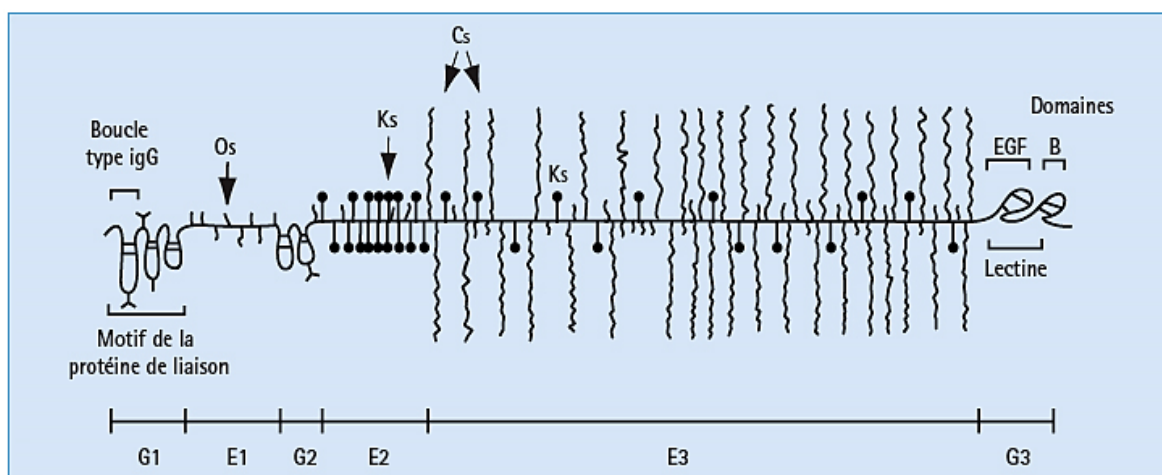
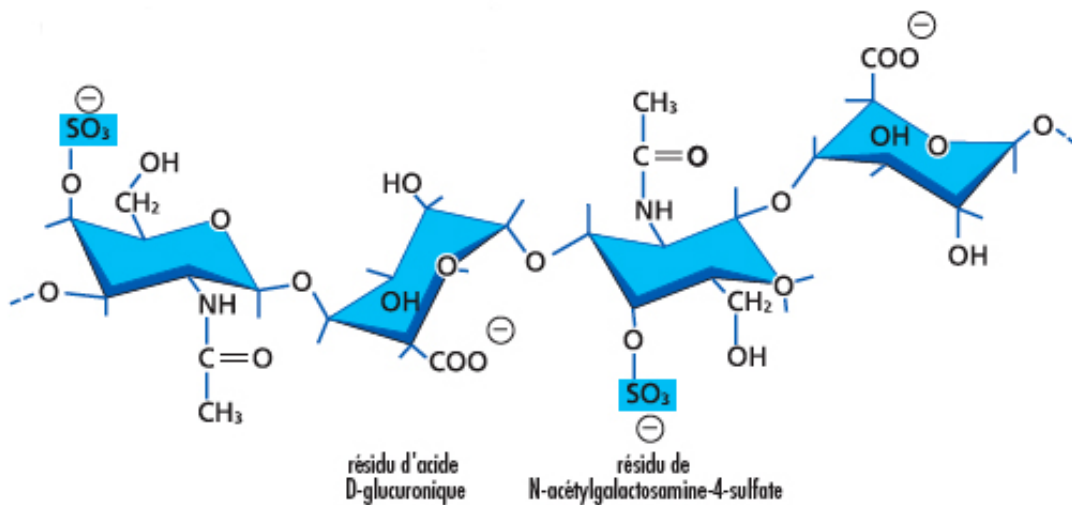


Figure 7 : Structure d'un protéoglycane

Le sulfate de kératine est un disaccharide récurrent de la N-acétyl-glucosamine et du galactose, plus petit (5 à 6 dimères) et plus largement distribué dans le corps que le sulfate de chondroïtine. Par leur capacité à se lier aux facteurs de croissance, ces molécules régulent la biodisponibilité, la stabilité et l'activité biologique, et jouent des rôles importants en tant que modulateurs de la prolifération et de l'adhésion cellulaire. Les PG extracellulaires sont principalement représentées par l'aggrécane<sup>42</sup>, qui a un poids moléculaire élevé (entre 1500 et 4000 kDa). Une centaine de molécules d'aggrécane peuvent se lier à un polymère d'acide hyaluronique, via la protéine de liaison (LP), formant un agrégat moléculaire de masse moléculaire élevée. Les propriétés biologiques d'Aggrécane reposent en partie sur son caractère anionique et en partie sur les multiples propriétés interactives de ses différents domaines avec la matrice extracellulaire (MEC) et les composants de surface de la membrane. Les grands agrégats confèrent principalement une résistance à la compression en raison de leur nature hydrophile, car ils attirent une grande quantité d'eau dans l'espace intra et intermoléculaire. D'autres PGs sont bien caractérisés et comprennent la décorine, la fibromoduline, le syndécane et le biglycane<sup>43</sup>. Leurs rôles sont liés à leur interaction avec d'autres composants de la matrice (fibronectine, collagène, cytokines, TGF $\beta$ , etc.) dans la régulation de la stabilité, de la biodisponibilité et de l'activité biologique<sup>44</sup>.

Les protéoglycans représentent environ 40% du poids sec du cartilage et présentent une remarquable hiérarchie structurelle. Le protéoglycane prédominant dans le cartilage est l'Aggrécane. Il représente 50 à 85% de la totalité des protéoglycans du cartilage articulaire<sup>45,46</sup>, en fonction de l'origine et de l'âge. Il s'agit d'une grosse molécule d'agrégation qui s'assemble avec l'hyaluronane en de très grands agrégats, illustrant les structures complexes que

les protéoglycanes forment parfois. L'épine dorsale de l'agrégat de protéoglycanes du cartilage est une longue molécule d'hyaluronane à laquelle de multiples molécules d'aggrécane sont liées de manière étroite mais non covalente. Ces agrégats confèrent au cartilage ses propriétés uniques de type gel et sa résistance à la déformation, indispensables à la répartition de la charge dans les articulations portantes. Outre l'aggrécane, le cartilage articulaire contient d'autres protéoglycanes tels que la décorine, le perlécane, le lumicane, le biglycane et la fibromoduline



**Figure 8 :** Structure d'un glycosaminoglycane (GAG). Les GAG ont des charges négatives sur leurs sulfates carboxylés et peuvent ainsi capter les ions  $Ca^{++}$  et  $Na^{+}$  qui, eux-mêmes, attirent l'eau. Ces protéoglycanes constituent un véritable gel hydrophile qui occupe un volume considérable par rapport à son contenu glucidique et l'eau constitue ainsi 70-75 % du poids humide du cartilage articulaire adulte.

#### 1.1.2.1.3 Le rôle de l'eau au sein du tissu cartilagineux

En volume, l'eau est toujours le composant le plus important et joue un rôle central dans les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. L'absorption d'eau dans les tissus est principalement influencée par les molécules de protéoglycanes emprisonnées dans la structure entre les fibres de collagène de la MEC. Ce protéoglycane contient des molécules de GAG poly-anioniques qui absorbent des ions de sels du liquide synovial, ce qui entraîne une pression osmotique élevée dans les interstices de la MEC. La compartimentation du contenu ionique dans la MEC tissulaire conduit à un équilibre de Gibbs-Donnan <sup>47</sup>, responsable de la forte pression de gonflement du cartilage articulaire. Les fibres de collagène ont une association

moins prononcée avec l'eau. Lorsque le tissu est porteur, de l'eau s'échappe des interstices de la MEC et, à son tour, l'affinité des molécules de GAG pour l'eau augmente (en raison d'une pression osmotique croissante)<sup>46</sup>. La pression osmotique élevée provoque le retour du tissu à sa forme initiale lorsque le cartilage est déchargé et la propriété de traction élevée du collagène résiste à la dilatation de la MEC. L'eau est principalement associée aux molécules d'aggrécane ou se trouve dans les interstices de la MEC en tant que composant en vrac. L'eau représente 65 à 80% de la masse du cartilage articulaire, la proportion la plus élevée se trouvant près de la surface. La forte teneur en eau du cartilage articulaire offre des propriétés d'incompressibilité et, associée à son organisation structurale caractéristique, facilite ses propriétés de protection contre les contraintes. En spectroscopie Raman, les modes de vibration d'étirement qui subissent une liaison hydrogène avec de l'eau apparaissent à une fréquence inférieure à celle des modes d'étirement qui ne sont pas impliqués dans la liaison de l'hydrogène, en raison d'une réduction de la constante de force entre une liaison donnée lors de l'engagement d'une liaison hydrogène dans l'eau. Alors que les modes de courbure apparaissent à une fréquence plus élevée lorsqu'ils sont impliqués dans la liaison hydrogène par rapport aux modes de courbure non liés à l'hydrogène, étant donné qu'il y a une diminution de la masse effective d'un atome d'hydrogène. De plus, le microenvironnement des groupes fonctionnels qui produisent ces modes de vibration peut changer lors de l'hydratation, ce qui entraîne l'apparition de modes de vibration différents dans les spectres Raman. Ainsi, la spectroscopie Raman fournit des informations structurales relatives à l'association de groupes moléculaires avec de l'eau.

#### 1.1.2.2 Le chondron

Un chondron (typique) se compose d'un chondrocyte et de sa matrice péricellulaire (MPC) environnant. La combinaison du chondrocyte et de cette matrice péricellulaire a été appelée le chondron et représente la principale unité structurale, fonctionnelle et métabolique du cartilage articulaire<sup>48,49</sup>, avec des différences morphologiques qui varient selon l'architecture zonale du collagène<sup>50</sup>. Le terme «chondron» a été inventé il y a près d'un siècle, mais c'est une série d'études réalisées par Poole qui a introduit les chondrons à la biologie du cartilage<sup>51</sup>. L'une de ses fonctions est de protéger le chondrocyte d'une déformation sévère sous charge<sup>52</sup>.

#### 1.1.2.2.1 La matrice péri-cellulaire (MPC)

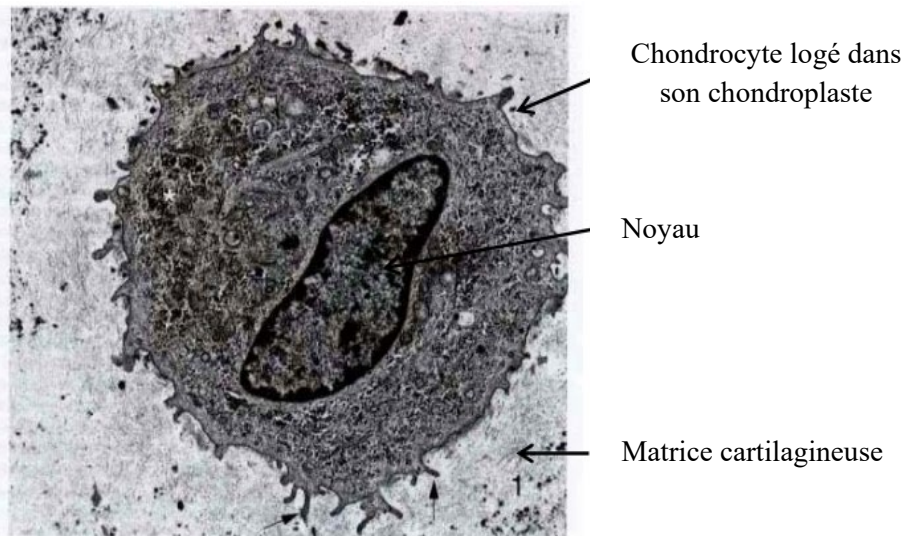
Dans le cartilage, la MPC est mieux étudiée sous forme de chondrons. Dans le cartilage articulaire, les chondrocytes sont entourés d'une région étroite appelée matrice péri-cellulaire (MPC) qui, avec la cellule incluse, est appelée chondron <sup>49</sup>. Cette région se distingue biochimiquement, structurellement et mécaniquement de la matrice extracellulaire (MEC) <sup>53</sup>. La matrice péri-cellulaire est caractérisée par le fait qu'elle présente de fines fibres de collagène (10-15 nm de diamètre); de concentrations élevées de protéoglycanes et d'hyaluronane; et la présence de fibronectine <sup>54</sup>, de collagène de types VI et IX, de protéine de liaison, de biglycane, de décorine et de laminine <sup>52,55</sup>. Cependant, les composants qui s'assemblent dans la macromolécule d'aggrégane restent séparés, ce qui suggère que la matrice péri-cellulaire pourrait jouer un rôle dans l'assemblage de la macromolécule. Le collagène de type IX régule le diamètre des fibres de type II <sup>56</sup> et permet probablement la formation des fines fibres de collagène présentes dans la matrice péri-cellulaire. Le collagène de type VI, composant clé de la matrice péri-cellulaire, présente des concentrations péri-cellulaires élevées par rapport à la matrice extracellulaire globale et interagit directement avec le chondrocyte. La fonction exacte de la matrice péri-cellulaire n'est pas bien comprise, même si des preuves solides indiquent qu'elle contribue à protéger l'intégrité physique des chondrocytes articulaires lors du chargement en compression <sup>57</sup> et qu'elle fournit un emplacement confiné pour l'assemblage des composants de la matrice. De nombreuses études antérieures suggèrent que les propriétés mécaniques de la MPC, par rapport à celles du chondrocyte et de la matrice extracellulaire (MEC), pourraient influencer de manière significative sur les environnements contrainte-déformation, physicochimiques et à écoulement fluide de la cellule.

#### 1.1.2.2.2 Les chondrocytes

Les chondrocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses différenciées au cours du développement embryonnaire, et sont répartis de façon éparse dans la MEC. Ils ne représentent que 10% du volume du cartilage articulaire. Les chondrocytes différenciés suivent un processus programmé de maturation cellulaire, qui est maintenu, à un degré variable, selon les groupes d'âge et les sites anatomiques <sup>58</sup>. Ces variations dans le comportement biologique des chondrocytes conduisent à la production de différents types de cartilage caractérisés par des différences de fonction marquées. Par exemple dans le cartilage à plaques de croissance, les chondrocytes ont un potentiel de prolifération considérable et maintiennent un très haut taux de renouvellement de la protéine matricielle, tandis que dans le cartilage articulaire, notamment



chez l'adulte, les chondrocytes se divisent plus lentement et, produisent de grandes quantités de protéines matricielles, qui s'accumulent de manière complexe dans la matrice extracellulaire <sup>22,59</sup>. La couche superficielle est la plus cellulaire et le nombre de cellules diminue avec l'âge du patient <sup>22,58,59</sup>. Ces cellules fonctionnent principalement en anaérobie. Leur fonction principale est de produire des molécules en remplacement de la matrice dégradée, et maintenir ainsi l'homéostasie de la MEC <sup>60</sup>.



**Figure 9 :** Chondrocyte de cartilage articulaire en microscope électronique (ME)

En microscopie électronique, les chondrocytes se présentent sous une forme sphérique ou ovoïde, et mesurent environ 20 à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre <sup>58</sup>. Ils sont noyés dans la matrice cartilagineuse sans contact intercellulaire direct. Les chondrocytes possèdent un noyau central développé, des mitochondries et des vacuoles lysosomiales. Le réticulum endoplasmique des cellules et l'appareil de Golgi sont prédominants. En outre, beaucoup contiennent des réserves de lipides et de glycogène ainsi que des vésicules de sécrétion. Certains chondrocytes ont des cils qui s'étendent de la cellule à la MEC et sont supposés jouer un rôle dans la détection de l'environnement mécanique de la cellule, car les chondrocytes sont connus pour modifier les propriétés de la matrice en réponse au chargement <sup>61</sup>. Les chondrocytes ne migrent pas et se multiplient peu ou pas dans un cartilage normal. En situation physiologique, les chondrocytes maintiennent un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des protéines structurales de la matrice cartilagineuse. Cette homéostasie est assurée par de nombreux facteurs : contraintes mécaniques <sup>62</sup>, facteurs de croissance tels que le *transforming growth*

*factor* (TGF) bêta, le *fibroblast growth factor* (FGFb), l'*Insulin-like growth factor* (IGF). Le rôle de ces différents facteurs est de réguler les synthèses chondrocytaires des :

- protéines matricielles (collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines de structure);
- protéases (métalloprotéases, aggrécases, cathepsines);
- inhibiteurs de protéases (inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases, activateur du plasminogène).

Il faut noter qu'il s'agit d'un des rares tissus à fonctionner en hypoxie. Il existe un gradient hypoxique qui varie de 10 % de teneur en oxygène en surface à 1 % en profondeur. Il a été toutefois montré que les chondrocytes des couches les plus superficielles pouvaient avoir en partie un fonctionnement aérobie par diffusion des gaz (O<sub>2</sub>) présents dans le liquide synovial.

### 1.1.2.3 Interactions entre les chondrocytes et la matrice <sup>61</sup>

Les propriétés biologiques et mécaniques uniques du cartilage articulaire dépendent de la conception du tissu et des interactions entre les chondrocytes et la matrice qui maintiennent le tissu. Les chondrocytes forment le cadre macromoléculaire de la matrice tissulaire à partir de trois classes de molécules : les collagènes, les protéoglycanes et les protéines non-collagéniques. Les collagènes de types II, IX et XI forment un maillage fibrillaire qui donne au tissu sa forme, sa rigidité et sa résistance à la traction. Le collagène de type VI fait partie de la matrice entourant immédiatement les chondrocytes (appelée matrice péricellulaire) et peut aider les chondrocytes à se fixer à la structure macromoléculaire de la matrice. Les grands protéoglycanes agrégateurs (aggrécans) confèrent au tissu sa rigidité à la compression et sa résilience et contribuent à sa durabilité. Les petits protéoglycanes, y compris la décorine, le biglycane et la fibromoduline, se lient à d'autres macromolécules matricielles et contribuent ainsi à stabiliser la matrice. Ils peuvent également influencer la fonction des chondrocytes et lier les facteurs de croissance. La matrice protège les cellules contre les dommages mécaniques dues à une utilisation normale de l'articulation, détermine les types et les concentrations de molécules qui atteignent les cellules et aide à maintenir leur forme et le phénotype chondrocytaire. La matrice agit également comme un transducteur de signal pour les chondrocytes. Par exemple, la compression de la surface articulaire déforme la matrice et peut déformer directement les chondrocytes. Elle transmet aux chondrocytes des signaux résultant de la charge mécanique de la surface articulaire et les chondrocytes répondent à ces signaux en altérant la matrice.



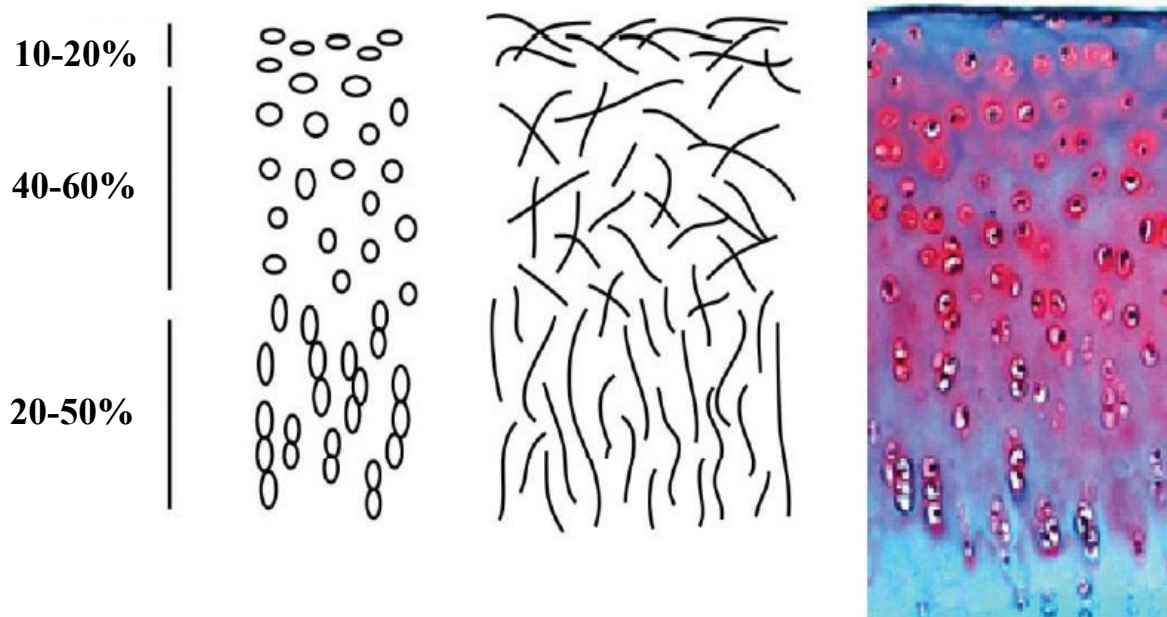


facteurs de croissance. Les altérations peuvent augmenter la probabilité de dégénérescence du cartilage. Des études expérimentales ont montré qu'une diminution anormale persistante de la charge articulaire ou de l'immobilisation d'une articulation diminue la concentration de protéoglycanes dans le cartilage articulaire et leur degré d'agrégation et modifie les propriétés mécaniques du cartilage. En tout état de cause, le chargement peut également provoquer des changements persistants dans l'organisation moléculaire de la matrice, modifiant la réponse des chondrocytes à un chargement ultérieur. Ainsi, la matrice peut non seulement transduire et transmettre des signaux, mais elle peut également enregistrer l'historique de chargement du tissu et modifier la réponse des cellules sur la base de l'historique de chargement.

### 1.1.3 Organisation zonale

Le cartilage articulaire présente une composition tissulaire stratifiée, une organisation zonale, une surface lisse et un ancrage ferme à l'os sous-chondral, qui contribuent à sa capacité unique à supporter des charges articulaires, retenir l'eau, se déformer et rebondir sous un mouvement glissant <sup>64</sup>. Le cartilage articulaire est connu pour être inhomogène à la fois dans sa morphologie interne et dans la distribution de ses composants moléculaires à travers le tissu <sup>65,66</sup>. Il peut être divisé en trois zones (superficielle, moyenne et profonde) en fonction des différences entre la morphologie de la matrice et la biochimie. Dans chaque zone, il y a trois territoires distincts: la cellule, la région péricellulaire (MPC), la région territoriale (MT) et la région interterritoriale (MIT). Les matrices territoriales et interterritoriales forment la matrice extracellulaire (MEC). Les régions péricellulaires et territoriales fournissent des moyens pour la fixation des chondrocytes à la MEC et la protection des cellules pendant le chargement.

De façon particulière, il existe une distribution variable du collagène et de l'aggrécane avec une profondeur allant de la surface synoviale à la section transversale de l'interface cartilage-os. La région péricellulaire contient presque exclusivement des protéines de liaison non collagéniques. Une partie de la région territoriale est composée de fibrilles de collagène qui suivent l'enveloppe péricellulaire, mais peuvent s'étendre pour englober deux chondrocytes ou plus. Plus loin des cellules, le collagène territorial est moins aligné et les fibrilles se croisent pour former une structure en panier autour du ou des chondrocytes. La région interterritoriale est marquée par une augmentation du diamètre des fibrilles et de l'orientation des fibres de manière plus parallèle. Cette région est principalement responsable des propriétés mécaniques du tissu <sup>61</sup>.



**Figure 11** : Cartilage articulaire avec son organisation interne : les cellules (à droite) et les fibres de collagène (au milieu) sont organisées dans le cartilage en zones superficielles, moyennes et profondes, constituées respectivement de 10 à 20%, 40 à 60% et 20 à 50% de la profondeur globale des tissus.

#### 1.1.3.1 Zone superficielle

La zone superficielle ou tangentielle du cartilage articulaire comprend les 10 à 20% du tissu. C'est la zone la plus mince et est composée de deux couches distinctes. Une feuille acellulaire composée principalement de fibres de collagène de petit diamètre et densément tassées, orientées parallèlement à la surface du cartilage <sup>67</sup>. Au fond de celle-ci, la deuxième couche est composée de chondrocytes atténués dont les grands axes sont parallèles à la surface articulaire. La matrice contient plus de collagène et une teneur relativement faible en protéoglycanes, ainsi qu'une faible perméabilité <sup>65</sup>, ce qui permet aux forces de compression de se redistribuer radialement à travers le cartilage <sup>68</sup>. Cette zone de cartilage articulaire est responsable de la croissance apparente et semble contenir des cellules progénitrices. Les cellules de la zone superficielle sécrètent des protéines spécialisées, telles que la protéine de la zone superficielle (SZP) censées améliorer les propriétés d'usure et de friction du tissu <sup>69</sup>. Il existe également de grandes quantités de fibronectine et d'eau. L'exsudation des fluides et les contraintes de compression s'alignent avec le cisaillement, ce qui est directement lié à la distribution des fibrilles de collagène dans la zone. La zone superficielle est également importante pour la résistance à la compression du tissu et éventuellement pour l'isolement du cartilage du système immunitaire <sup>61,70</sup>.

#### 1.1.3.2 Zone de transition ou intermédiaire

La zone moyenne, ou zone de transition, occupe environ 40 à 60% de l'épaisseur totale du tissu. La zone médiane comprend des chondrocytes sphériques disposées de manière aléatoire et se caractérise par des fibrilles de collagène de type II plus grandes, plus de protéoglycanes et moins de collagène et d'eau que dans la zone précédente. Les fibres de collagène de cette région présentent une structure en arcade parsemée de fibres orientées de manière aléatoire <sup>71</sup>. La teneur en protéoglycanes atteint son maximum dans la zone médiane. Les fibrilles interterritoriales sont alignées de manière oblique ou aléatoire sur la surface articulaire, et non parallèles comme dans la zone superficielle <sup>61,70</sup>.

#### 1.1.3.3 Zone radiale ou profonde

La zone profonde, comprenant 20 à 50% de l'épaisseur totale, est la dernière couche de tissu purement hyalin avant d'atteindre l'os. Sa structure en collagène est caractérisée par de grosses fibres formant des faisceaux orientés perpendiculairement à la surface articulaire et ancrées dans l'os sous-chondral sous-jacent <sup>65</sup>. La teneur en protéoglycanes est beaucoup plus basse que dans la zone moyenne <sup>72</sup> et la densité cellulaire est également la plus faible des trois zones cartilagineuses <sup>73</sup>. Les cellules de la zone profonde se regroupent souvent dans une organisation en colonnes. Elles sont légèrement allongées et orientées dans la direction des fibres de collagène, perpendiculairement à la surface articulaire. Ces cellules présentent une activité synthétique élevée dix fois supérieure à celle des chondrocytes de la zone superficielle. De plus, dans cette zone, l'orientation des fibres interterritoriales change à nouveau, de sorte qu'elles sont maintenant alignées perpendiculairement à la surface de l'articulation. Les fibres s'étendent jusque dans la zone de démarcation, une ligne basophile de composition inconnue qui indique le début du tissu calcifié <sup>61,70</sup>. Bien que le débit de fluide dans cette zone soit relativement faible, des forces de cisaillement importantes sont ressenties entre les types de tissus adjacents lors des contacts des surfaces articulaires, le cartilage ne pouvant se dilater contre le tissu osseux.

#### 1.1.3.4 Ligne de démarcation et la zone cartilagineuse calcifiée

La mince zone cartilagineuse calcifiée appelée est une ligne de ciment minéralisé délimitant l'interface cartilagineuse non calcifiée et calcifiée <sup>74</sup>. Elle sert de transition entre le cartilage hyalin mou et l'os et, les chondrocytes sont élargis mais très rares dans cette région.

Comme pour les autres constituants, la concentration en protéoglycanes dans le cartilage articulaire est la plus faible en surface et maximale autour des chondrocytes dans la zone profonde <sup>75</sup>, ce qui peut être démontré par une coloration plus dense à l'hématoxyline bleue autour des lacunes. Une importante contrainte de cisaillement peut être produite dans cette zone en raison de l'interface entre le cartilage mou et un os beaucoup plus ferme <sup>76</sup>. Les chondrocytes ici sont plus petits, avec presque pas de réticulum endoplasmique. À certains endroits, ils semblent complètement entourés de MEC calcifiée, indiquant qu'ils ont très peu d'activité métabolique <sup>61,70</sup>. Dans la couche cartilagineuse calcifiée, les chondrocytes sont au repos, moins nombreux, produisent du collagène de type X et expriment la phosphatase alcaline. Sous cette région du cartilage se trouve l'os sous-chondral, qui constitue le point d'ancrage ultime du cartilage dans son ensemble.

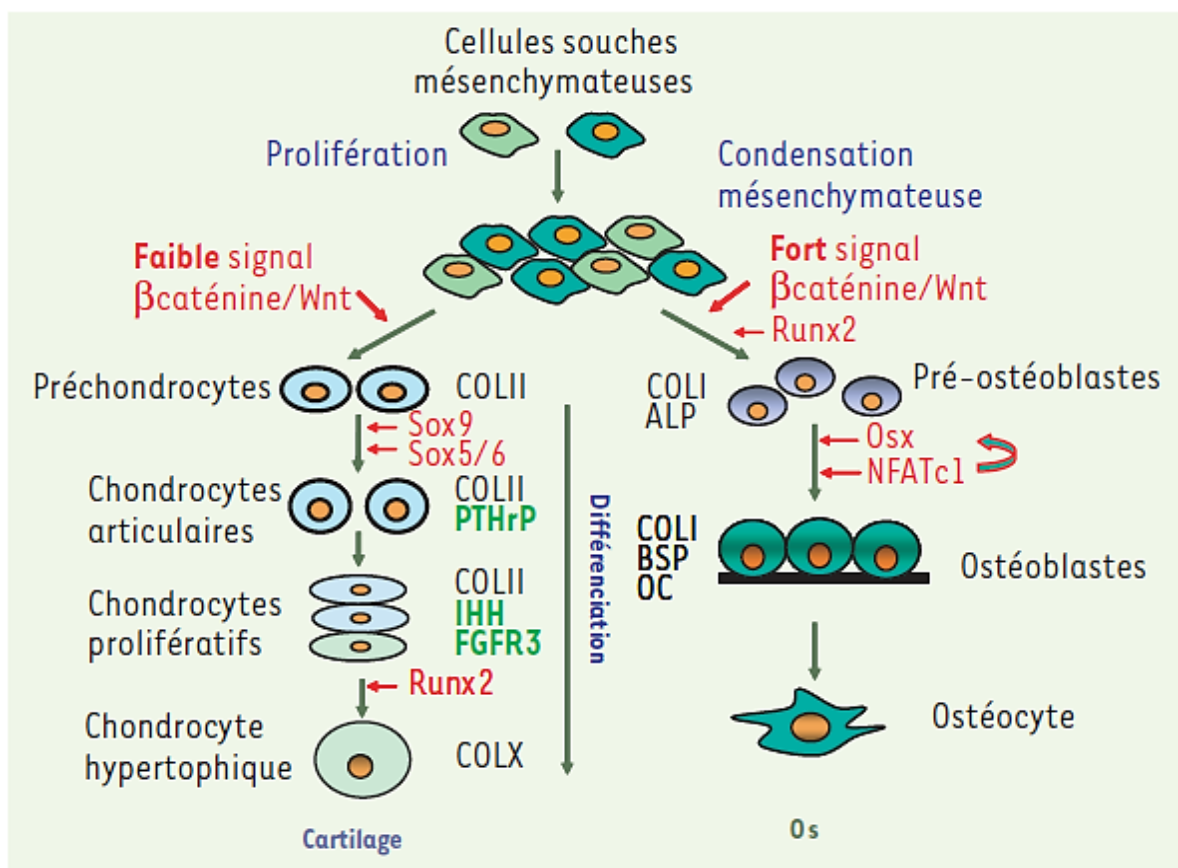
#### 1.1.4 Développement du cartilage

La compréhension de l'origine et du développement des tissus est au cœur d'une pratique efficace en ingénierie tissulaire <sup>77</sup>. En effet, selon les idées reçues et largement acceptée, la régénération des tissus naturels récapitule les processus de développement <sup>78</sup>. De ce fait, une étude embryologique peut donner un aperçu des processus et des modèles de régulation qui régissent le type et la fonction des tissus, en plus de jeter les bases d'une compréhension de la dégénérescence et des dommages observés dans les tissus du corps humain. La chondrogenèse se produit à la suite de la condensation des cellules mésenchymateuses, qui expriment les collagènes I, III et V et la différenciation cellulaire des chondroprogéniteurs avec l'expression de collagènes II, IX et XI spécifiques du cartilage. Un milieu d'hormones et de facteurs paracrines régit une interaction complexe de prolifération et de différenciation des chondrocytes, et le processus peut être divisé en cinq étapes, les trois premières étant principalement cruciales pour la formation du cartilage <sup>79</sup>.

La différenciation se poursuit et s'accompagne d'un accroissement de la taille des cellules qui deviennent hypertrophiques. La zone d'hypertrophie, dont la taille varie au cours du développement fœtal, serait, selon certains auteurs, le moteur essentiel de la croissance osseuse <sup>80</sup>. L'un des épicycles du développement du cartilage squelettique est la plaque de croissance qui produit les os longs via le gabarit du cartilage au cours d'un processus appelé ossification endochondrale. Les chondrocytes localisés à l'extrémité de l'épiphyse sont immatures et définissent la zone de réserve. Au fur et à mesure que progresse la condensation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes, il devient possible d'identifier certaines zones

correspondant à des sous-populations de chondrocytes à différents stades de différenciation. Après cette étape, le profil d'expression des cellules change et le collagène de type X et la fibronectine sont sécrétés, ce qui permet la minéralisation par infiltration de carbonate de calcium et d'ostéoblastes pour la formation d'os. L'infiltration vasculaire ouvre la voie à la différenciation terminale et au développement osseux, entraînant l'apoptose des chondrocytes et la différenciation ostéoblastique (Figure 12). Il est important de noter que ce processus est spécifique aux régions articulaires des os et est suivi du remplacement éventuel par du tissu osseux.

En somme, la chondrogenèse est un processus étroitement contrôlé dans lequel plusieurs facteurs régulent les stades discrets du programme de différenciation. La compréhension des mécanismes d'engagement cellulaire et de la différenciation ultérieure en une lignée particulière est importante dans le développement de traitements thérapeutiques des lésions squelettiques basées sur des techniques de transplantation des CSMs



**Figure 12 :** Formation et régulation par des facteurs transcriptionnels des lignées chondrocytaire et ostéoblastique<sup>81</sup>



### 1.1.5 Physiopathologie et épidémiologie du cartilage arthrosique

La pathogénie du cartilage articulaire implique des facteurs biochimiques et génétiques, ainsi que le stress mécanique qui contribuent à la lésion dans l'arthrose du cartilage en perturbant les associations matrice-chondrocytes et, en modifiant les réponses métaboliques du chondrocyte <sup>49,82</sup> (*Figure 13*). L'arthrose survient habituellement dans des conditions de surcharge excessive d'une matrice cartilagineuse normale ou de surcharge normale d'une matrice cartilagineuse vulnérable. Il est maintenant admis que la destruction arthrosique du cartilage est le résultat d'un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme de la matrice extracellulaire <sup>83</sup>. Le déséquilibre est provoqué par:

- Une synthèse accrue de protéases (et plus particulièrement de certaines métalloprotéases) qui ont pour substrat les protéines collagéniques et non collagéniques de la matrice <sup>84</sup>; une diminution de la synthèse d'inhibiteurs naturels des protéases (les TIMP);
- Une inhibition de synthèse de la matrice fonctionnelle par le chondrocyte arthrosique;

Ce déséquilibre est accentué par une apoptose chondrocytaire accélérée <sup>85</sup> et une activation chondrocytaire par le tissu synovial. Les chondrocytes une fois activés deviennent aptes à synthétiser différentes protéases mais également différents médiateurs proinflammatoires <sup>86</sup>. Plusieurs protéases sont à l'origine de la destruction du cartilage observée au cours du processus arthrosique. Les métalloprotéases (MMP) constituent qualitativement la famille prédominante car elles sont activées à pH neutre c'est-à-dire activent directement dans les milieux extracellulaires et en particulier dans la matrice cartilagineuse. Il existe une douzaine de MMP différentes dont certaines restent liées aux membranes cellulaires (MT-MMP) <sup>87</sup>. Elles sont synthétisées par les chondrocytes et les synoviocytes sous l'effet de cytokines. L'aggrécane enzyme qui clive la liaison Glu373- Ala374 du domaine interglobulaire de l'aggrécane joue également un rôle majeur dans la dégradation de la matrice. Elle appartient à la famille des métalloprotéases et plus spécifiquement des ADAMTS (Disintegrin and Métalloprotéinase with TromboSpondin) <sup>88,89</sup>.

D'autres enzymes ayant pour substrat le collagène de type II et les protéoglycanes sont synthétisées par le chondrocyte. Elles ne sont actives qu'à pH acide telles que les aspartate protéases (cathepsine D) et les cystéines protéases (cathepsines B, H, K, L et S) stockées dans les lysosomes chondrocytaires puis libérées dans le microenvironnement péricellulaire. En dehors des protéases il ne faut pas oublier l'importance théorique des enzymes capables de dégrader les chaînes glucidiques présentes en grande quantité dans les PG.

Les cytokines pro-inflammatoires et en particulier l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  synthétisés par les chondrocytes et les synoviocytes activent ces mêmes cellules par leur liaison à des récepteurs spécifiques par l'intermédiaire de voies de signalisation spécifiques aux cytokines.

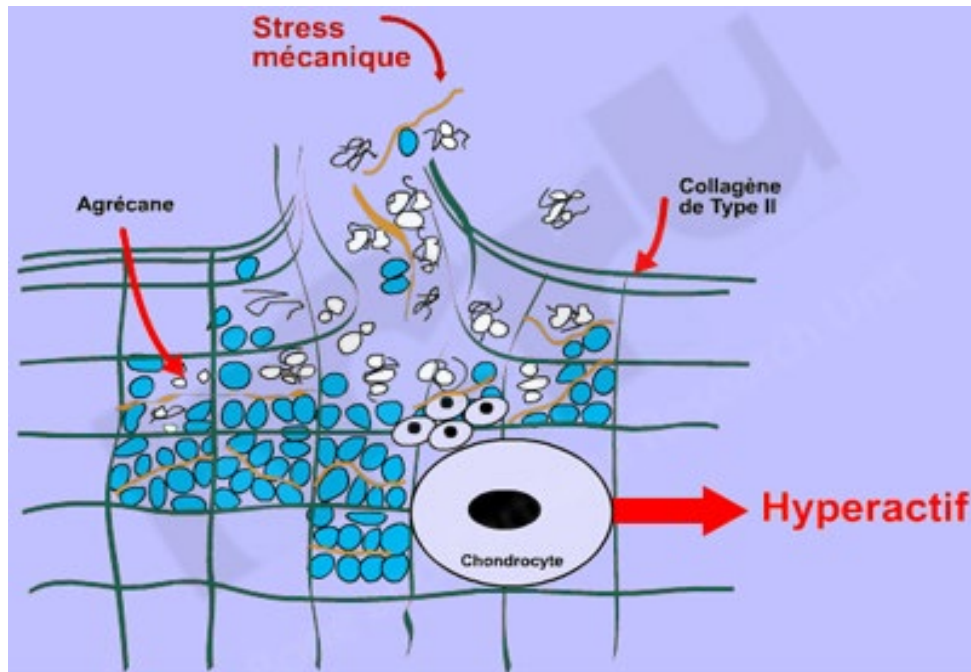
- ✓ L'IL-1 apparaît comme la cytokine la plus impliquée dans les processus de dégradation du cartilage dans l'arthrose comme l'on confirmé différents travaux expérimentaux:
- ✓ La suppression des lésions du cartilage dans l'arthrose expérimentale grâce à la thérapie génique par l'IL-1ra (antagoniste des récepteurs de l'IL-1) ;
- ✓ L'augmentation des lésions du cartilage dans l'arthrose induite chez des souris déficientes en IL-1b ;
- ✓ La diminution des lésions du cartilage chez des souris déficientes en IL-1b uniquement dans l'arthrose induite légère et instable.
- ✓ L'IL-1 provoque une diminution d'expression des collagènes de type II et IX tout en augmentant la synthèse des collagènes de type I et III <sup>90</sup>.
- ✓ D'autres cytokines destructrices, telles que l'IL-17 ou l'IL-18 peuvent intervenir sur le cartilage.

En somme, la destruction de la matrice extracellulaire (MEC) constitue l'événement initial à la dégradation du cartilage observé dans l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde ainsi que dans d'autres maladies dégénératives. Pendant les phases d'initiation, les chondrocytes présentent une réponse proliférative transitoire (croissance clonale), une synthèse accrue de la matrice cartilagineuse lors d'une tentative de réparation précoce et une synthèse accrue des cytokines cataboliques et des enzymes dégradant la matrice. Des cytokines cataboliques peuvent également être générées par les cellules de type fibroblaste et macrophage de la synoviale en réponse aux produits de dégradation du cartilage endommagé. La perte locale de protéoglycanes et le clivage du collagène de type II se produisent initialement à la surface du cartilage, entraînant une augmentation de la teneur en eau et une perte de résistance à la traction dans la matrice du cartilage à mesure que la lésion progresse. L'implication des métalloprotéinases matricielles (MMP) dérivées des chondrocytes dans la dégradation des collagènes cartilagineux et des protéoglycanes dans l'arthrose est bien établie.

Cette dégradation du cartilage dans les pathologies ostéo-articulaires, s'accompagne d'une rupture du filet collagénique permettant une hyperhydratation et une plus grande expansion des PGs, qui de surcroît, ont un poids moléculaire réduit. Ainsi, les mouvements d'eau induits par les charges ne s'exercent plus majoritairement vers le liquide synovial, mais



dans toutes les directions. Aussi, les mouvements inverses, lors de la suppression des charges, se font également de façon désordonnée. De ce fait, l'arthrose a été définie comme une maladie dégénérative de l'articulation synoviale provoquée par une augmentation du cisaillement et de la pression hydrostatique entre deux os adjacents, ce qui conduit finalement à une grave perturbation du cartilage. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques et traumatiques.



**Figure 13 :** Représentation schématique des circonstances pathogéniques impliquées dans l'apparition de la maladie de l'arthrose. Image empruntée à Henrotin Y. dans « Approche expérimentale de la pathogénie et du traitement de l'arthrose. In: Faculté de Médecine. Liège: Université de Liège; 2003 ».

A ce jour, l'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente dans le monde, et concerne plus de 80 % des sujets âgés de plus de 65 ans <sup>91</sup>, apparaissant de loin la principale cause de morbidité dans tous les pays développés. D'un point de vue clinique, l'arthrose est la seconde cause d'invalidité après les maladies cardio-vasculaire et représente ainsi un véritable problème de santé publique tant dans les pays industrialisés que ceux en voie de développement de par le vieillissement des populations et l'obésité croissante. Son impact économique est retentissant en raison des dépenses imposées et de l'handicap engendré.

Selon les estimations du National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases (NIAMS, <http://www.niams.nih.gov/>), plus de 20 millions d'américains souffrent

actuellement d'arthrose. Les statistiques suggèrent que près de 1 million d'américains sont touchés chaque année par des lésions chondrales <sup>92</sup>. Selon les prévisions, d'ici 2030, 20% (environ 72 millions d'américains) auront atteint leur 65<sup>ème</sup> anniversaire et donc de potentiels sujets à risque pour cette maladie.

D'autres estimations plus prudentes annoncent 35 à 40 millions d'européens qui souffriraient d'arthrose. En France, plus particulièrement, 5 et 10 millions de personnes souffrent d'arthrose, un nombre en constante augmentation en raison de l'allongement de la durée de vie et de certains facteurs de risque de plus en plus répandus dans la population tels que l'obésité. Son retentissement socio-économique est très important. Les économistes de la santé chiffrent le coût (direct et indirect) de l'arthrose en France à plus de 1,6 milliard d'euros en 2005 <sup>93</sup>. Elle est responsable annuellement de 9 millions de consultations qui génèrent 14 millions d'ordonnances, 300 000 examens radiologiques au moins, 100 000 journées d'hospitalisations. Au total, l'arthrose représente 0,8% des dépenses de santé en France.

Les données épidémiologiques actuelles estiment que l'arthrose est la première cause de consultation associée à la limitation fonctionnelle et à l'incapacité physique. Selon Brooks (2006) <sup>94</sup>, l'arthrose est une cause importante d'années de vie corrigées de l'incapacité dans les pays développés et en voie de développement. En raison des tendances à la hausse de l'espérance de vie et de l'obésité chez les jeunes, les statistiques prévoient une augmentation constante de la prévalence de l'arthrose <sup>95,96</sup>, sans compter l'incidence de blessures sportives augmente. La mise à jour la plus récente des chiffres de la charge mondiale de la maladie (GBD 2013) a estimé que 242 millions de personnes vivaient dans le monde avec une arthrose symptomatique et limitant l'activité de la hanche et / ou du genou, soit 13 millions avec des années vécues avec un handicap (YLD). Ces chiffres sont probablement une sous-estimation du fardeau mondial réel de l'arthrose, car ces taux ne prennent en compte que l'arthrose de la hanche et du genou, et non l'arthrose sur d'autres sites.

## 1.1.6 Stratégies thérapeutiques des lésions cartilagineuses

### 1.1.6.1 Stratégies conventionnelles

La nature avasculaire du cartilage articulaire, fait de lui un tissu qui se régénère peu et cicatrice difficilement de façon spontanée, notamment à l'âge adulte <sup>97,98</sup>. Il est intéressant que préciser que la circulation est une partie essentielle au processus normal de guérison. De ce fait, l'absence d'innervation et de vascularisation du cartilage peut supprimer les réponses normales associées à la guérison <sup>99,100</sup>. Par ailleurs, les lésions du cartilage articulaire sont-elles fréquemment associées à un handicap et à des symptômes tels que des douleurs articulaires, des phénomènes de blocage et une réduction ou une perturbation de la fonctionnalité de l'articulation, évoluant généralement vers des formes graves d'arthrose <sup>101-103</sup>. Étant donné la multitude d'origines possibles, le traitement des lésions de la surface articulaire incluait des procédures cliniques allant de la thérapie de conservation à la chirurgie invasive <sup>77,104</sup>.

#### 1.1.6.1.1 Thérapie de conservation

A l'origine, l'arthrose est une maladie dégénérative principalement non inflammatoire, souvent liée à l'âge et/ou à un traumatisme. Cependant, la progression des processus dégradants finissent par entraîner la destruction irréversible du cartilage articulaire et d'autres tissus des articulations, occasionnant des phénomènes inflammatoires et douloureux. Le traitement pharmacologique standard comprend des agents de contrôle de la douleur et de l'inflammation, tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par voie orale ou locale, les analgésiques y compris les opioïdes, les corticostéroïdes intra-articulaires et le groupe des médicaments symptomatiques à action lente pour l'arthrose tels que le sulfate de glucosamine, le sulfate de chondroïtine, la diacéréine, les insaponifiables extrait de soja et d'avocat administré par voie orale et acide hyaluronique intrarticulaire. Malheureusement, aucune des pharmacothérapies développées à ce jour ne s'est avérée efficace pour régénérer le cartilage. Comme le souligne Steven et ses collaborateurs (2006), des médicaments efficaces sont désespérément nécessaires <sup>105</sup>.

### 1.1.6.1.2 Techniques chirurgicales

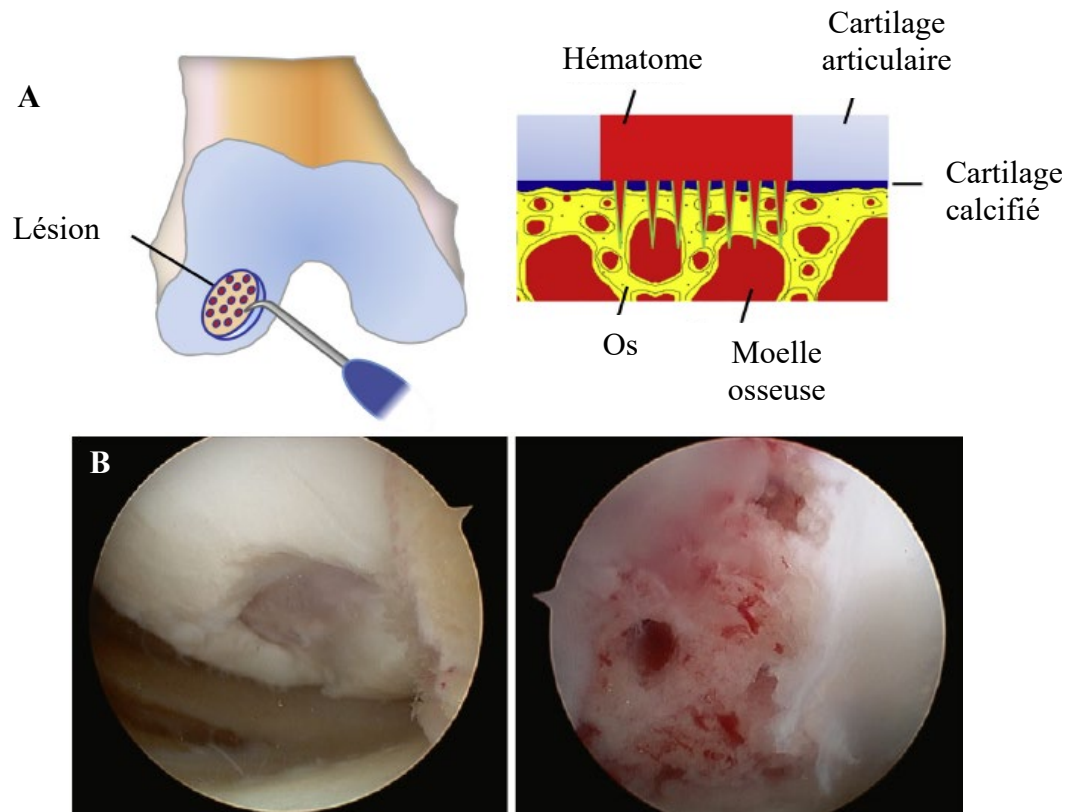
#### 1.1.6.1.2.1 Lavage et débridement par chondroplastie

Le lavage et le débridement arthroscopiques sont souvent utilisés pour soulager les douleurs articulaires. Le lavage implique l'irrigation de l'articulation pendant l'arthroscopie. Ce rinçage de l'articulation semble soulager la douleur bien que le mécanisme en soit incertain <sup>106</sup>. La procédure peut éliminer les débris de l'espace articulaire, soulageant ainsi la douleur. Le débridement est l'ablation arthroscopique des tissus endommagés de l'articulation, qui soulage également la douleur et, lorsqu'elle est utilisée en conjonction avec un lavage, le soulagement de la douleur semble durer plus longtemps <sup>107</sup>. Le débridement arthroscopique et le lavage ont un rôle palliatif dans le traitement des lésions chondrales de petite ou d'épaisseur partielle dans lesquelles l'objectif est de préserver le cartilage environnant intact restant. Ces deux procédures sont utilisées en routine pour soulager les douleurs articulaires et se sont avérées efficaces pour traiter les premiers stades de l'arthrose <sup>108,109</sup>. Cependant, le lavage et le débridement n'induisent pas la réparation du cartilage articulaire. En tout état de cause, les patients sont informés que les résultats ne sont pas prévisibles mais peuvent améliorer leurs symptômes <sup>110</sup>. Dans certaines études, les auteurs ont pu montrer que le soulagement de la douleur observé après les procédures de débridement et de lavage ne peut être qu'un effet placebo après une chirurgie <sup>111,112</sup>.

#### 1.1.6.1.2.2 Techniques de microfracture et de stimulation de la moelle osseuse

De nombreuses procédures arthroscopiques utilisées pour induire la réparation du cartilage articulaire tirent parti de la réponse de réparation intrinsèque, observée lors de la pénétration de l'os sous-chondral dans les défauts de pleine épaisseur. Ces procédures de stimulation médullaire comprennent le forage ostéochondral, l'abrasion, l'arthroplastie et la microfracture. L'idée est de faciliter la délivrance de cellules progénitrices à partir de la moelle osseuse pour former un tissu cicatriciel de type fibrocartilage sur le défaut. Ces techniques sont généralement appliquées sur des défauts de grade 3 ou 4 d'Outerbridge allant de 2 à 3 cm<sup>2</sup>, mais nécessitent pour la circonstance un bord cartilagineux intact essentiel pour contenir le caillot de guérison <sup>110</sup>. L'os exposé est débridé de tout cartilage instable et de la coiffe cartilagineuse calcifiée. Les perforations sont pratiquées à environ 3 mm d'intervalle et 2 à 4 mm de profondeur dans l'os sous-chondral et sont pour la plupart pratiquées sur des sujets jeunes de moins de 35 ans avec des lésions de moins de 400 mm<sup>2</sup> <sup>113</sup>. Le résultat clinique de ces procédures est mitigé, en raison de la nature imprévisible du tissu de réparation formé, mais aussi de l'âge

et des niveaux d'activité du patient <sup>114-116</sup>. Les suites opératoires exigent que les patients bénéficiant de telles techniques, soient sur une machine à mouvement passif continu et un palier au toucher assisté par béquille pendant 6 à 8 semaines <sup>116</sup>

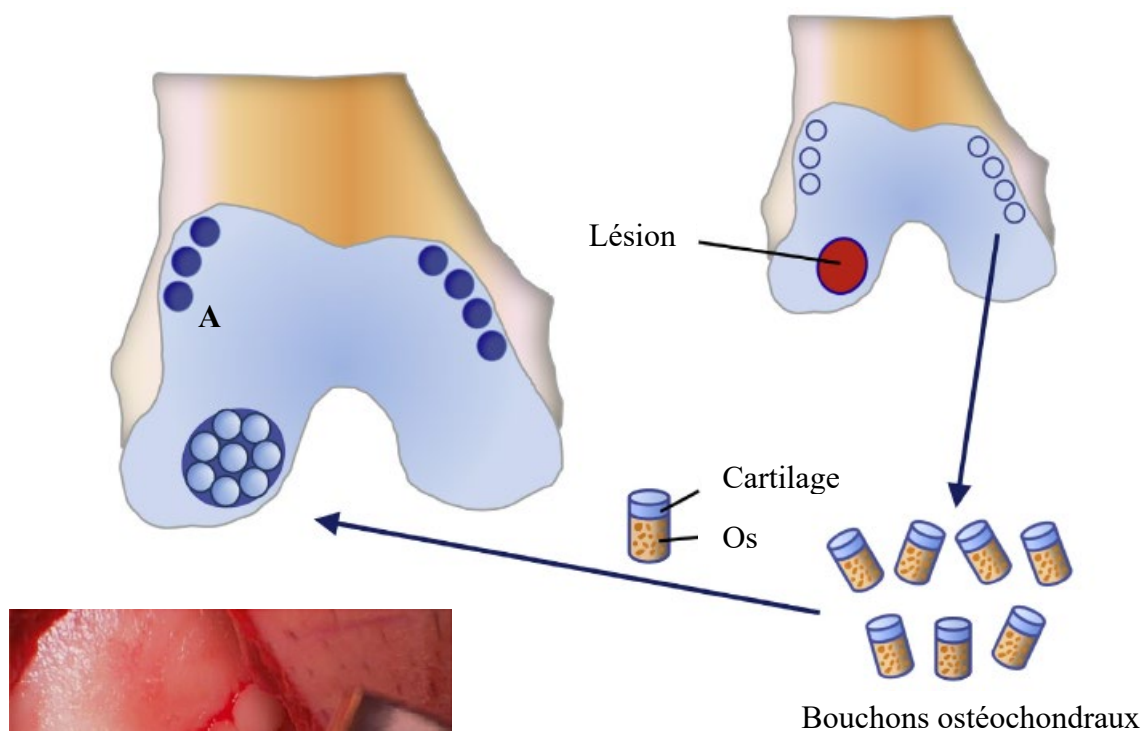


**Figure 14 :** Représentation schématique de la technique de microfracturation. (A) Le plancher d'un défaut chondral est perforé à plusieurs endroits à l'aide d'un instrument pointu ou d'un foret à fibre étroite. Par cette action, l'espace médullaire de l'os sous-chondral est ouvert. Le sang s'infiltré dans le défaut portant des MSC locales dérivées de la moelle osseuse - et y forme un hématome (reproduit avec permission de Hunziker et al, 2015). (B) Situation clinique de lésion de grade 4 sur un condyle fémoral médial. À gauche: lésion avant la préparation. Droite: Lésion après débridement et microfracture avec des saignements à la surface de la moelle osseuse. (Cheung Sunny et Benjamin Ma C., 2011).

#### 1.1.6.1.2.3 Transfert d'autogreffe ostéochondrale / mosaïqueplastie

Cette procédure consiste à prélever des bouchons ostéochondraux d'une région non porteuse (généralement la trochlée ou le périmètre autour de l'échancrure intercondylienne) et à les transférer sur des défauts d'épaisseur totale du cartilage artriculaire. La lésion est préparée par forage et débridement pour laisser un site receveur cylindrique propre sans fragments

lâches. Chaque bouchon donneur est ensuite inséré dans le site receveur, perpendiculairement au contour articulaire, et par ajustement serré. En règle générale, plusieurs bouchons de 6 à 8 mm de diamètre sont utilisés pour combler la lésion de manière «pavée» comme on peut le constater sur la figure ci-dessous. Les sites donneurs se remplissent de fibrocartilage au fil du temps, tandis que le site de greffe forme une surface de glissement congruente avec le cartilage hyalin transplanté. Sur le plan clinique, des bons résultats sont parfois enregistrés. Le problème demeure avec l'incertitude de la morbidité du site donneur à long terme, l'exactitude de l'implantation concernant la congruence des surfaces cartilagineuses et la liaison de la zone chondrale au cartilage adjacent.

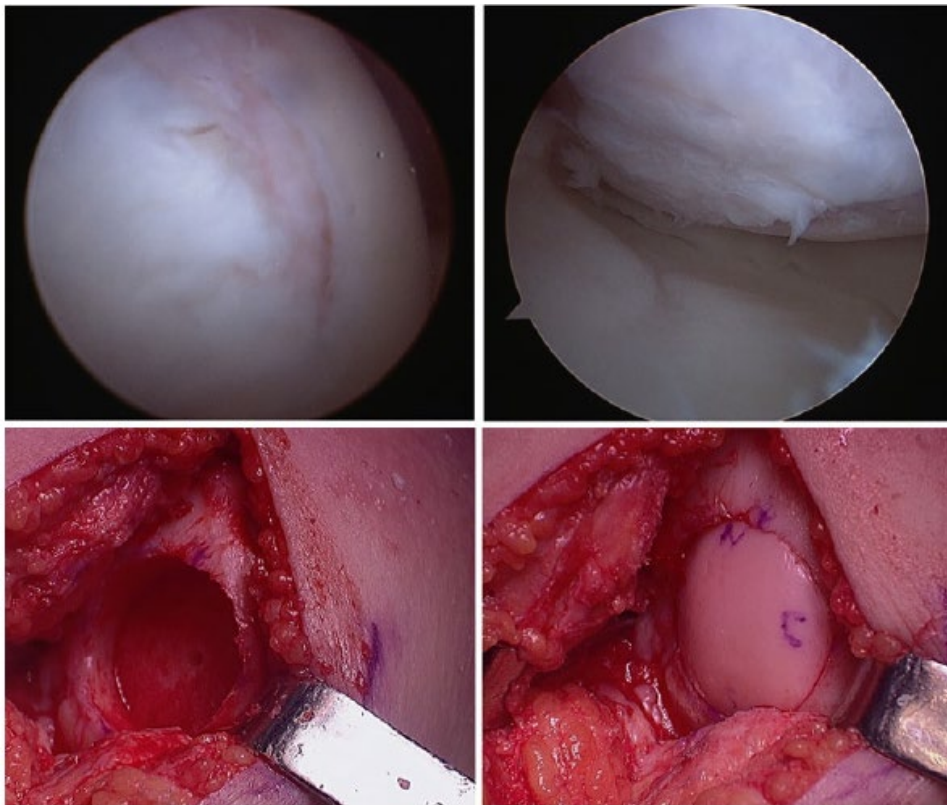


**Figure 15 :** Représentation schématique du principe de la mosaïqueplastie. Des bouchons cylindriques de tissu ostéochondral sont percés à partir d'une zone non portante de l'articulation du genou (à l'aide d'un instrument chirurgical spécial), puis ajustés à la presse, côte à côte, dans la zone endommagée. Le nombre de bouchons retirés dépendra du diamètre de surface du site accepteur. Les sites donneurs dénudés sont soit remplis de tissu ostéochondral qui est retiré du site accepteur endommagé lors de sa préparation chirurgicale pour les bouchons, soit laissés vides. Vu de dessus, les bouchons ajustés forment une mosaïque de profils circulaires qui sont entrecoupés d'espaces vides; d'où le nom de "mosaïqueplastie". (Reproduit avec permission de Hunziker et al, 2015). (B) Mosaïque de bouchons obtenus à partir de la trochlée (Cheung Sunny et Benjamin Ma C., 2011).



#### 1.1.6.1.2.4 Allogreffe ostéocondrale

Semblable au transfert d'autogreffe ostéocondrale, cette technique utilise à la place des bouchons de donneur de cadavres frais de taille correspondante. Cette procédure est réservée aux défauts chondraux supérieurs à 2,5 cm<sup>2</sup> et nécessite la disponibilité d'une allogreffe fraîche ou conservée au froid pour une viabilité maximale des chondrocytes. Le timing est également important car la viabilité des chondrocytes diminue significativement 14 jours après le stockage<sup>117</sup>. Cette technique est généralement indiquée pour les lésions plus importantes. Dans ces situations, il n'est pas rare que des procédures de réalignement, telles qu'une ostéotomie tibiale élevée (HTO), soient effectuées en même temps pour protéger le compartiment affecté.



**Figure 16 :** Séquence sagittale (en haut à gauche) et coronale (en haut à droite) pondérée en T2 montrant un grand défaut chondral du condyle fémoral médial. Vues arthroscopiques de la lésion en flexion (milieu gauche) et en extension (milieu droit). Une arthrotomie montrant le site receveur préparé (en bas à gauche) et l'allogreffe ostéocondrale transférée (en bas à droite). Reproduit avec la permission de Cheung et al, 2011

En résumé, il ressort que les techniques chirurgicales exploitent la réponse de réparation spontanée par une stimulation de la moelle osseuse en exposant le tissu cartilagineux lésé aux

espaces médullaires. La réponse de réparation spontanée est basée sur des saignements induits chirurgicalement des espaces osseux sous-chondraux et la formation ultérieure de caillots sanguins. Cependant, la réponse de cicatrisation qui en résulte est très variable et non reproductible, et le tissu qui se forme est de nature fibreuse <sup>118</sup> et non durable <sup>119,120</sup>, traduisant la nécessité d'exploiter d'autres voies thérapeutiques.

#### 1.1.6.2 Thérapies cellulaires

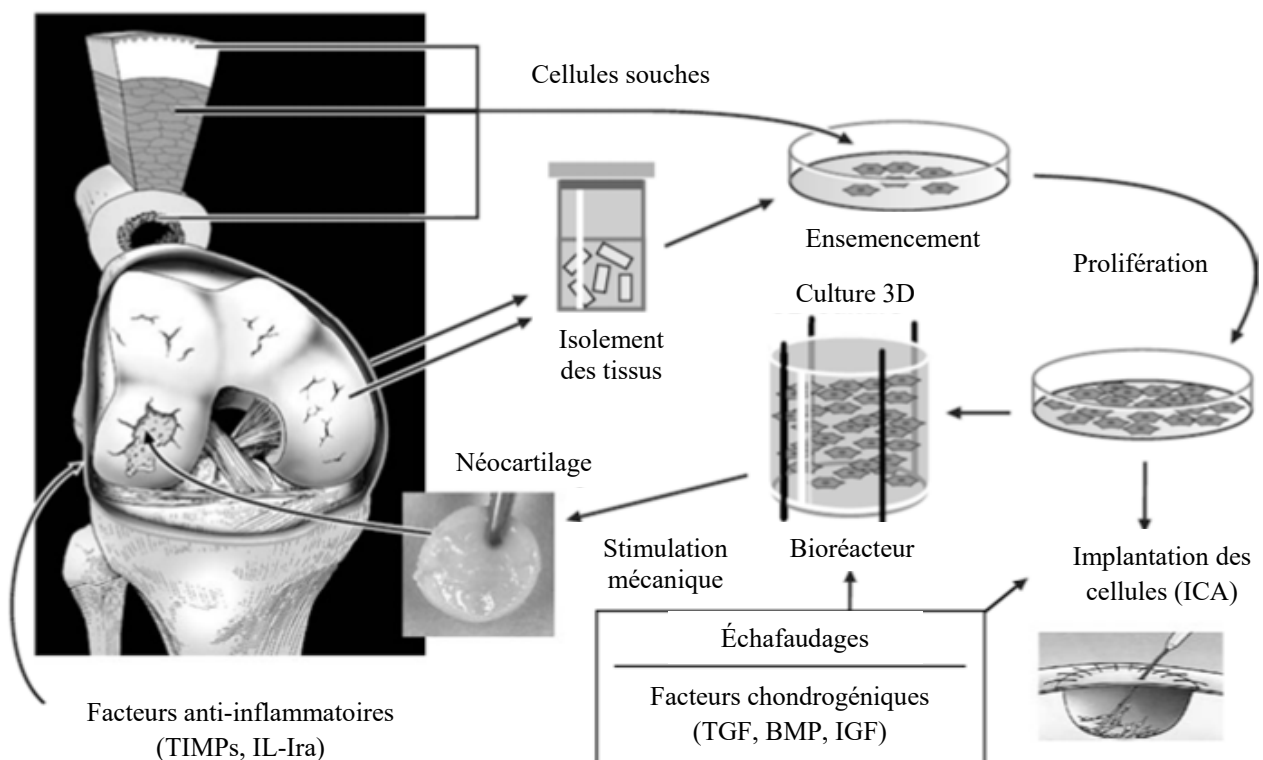
Historiquement, le traitement des lésions de la surface articulaire incluait des procédures cliniques allant de la thérapie de conservation à la chirurgie invasive <sup>77,104</sup>. Par exemple dans la microfracture, des trous sont pratiqués dans l'os exposé afin de permettre à la moelle osseuse contenant des cellules souches de s'écouler de l'os au cartilage dans l'espoir d'une différenciation en cartilage. Cependant, les attentes n'ont pas été tout à fait reluisantes en raison de la formation de fibrocartilage qui, comparé au tissu hyalin, a une durabilité et une fonctionnalité réduites <sup>121,122</sup>. Par conséquent, plusieurs options différentes de cellules progénitrices ont été proposées comme candidates à l'ingénierie du cartilage articulaire, à savoir les chondrocytes, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de différentes sources <sup>123,124</sup>, des cellules souches pluripotentes (induites) <sup>125</sup> et même des fibroblastes. A ce jour, deux sources de cellules progénitrices sont exploitées pour la réparation des lésions cartilagineuses pour des applications cliniques : les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses. Le principe consiste à implanter le cartilage artificiel dans le défaut cartilagineux généralement situé dans l'espace intra-articulaire, dans lequel des indices chondro-inducteurs en termes de cytokines et de stimulations mécaniques existent pour favoriser la chondrogenèse spontanée des cellules implantées et maintenir leur phénotype et leur fonction chondrogéniques.

#### 1.1.6.3 Implantation de Chondrocytes Autologues (ICA)

Les chondrocytes sont les cellules cartilagineuses résidentes essentielles à la production de matrice extracellulaire (MEC) spécifique du cartilage. Par conséquent, ils représentent un choix raisonnable de cellules progénitrices pour l'ingénierie du cartilage. L'ICA est l'une des stratégies de réparation cellulaire les plus utilisées pour le cartilage articulaire. Cette technique a été introduite en 1987 par un groupe de chercheurs Suédois suivant les principes généraux de réparation tissulaire. Cependant, c'est en 1994 que Brittberg et ses collaborateurs ont publié les premiers rapports cliniques montrant des résultats satisfaisants pour les lésions isolées du condyle fémoral. Cette approche allie à la fois traitement chirurgical et des méthodes in vitro.



Le principe de la technique de l'ICA consiste à réaliser une biopsie du cartilage articulaire sain par arthroscopie à partir d'un emplacement bas ou non porteur de l'articulation malade. Le tissu cartilagineux est ensuite digéré par voie enzymatique pour libérer les chondrocytes, qui sont ensuite expansés en culture monocouche afin d'augmenter le nombre (généralisant ainsi plus de 10 millions de cellules parmi les quelques centaines de milliers contenues dans la biopsie). Les chondrocytes expansés sont ensuite réimplantés sur le site du défaut cartilagineux directement sous forme de suspension cellulaire, sous un lambeau périosté suturé chirurgicalement, qui est généralement retiré du tibia médial <sup>126,127</sup>. Les cellules ensemencées sont ensuite censées déposer une MEC pour réparer le site de la lésion <sup>128,129</sup>. Depuis lors, plusieurs études ont suivi, documentant à la fois la production d'une surface articulaire de type hyalin et de bons résultats dans la majorité des patients avec un suivi à moyen et long terme. Les indications de traitement ont été élargies <sup>130,131</sup> et cette technique cellulaire a suscité un intérêt croissant dans le monde entier <sup>127,132-134</sup>.



**Figure 17 :** Représentation schématique du développement de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire. La combinaison de cellules, d'échafaudages et de facteurs de croissance pourrait être soit directement injectée dans la lésion, soit davantage cultivée dans des bioréacteurs *in vitro* pour former un nouveau tissu. Le néocartilage serait finalement implanté dans la lésion <sup>135</sup>.

Les premiers résultats obtenus ont très vite permis de considérer l'ICA comme une référence en matière de réparation, y compris pour d'autres interventions chirurgicales qui sont utilisées pour le traitement des lésions chondrales. Au niveau clinique, de très bons résultats ont été également obtenus, car ces techniques semblaient procurer un soulagement symptomatique aux patients. Certaines études ont d'ailleurs établi une forte corrélation entre la qualité des tissus produits et le soulagement symptomatique du patient contre l'enflure et la douleur, mettant un point d'honneur sur l'importance de la qualité des tissus dans la régénération du cartilage.

Au plan histologique, des déceptions ont très vite été soulignées, car en réalité, le tissu produit est bien moins inférieur au cartilage hyalin natif, étant de nature fibrocartilagineuse, avec une fonctionnalité et une durabilité limitées<sup>136,137</sup>. Ce problème a été plutôt lié au fait que les chondrocytes excessivement expansés ont tendance à perdre leur capacité à se différencier<sup>138</sup>, adoptant plutôt un phénotype dédifférencié. En raison de l'isolement des chondrocytes de leur environnement naturel tridimensionnel (3D), puis expansés dans des conditions de culture monocouche in vitro, conduit inévitablement les chondrocytes à adopter une autre morphologie qui leur permettent d'adhérer au plastique afin de survivre. Ce changement phénotypique est caractérisé par la dédifférenciation rendant les chondrocytes incapables à se différencier après des longues cultures cellulaires, une fois réimplantés dans le défaut cartilagineux. Au lieu de produire des protéoglycanes spécifiques du cartilage et du collagène de type II, les chondrocytes expansés produisent plutôt des protéoglycanes non spécifiques et de collagène de type I<sup>139,140</sup>. De ce fait, la matrice du cartilage perd ses propriétés biomécaniques ordinaires et sa résilience.

D'autres limitations ont été associées à la difficulté de prélèvement de quantité importante de cellules à greffer et à leur mise en œuvre, à la réparation parfois médiocre du tissu lésé et la variabilité de la réponse des patients. De plus, une délamination post-opératoire des lambeaux a été rapportée, même après les sutures<sup>141</sup>. Ce qui exige parfois l'immobilisation temporaire (partielle ou complète) de l'articulation pendant la période de récupération.

Récemment des chercheurs ont opté pour l'utilisation des chondrocytes «hétérotopiques» non articulaires tels que les chondrocytes nasoseptaux ou les chondrocytes auriculaires comme source de cellules alternatives, car seraient plus faciles à récolter, associés à une morbidité plus faible au site du donneur et possédant un taux de prolifération plus élevé<sup>142,143</sup>. Cependant, il reste à déterminer si les chondrocytes hétérotopiques produiraient du cartilage avec le type souhaité (tel que le cartilage hyalin) et fonctionneraient lors de la cicatrisation des défauts.

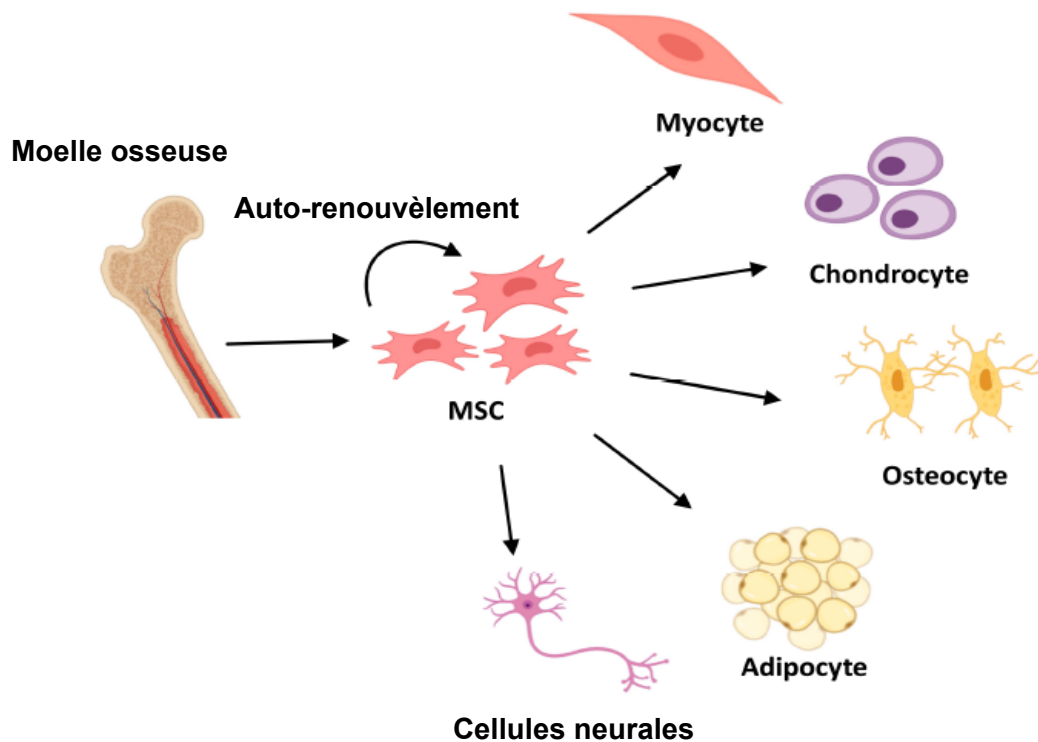
A ce jour, le problème de la dédifférenciation des chondrocytes semble être résolu par l'utilisation des moyens de culture favorisant leur prolifération et leur différenciation, tels que la culture en suspension avec un microporteur 3D<sup>18,144</sup>, du tri des chondrocytes, de la stimulation par la cytokine<sup>97</sup>, ou de la réduction de la teneur en tension d'oxygène. Plus récemment, une variante de l'approche ACI associée à une matrice (la technique dite MACI) a été introduite<sup>145</sup>. Selon cette technique MACI, les chondrocytes autologues sont inclus dans une matrice (par exemple, collagène ou hyaluronane) plutôt que suspendus dans un fluide, évitant ainsi la nécessité d'un lambeau périosté. Cependant, l'utilisation d'une matrice introduit un nouvel ensemble de problèmes, tels que les problèmes de bio-incompatibilité, d'inflammation et de dégradation. Toutefois, il faut souligner que ces avancées cliniques ont conforté la volonté de progrès dans les techniques d'ingénierie des tissus cartilagineux.

#### 1.1.6.4 Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs)

Pour surmonter les limitations des chondrocytes, les CSMs sont devenues progressivement la cible de nombreux chercheurs. En effet, les CSMs sont des progénitrices multipotentes, non hématopoïétiques, qui peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse, principalement, et d'autres tissus notamment la graisse, la pulpe dentaire et le muscle. Elles ont été identifiées pour la première en 1924 par un chercheur russe Alexander Maximow qui, à partir de l'histologie a identifié un type de précurseur dans le mésenchyme capable de se différencier en une variété de types de cellules sanguines<sup>146</sup>, bien que le terme cellule souche mésenchymateuse n'existe pas. C'est bien plus tard dans les années 1960 (c'est dire 40 ans après) que les chercheurs Ernest McCulloch et James Till ont pu identifier les qualités clonales des cellules de la moelle osseuse<sup>147,148</sup>. Il faudra encore une décennie pour mettre au point un test *ex vivo* permettant d'examiner la nature clonale des cellules multipotentes de la moelle<sup>149</sup>. Cette analyse a été mise au point par l'équipe de chercheurs de Friedenstein dans les années 1970, malgré que les cellules stromales d'intérêt (maintenant appelées cellules souches mésenchymateuses) aient été désignées sous le terme de fibroblastes formant des colonies (CFU-f)<sup>150</sup>. Depuis lors, les recherches et les expérimentations se sont succédées et permis de mieux caractériser la plasticité des cellules de la moelle osseuse et de déterminer les moyens de leur différenciation en types de cellules matures capables d'être manipulée par des stimuli environnementaux.

Plus tard, la découverte des capacités de différenciation ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire de cette population adhérente au plastique, et leur capacité

d'autorenouvellement ont ensuite conduit Caplan à proposer en 1991 la dénomination de « cellules souches mésenchymateuses »<sup>151</sup>. En raison de leur adhérence à la boîte de culture, ils peuvent être développés en culture tout en conservant leur multipotence<sup>152</sup>. Par conséquent, les CSM en culture peuvent être induites pour générer des chondrocytes, myocytes, adipocytes, ostéoblastes (ostéocytes) et ténocytes<sup>153,154</sup>.



**Figure 18 :** Représentation schématique du processus de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en trois lignées différentes : Myocytes, chondrocytes, ostéocytes, adipocytes et cellules neurales.

Des études récentes ont démontré que les CSM peuvent interagir avec les cellules immunitaires, conduisant à la modulation d'un certain nombre de fonctions effectrices<sup>154</sup>. Les propriétés immunomodulatrices des CSM peuvent être exploitées pour le traitement des affections inflammatoires et rhumatismales<sup>155</sup>. Les CSM peuvent migrer vers les sites de lésion, induire une tolérance périphérique et inhiber la libération de cellules souches pro-inflammatoires. L'une des particularités des CSMs, c'est qu'elles génèrent facilement des colonies dérivées d'une seule cellule qui peuvent être fortement développées et différenciées en une variété de types de cellules, y compris les chondrocytes<sup>151</sup>. En plus de leur potentiel de réparation du cartilage, les CSMs possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui les rendent aptes à la thérapie cellulaire dans les maladies ostéoarticulaires<sup>78</sup>. De sorte que, une fois administré *in vivo*, les CSM peuvent induire une tolérance périphérique et migrer vers les tissus

lésés où ils ont la capacité d'exercer des propriétés immunosuppressives <sup>156</sup> et d'inhiber la libération de cytokines pro-inflammatoires et favoriser la survie des cellules existantes et la réparation des tissus endommagés <sup>154</sup>. Ils sont cliniquement explorés comme une nouvelle thérapeutique pour traiter une variété de maladies à médiation immunitaire <sup>157</sup>. Les MSC sont très prometteuses pour une utilisation dans la réparation et la reconstruction des tissus mésenchymateux endommagés ou malades <sup>152</sup>. En raison des applications potentielles des CSM dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative, elles apparaissent comme une option intéressante pour la régénération du tissu cartilagineuse.

Pour le développement de systèmes de chondrogenèse in vitro, de nombreux facteurs de croissance et de différenciation impliqués dans la régulation du développement du cartilage et de l'homéostasie du cartilage articulaire mature ont été identifiés (cinq familles de facteurs particulièrement pertinents pour la formation du cartilage<sup>79</sup>) pour faciliter la différenciation des CSMs adultes et améliorer ainsi la réparation du cartilage in vivo. Dans le cadre de notre travail, nous nous résumerons à la famille des facteurs de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) <sup>158</sup>, qui ont été utilisés dans la différenciation des CSMs.

La chondrogenèse est régulée par l'interaction de membres appartenant aux principales classes d'agents morphogènes du développement, notamment la superfamille des TGF- $\beta$ . La famille des TGF- $\beta$  est un grand groupe de protéines de régulation cellulaire structurellement apparentées, nommée d'après son premier membre, TGF- $\beta$ 1, décrit à l'origine par Assoian RK et al (1983)<sup>159</sup>. Il s'agit d'un peptide multifonctionnel qui contrôle la prolifération, la différenciation et d'autres fonctions dans de nombreux types de cellules <sup>160</sup>. Ce peptide est constitué de 112 résidus d'acides aminés dérivés par clivage protéolytique du *C-terminal* d'une protéine précurseur. Ces protéines interagissent avec une famille conservée de récepteurs de protéine kinase spécifiques de la sérine / thréonine à la surface des cellules et génèrent des signaux intracellulaires à l'aide d'une famille de protéines conservées appelées SMAD. Les SMADs phosphorylés s'associent à SMAD 4 et se transloquent dans le noyau, où ils participent à la transcription génique <sup>161</sup>. Ainsi, les molécules de TGF $\beta$  stimulent in vitro les chondrocytes pour produire une MEC compatible avec le cartilage articulaire, tout en agissant contre l'activité catabolique des médiateurs inflammatoires, tels que l'interleukine 1 (IL1) <sup>162</sup>.

Il faut rappeler que la famille du TGF- $\beta$  comprend cinq membres (TGF- $\beta$ 1–5), qui sont principalement produits dans les os et le cartilage. Divers membres ont été testés en tant qu'inducteurs chondrogéniques au cours de l'ingénierie du cartilage in vitro, soit seuls ou en association avec des échafaudages tridimensionnels, ou soit en tant que facteurs solubles ou

même comme approche de thérapie génique. La communauté scientifique est d'accord pour dire que les milieux supplémentés avec le TGF $\beta$  induisent la prolifération et la différenciation chondrogénique des cellules souches/progénitrices mésenchymateuses, conduisant à la fois à une régulation à la baisse des gènes du collagène de type I, puis à une régulation à la hausse des gènes du collagène de type II et de l'aggrécane <sup>163</sup>. Avec les TGF $\beta$ -2 et TGF $\beta$ -3, ces molécules provoquent un dépôt plus précoce et plus important du collagène de type II et une accumulation deux fois plus importante de protéoglycanes <sup>164</sup>, contrairement au TGF $\beta$ -1. D'autre part, les ligands du TGF $\beta$  inhibent la maturation des chondrocytes hypertrophiques et stabilisent le phénotype pré-hypertrophique des chondrocytes <sup>165</sup>. C'est pourquoi, afin de différencier les cellules souches mésenchymateuses humaines en chondrocytes hypertrophiques, il est conseillé de retirer le TGF $\beta$  du milieu <sup>165</sup>. Ces morphogènes interagissent les uns avec les autres pour contrôler de nombreux aspects de la biologie cellulaire, notamment la prolifération, la différenciation, la sécrétion de la MEC et l'apoptose des cellules.

Néanmoins, l'utilisation des CSMs comme source alternative de cellules pour la réparation du cartilage articulaire présente également plusieurs limites, telles que : un faible nombre de cellules de CSM dans la moelle osseuse ou d'autres tissus du donneur; la nécessité de les caractériser avec soin; la présence de plusieurs sous-populations de cellules; le contenu de cellules déjà engagées; la procédure de différenciation chondrogénique qui prend du temps; l'instabilité du phénotype chondrogénique; et la différenciation incontrôlée dans d'autres lignées, en particulier eu égard à l'influence des médiateurs inflammatoires dans le cartilage lésé <sup>143</sup>. De plus, le néocartilage fabriqué à partir de CSM serait épigénétiquement moins semblable au cartilage autologue que le cartilage artificiel produit à partir de chondrocytes primaires <sup>166</sup>. En raison de ces limitations, il est difficile de mettre en place une réglementation sûre pour utiliser les CSMs dans une application clinique étendue.

De toute évidence, il existe un besoin crucial d'évaluer en profondeur les caractéristiques moléculaires du cartilage articulaire pour comprendre les changements biochimiques et adapter les constructions de génie tissulaire. Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire, la surveillance des propriétés biologiques des cellules et / ou de ses modifications associées fournit des informations importantes concernant l'état des cellules, telles que la viabilité et l'état fonctionnel de la cellule <sup>167</sup>. L'analyse d'une telle organisation microstructurale est d'un grand intérêt pour comparer diverses constructions de tissus et déterminer les facteurs les plus pertinents qui permettent le développement de tissu issus des constructions géniques le plus proche du tissu natif.

## 1.2 Les techniques d'évaluation du cartilage articulaire et des constructions de génie tissulaire

Pour évaluer la santé, la pathologie et l'efficacité thérapeutique du cartilage articulaire, il est impératif que des méthodologies d'évaluation appropriées soient développées et utilisées<sup>23</sup>. La demande clinique toujours croissante de tissus et de cellules de remplacement a conduit à une expansion rapide des capacités de recherche dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative. L'examen histopathologique reste la technique de choix pour le diagnostic des échantillons de tissus malades, bien qu'il soit très subjectif et repose sur un ciblage de biopsie à l'aveugle<sup>168</sup>. La surveillance de la croissance des tissus en culture cellulaire reste un défi majeur malgré les techniques analytiques actuelles qui permettent d'évaluer de nombreux facteurs tels que l'expression de l'ARN, l'expression des protéines intracellulaires/extracellulaires et les composants exogènes. Récemment, la spectroscopie Raman a fourni une technique d'analyse rapide, puissante et non destructive et sans marquage pour l'identification objective et la classification des maladies<sup>169-171</sup>. En particulier, les changements dans la structure chimique et la composition moléculaire qui se produisent à la suite d'une maladie peuvent être évalués qualitativement à partir du spectre Raman. L'un de ses développements les plus intéressants est l'application dans les cellules et les tissus. L'imagerie cellulaire Raman permet l'observation de ces changements biochimiques intracellulaires et extracellulaires.

Dans cette partie, après une brève description des techniques dites conventionnelles, nous nous intéresserons davantage sur les techniques optiques innovantes, en particulier la microscopie confocale Raman, dont nous nous sommes servis pour la conduite de nos travaux. Les techniques microscopies multiphotonique et à force atomique (AFM) sont décrites dans le chapitre de matériel et méthodes.

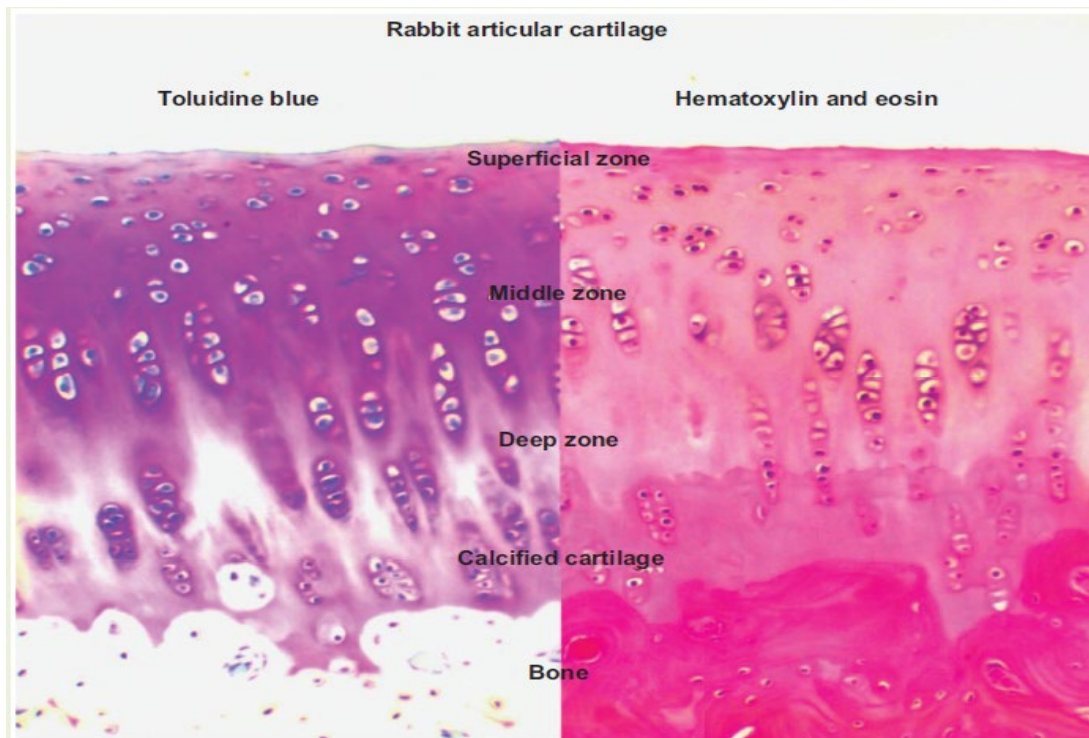
### 1.2.1 Les moyens classiques

La morphologie globale du cartilage articulaire est utilisée depuis longtemps pour discerner la santé et la pathologie des tissus. De ce fait, plusieurs techniques d'imageries allant de l'arthroscopie à l'IRM ont été développées pour évaluer cliniquement la qualité du tissu cartilagineux en fonction de la quantité du dommage et de l'état pathologique. La morphologie macroscopique peut être évaluée par arthroscopie, bien que des changements microscopiques ou infimes de la santé du cartilage ne soient souvent pas visibles lors d'une inspection

macroscopique. Contrairement aux simples radiographies qui ne donnent qu'une image indirecte de l'épaisseur du cartilage articulaire, l'IRM par exemple donne une vision directe sans utiliser les rayons X et sans nécessiter d'injection d'un produit de contraste. Avec le progrès des technologies, elle fournit désormais une vision de plus en plus précise du cartilage. A côté de ces nouvelles découvertes, d'autres techniques telles que l'arthroscanner (arthrographie par injection d'un produit de contraste dans l'articulation suivie d'un examen tomodynamométrique à rayons X) et l'arthro-IRM (arthrographie suivie d'une IRM) ont été développées et autorisent une vue en coupes fines et en trois dimensions du cartilage dont les contours sont soulignés par le produit de contraste injecté. Dans le cadre de la recherche, l'IRM fournit non seulement une information sur la morphologie du cartilage, mais aussi sur sa composition. Ainsi, différentes séquences IRM reflètent son contenu en eau, l'organisation du réseau de fibrilles de collagène et l'état des protéoglycanes qui le composent. Cependant, lorsqu'il est question d'examen très précoce de modifications de la composition de l'arthrose dans l'AC, ni l'IRM ni le scanner ne fournissent une sensibilité adéquate.

Dans le cadre de la recherche, cependant, une pléthore de techniques d'évaluations histologiques, ultrastructurales et biochimiques ont vu le jour et permettent de caractériser le cartilage articulaire, avec des méthodes supplémentaires en développement continu. Ces techniques permettent par exemple de visualiser des objets subcellulaires tels que l'ADN. Ainsi, des marqueurs tels que le bleu d'Alcian, le bleu de toluidine, la safranine O (avec Fast Green) et le rouge Sirius (dans l'acide picrique saturé) sont régulièrement utilisés, ainsi que des combinaisons telles que le pentachrome de Movat et l'hématoxyline et l'éosine pour démontrer histologiquement l'emplacement du glycosaminoglycane, du collagène et d'autres composants de la matrice extracellulaire dans le cartilage articulaire. En utilisant la technique immunohistochimique, la distribution de collagènes et de glycosaminoglycanes spécifiques peut être décelée et, mettant en évidence la présence et la distribution relative du collagène de type I ou II. Les quantités importantes de collagène de type I ne sont pas observées dans le cartilage articulaire hyalin, mais dans le fibrocartilage. Aussi, la quantification biochimique du collagène et des glycosaminoglycanes (GAG) extraits de coupes de tissus en série a également permis de mieux comprendre la distribution dépendant de la profondeur de ces principaux constituants de la MEC. Cependant, la résolution spatiale pouvant être obtenue de manière fiable est limitée<sup>172</sup>. En milieu clinique, ces méthodes sont principalement utilisées sur les tissus malades biopsiés. Ainsi, les techniques d'imagerie non destructives, qu'elles soient invasives ou non invasives, font partie de la première ligne d'évaluation de la santé du cartilage.





**Figure 19** : Structure zonale du cartilage articulaire. Histologie du cartilage articulaire de lapin adulte pleine épaisseur (~ 1 mm) du genou (10 ×), indiquant des changements dans la morphologie cellulaire avec la profondeur. La coupe histologique représente une tranche prise perpendiculairement à la surface du cartilage, avec des protéoglycanes de coloration au bleu de toluidine (violacé), des noyaux de coloration à l'hématoxyline (bleu) et des structures de protéines de coloration à l'éosine (rose / rouge) (Kyriacos et al, 2016).

Les évaluations histologiques et immunohistochimiques du cartilage natif et artificiel jouent un rôle déterminant dans l'évaluation de la distribution spatiale des principaux composants de la MEC dans les constructions d'ingénierie du tissu cartilagineux et dans l'orientation des efforts visant à élaborer des stratégies pour recréer la complexité du tissu natif. Les méthodes actuelles, y compris le dosage immuno-enzymatique (ELISA), la réaction en chaîne par polymérase et le transfert Western (suivi de la spectrométrie de masse) sont inefficaces, invasives et destructives <sup>173</sup>. Ces méthodes restent de nature qualitative ou semi-quantitative, nécessitant un étiquetage et se prêtant difficilement à des analyses approfondies précises de la distribution des composants de la MEC <sup>7,8</sup>.

Ces dernières années, de nombreuses autres méthodes d'imagerie non invasive et sans étiquette telles que, notamment la microscopie à lumière polarisée (PLM), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la tomographie par cohérence optique (OCT), la génération de seconde harmonique (SHG) et la microscopie à force atomique (AFM), ont été

développées pour une évaluation plus détaillée du cartilage articulaire <sup>9-12</sup>. Toutes ces techniques sont encore au stade expérimental et ne sont pas utilisées en clinique de routine. Par exemple, la microscopie infrarouge est une technique d'imagerie chimique utilisant un rayonnement infrarouge transmis ou diffuse pour obtenir des images. Ce rayonnement provient des états vibratoires des molécules. La difficulté avec cette technique est sa résolution spatiale de longueur d'onde infrarouge (10-20  $\mu\text{m}$ ) qui semble élever pour observer des structures subcellulaires. De plus, l'eau paraît opaque dans l'infrarouge, de sorte que les molécules biologiques sont impossibles à étudier. Or, une sensibilité moléculaire élevée est une condition indispensable pour améliorer non seulement le diagnostic de l'arthrose, mais également pour permettre une meilleure compréhension des changements biochimiques au cours du développement et de la progression de l'arthrose pour une meilleure prise en charge.

En tout état de cause, il existe un besoin pressant de méthodes de surveillance non-invasive et non destructrice, avec une résolution spatiale importante, car la qualité des constructions de génie tissulaire peut potentiellement être suivie en temps réel pendant la culture. Ainsi, les méthodes non invasives qui permettent l'observation de la formation de tissus et les changements dans le phénotype cellulaire, basés sur la microscopie chimique, comme la microscopie confocale Raman sont un outil intéressant pour étudier les constructions de génie tissulaire. En effet, contrairement aux méthodes conventionnelles qui ne donnent que des informations sur la présence de composés spécifiques, la micro-spectroscopie Raman fournit une « empreinte » spectroscopique représentant l'ensemble de la composition moléculaire des échantillons d'intérêt <sup>14</sup>. Ainsi, l'utilisation de cette méthode de microscopie à haute résolution permet non seulement d'observer la morphologie des cellules et des tissus, mais d'extraire une richesse d'informations moléculaires (c'est-à-dire une conformation biochimique spécifique des protéines, des glucides, des lipides, des acides nucléiques, etc..) dans des cellules et des tissus utilisant des biomolécules endogènes comme contraste et avec une résolution spatiale submicrométrique. De plus, comme la diffusion Raman peut être décrite par un tenseur de polarisabilité, contrôler la polarisation de l'incident et la lumière détectée permet d'extraire des informations structurelles <sup>15</sup>.

### 1.2.2 Microscopie confocale Raman

La microscopie confocale Raman est une technique de spectroscopie vibrationnelle qui avait été utilisée pour sonder de manière optique les modifications moléculaires associées aux tissus malades <sup>174,175</sup>. Elle a été décrite pour la première fois en 1928 par deux chercheurs Indiens, Krishnan et Râman, qui ont reçu le prix Nobel deux ans plus tard <sup>176,177</sup>. La spectroscopie Raman, dont le principe repose sur un phénomène de diffusion, est une technique d'analyse sans contact, sans rayon, non destructive et sans aucune préparation de l'échantillon <sup>178</sup>, qui permet la collecte d'informations aussi bien quantitativement que qualitativement. L'effet Raman est basé sur l'interaction de la lumière avec les liaisons chimiques d'un échantillon. En raison des vibrations des liaisons chimiques, cette interaction provoque un déplacement d'énergie dans la lumière diffusée sur le dos qui apparaît comme un spectre Raman unique détecté par des méthodes spectroscopiques. Avec cette technique, les composés chimiques et moléculaires de l'échantillon sont identifiés et des caractéristiques supplémentaires telles que la quantité relative d'un composant spécifique, les états de contrainte et de déformation, la cristallinité ou les types de structures polymorphes peuvent être déterminées.

L'imagerie confocale Raman combine la spectroscopie Raman avec un microscope confocal. Ainsi, la distribution spatiale des composés et toutes les propriétés mentionnées précédemment dans un échantillon peuvent être visualisées. La microscopie confocale Raman haute résolution acquiert les informations d'un spectre Raman complet à chaque pixel de l'image et atteint une résolution latérale à la limite de diffraction (1/2 de la longueur d'onde d'excitation). La technique Raman est non destructive, non invasive et sans contact et sans étiquette <sup>179-181</sup>. Contrairement à la microscopie infrarouge (IR), l'imagerie Raman est une méthode standard applicable dans un environnement aqueux. Il présente de nombreux avantages par rapport à la microscopie à fluorescence <sup>182</sup> :

- Premièrement, la spectroscopie Raman ne nécessite aucun marquage externe et utilise la polarisabilité induite (dérivé du tenseur de polarisabilité par rapport aux coordonnées normales) comme contraste pour générer les spectres vibrationnels. Ainsi, les images Raman sans étiquette reposent sur le contraste fourni par les différents spectres vibrationnels dans diverses régions du tissu biologique.
- Deuxièmement, les signatures biochimiques des molécules sont beaucoup plus riches car chaque composant du tissu, comme les acides nucléiques, les lipides, les chromophores

biologiques et les protéines, fournit son propre modèle de comportement vibrationnel dans différentes régions spectrales.

En outre, la nouvelle génération de microscopes Raman peut offrir une puissante méthode d'analyse d'échantillons non destructive et sans contact. L'un des plus gros avantages est l'utilisation d'une conception de microscope Raman confocal<sup>179,183</sup>. Ce qui permet d'analyser une très petite zone ou un volume d'échantillon jusqu'à l'échelle micrométrique. La combinaison de cette analyse micro Raman et de la mise au point automatisée, le mouvement XYZ, permet la production d'images «chimiques» d'un échantillon avec une résolution spatiale plus élevée que jamais.

Associée à un système confocal, le microscope Raman autorise un balayage en profondeur avec un haut niveau de résolution. En effet, le microscope Raman focalise un faisceau laser vers le bas sur un petit volume de l'ordre du  $\mu\text{m}^3$ . Un mode confocal est obtenu en plaçant une ouverture à l'arrière du plan focal du microscope. Cette ouverture améliore à la fois la résolution latérale et axiale. Ce qui permet d'obtenir un profil non destructif en profondeur. La résolution en profondeur dépend de deux facteurs : le volume de spot du laser et la façon dont les photons passent par l'ouverture confocale du spectromètre. La résolution en profondeur est définie comme une différence entre la profondeur maximale et minimale de mise au point. La résolution en profondeur, DR est définie par la formule :

$$DR = \frac{2.2 n \lambda}{\pi (NA)^2}$$

Où  $n$  correspond à l'indice de réfraction du milieu d'immersion,  $\lambda$  à la longueur d'onde laser et  $NA$  à l'ouverture numérique de la lentille de focalisation. Pour un laser avec une longueur d'onde de 532 nm et un objectif de  $n = 1,46$   $NA = 1$ , la résolution en profondeur est calculée à 1553 nm. Il faut souligner que pour certains échantillons, la résolution en profondeur peut ne pas être constante sur l'ensemble de l'échantillon.

Par exemple pour les échantillons non homogènes (comme le cas du cartilage articulaire), la distribution de molécules spécifiques est importante. Ces informations peuvent être obtenues avec un microscope Raman qui fournit des images réalisées dans une bande

Raman caractéristique de la molécule d'intérêt. En imagerie Raman, les caractéristiques de diffusion intrinsèque d'une molécule spécifique sont utilisées pour visualiser la distribution de cette molécule dans un échantillon. Par conséquent, aucun marqueur extrinsèque n'est nécessaire, ce qui fait de la micro (spectro) scopie Raman une technique très utile pour « l'imagerie chimique » des cellules et des tissus vivants dans des conditions physiologiques. A ce titre, de nombreuses études ont été réalisées à partir de la microspectroscopie Raman sur des chromosomes<sup>184</sup>, cellules sanguines<sup>185,186</sup> et tissus<sup>187</sup>, ainsi que des images Raman d'échantillons biologiques<sup>188,189</sup>. Plus récemment, une étude conduite par Bergholt (2016) a mis en évidence de nouvelles zones dans le cartilage articulaire<sup>172</sup>.

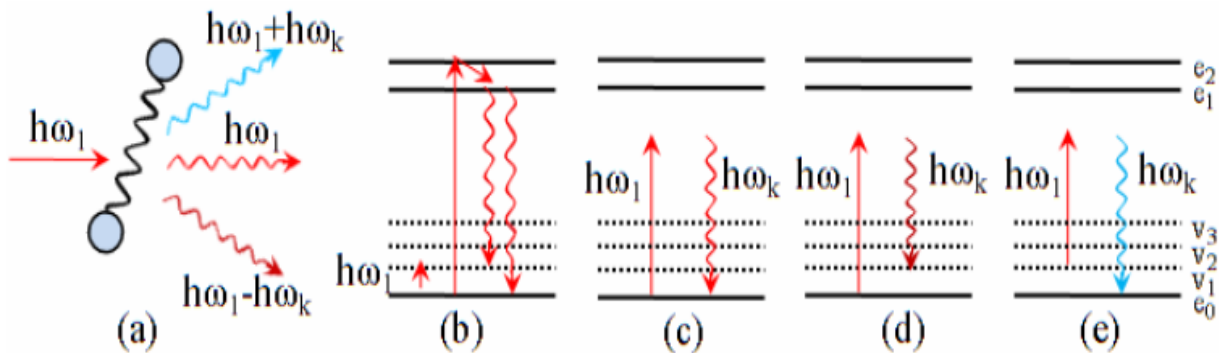
En raison de sa sensibilité, la microscopie confocale Raman apparaît comme le meilleur compromis pour étudier à la fois l'organisation structurale et la distribution spatiale des principaux marqueurs biochimiques au sein du cartilage articulaire et suivre la maturation du cartilage artificiel.

#### 1.2.2.1 Principe de diffusion Raman

La technique de diffusion Raman est basée sur différents types de diffusion de la lumière monochromatique, généralement à partir d'un laser dans le visible, le proche infrarouge ou le proche ultraviolet. Sur la figure 18, les diagrammes de niveau d'énergie moléculaire illustrent les processus de base impliqués dans la diffusion de la lumière et l'absorption de la lumière par les vibrations moléculaires dans la région infrarouge du spectre. L'état fondamental électronique et l'état excité électronique sont indiqués respectivement par  $e_0$  et  $e_1$ . Les états vibrationnels sont indiqués par  $v_1$ ,  $v_2$ ,  $v_3$ , etc.

Lorsque la lumière de fréquence  $\omega_1$  interagit avec la matière, la majeure partie de la lumière n'est pas affectée, seule une très petite fraction de lumière est diffusée (figure 18 (a)). Dans le Rayleigh, processus de diffusion de la lumière, un photon incident à la fréquence  $\omega_1$  interagit avec une molécule et aboutit à un photon diffusé qui a la même fréquence que le photon incident, mais peut-être une direction différente, figure 18 (c). Dans le cas où l'état final après diffusion n'est pas égal à l'état d'origine, par exemple du fait de la présence d'états de rotation ou de vibration dans les molécules, alors le processus de diffusion de la lumière s'accompagne d'un décalage de la fréquence  $\omega_k$  par rapport à la fréquence incidente. Ce type de diffusion de la lumière à partir d'états moléculaires est appelé diffusion Raman. La lumière diffusée Raman avec une fréquence inférieure à la fréquence incidente ( $\omega_1 - \omega_k$ ) est appelée diffusion Stokes

Raman (Figure 18 (d)) et la lumière diffusée Raman avec une fréquence plus élevée que la fréquence incidente ( $\omega_1 + \omega_k$ ) est appelée diffusion anti-Stokes Raman (Figure 18 (e)).



**Figure 20** : Diagrammes de niveau d'énergie moléculaire illustrant l'interaction des molécules avec les photons, (a) diffusion élastique et inélastique par la molécule, (b) absorption infrarouge et émission de fluorescence, (c) diffusion Rayleigh, (d) diffusion Stokes Raman et (e) Diffusion Raman anti-Stokes.<sup>190</sup>

Lorsqu'une molécule est excitée par un photon par un processus d'absorption, un photon peut être réémis pendant la relaxation d'énergie (figure 18 (b)). Ce processus est connu sous le nom d'émission de fluorescence, qui se produit principalement du côté Stokes de la fréquence d'excitation. Le délai entre le processus d'absorption et le processus d'émission correspond à la durée de vie de l'émission de fluorescence, qui est généralement de l'ordre de la nanoseconde. La distribution spectrale de l'émission de fluorescence moléculaire est donc généralement large. La bande d'émission enveloppe de nombreuses transitions qui se chevauchent, ce qui en pratique rend difficile la distinction des états vibrationnels. La réponse inhérente d'une molécule dans une expérience de diffusion Raman est d'environ 4 à 6 ordres de grandeur plus courte que dans un événement de fluorescence.

En conséquence, la distribution spectrale de la diffusion Raman se compose de raies d'émission étroites, qui révèlent directement la fréquence et la largeur de bande des modes normaux individuels de vibrations atomiques dans les molécules. La spectroscopie d'émission de fluorescence des chromophores naturels est une technique très informative, mais seul un nombre relativement faible de composés naturels dans les cellules sont réellement fluorescents. Cela peut être surmonté par l'utilisation de marqueurs fluorescents, qui doivent ensuite être attachés aux molécules d'intérêt. Les pics Raman sont spectralement étroits et peuvent dans de nombreux cas être associés à la vibration d'une liaison chimique particulière (ou d'un seul

groupe fonctionnel) dans la molécule <sup>191-194</sup>. Puisque toutes les molécules présentent un spectre de diffusion Raman unique, la microscopie Raman est une puissante technique d'imagerie chimique non invasive et sans étiquette. La micro-spectroscopie Raman et de l'imagerie Raman apparaît donc comme une technique analytique pour étudier la distribution des composés et des processus chimiques dans les cellules ou tissus.

#### 1.2.2.2 La Microscopie Confocale Raman et ses applications biologiques

Le corps humain est composé principalement d'eau, de protéines, d'acide nucléique, de lipides et de glucides. Par conséquent, tout changement dans l'organisme à la suite des maladies, entraînerait des modifications biochimiques de l'un ou l'ensemble de ces composants. En pathologie, il existe un besoin important d'étudier la structure et les modifications moléculaires dans les échantillons des tissus. Avec la microscopie Raman, l'intensité et le profil des pics Raman fournissent des indications sur les quantités relatives d'espèces chimiques présentes dans l'échantillon, ainsi que sur leurs environnements de liaison <sup>16</sup>. Si les spectres vibratoires sont sensibles à la structure de ces composants, ils doivent donc évoluer avec l'état malade.

En raison de sa sensibilité moléculaire, la spectroscopie Raman a d'abord été utilisée pour révéler les structures moléculaires de produits chimiques purs. Les premières études sur les cellules vivantes ont été réalisées à l'aide d'un spectroscope Raman couplé à un microscope <sup>195</sup>. Dès son introduction dans le domaine biomédical, la spectroscopie Raman a été utilisée pour caractériser les modifications dans la composition d'échantillons de cartilage articulaire à différents degrés de maladie (d'après le score de Mankin) <sup>196,197</sup>. A partir du pic à 1063 cm<sup>-1</sup> (étirement symétrique du mode vibrationnel au sulfate), ils ont pu quantifier la teneur en protéoglycanes (notamment l'aggrécane) dans le cartilage, dont la diminution associée à l'arthrose. Certains auteurs utilisant la microscopie Raman ont été capables de suivre les changements biochimiques se produisant dans le cartilage articulaire au cours du vieillissement et/ou de l'ostéoarthritis <sup>198</sup>, et caractériser la morphologie interne du tissu cartilagineux <sup>172</sup>.

Les applications biomédicales de la technologie Raman ont augmenté de manière explosive ces dernières années, passant l'étude de la structure des protéines et de l'ADN <sup>199</sup>, aux activités chimiques tant au niveau cellulaire que tissulaire, le diagnostic du cancer et la recherche sur les médicaments <sup>200,201</sup>.

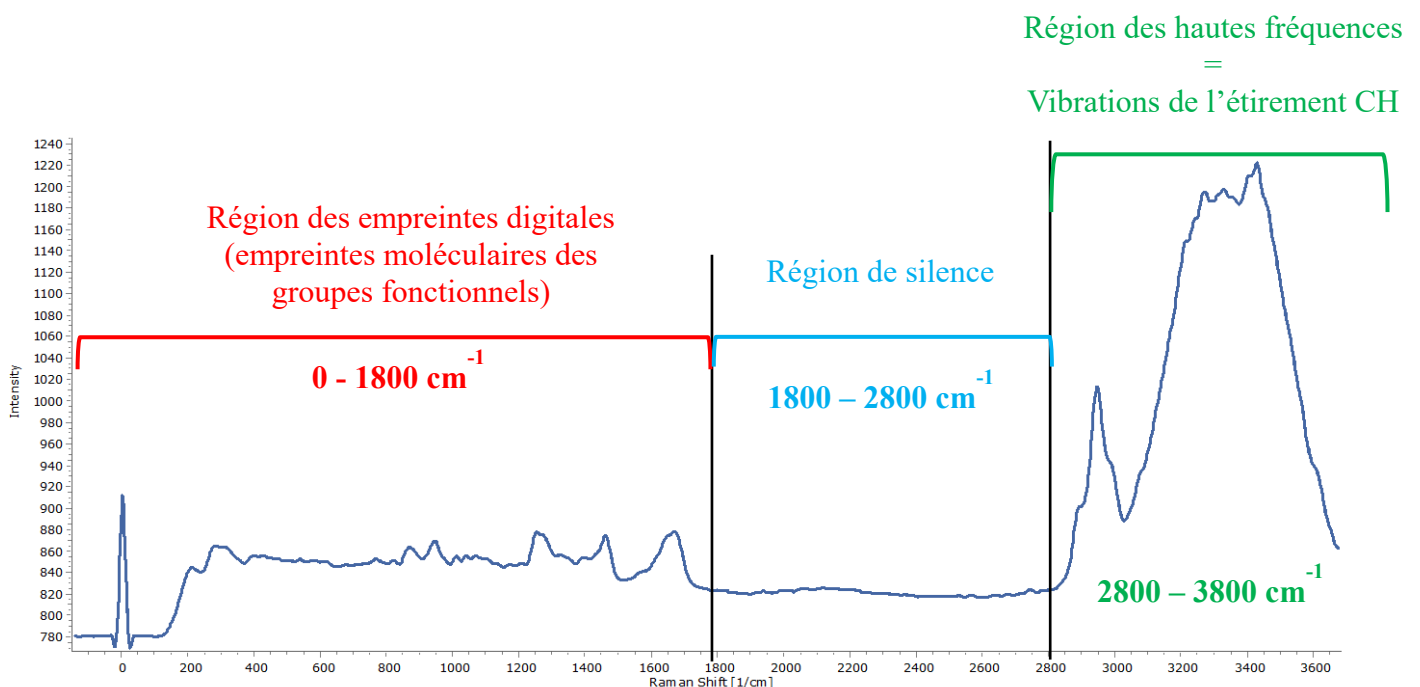
De façon pratique, les spectres Raman renseignent sur l'organisation locale selon le type de liaison chimique et le mode de vibration au travers des formes des pics. La première

information donnée par la microscopie Raman concerne la nature des liaisons chimiques et le transfert de charge. L'intensité est très faible pour des liaisons ioniques et forte pour des liaisons covalentes, d'autant plus que le nombre d'électrons mis en jeu dans la liaison chimique est élevé. Ainsi, plusieurs renseignements peuvent être collectés à partir d'un spectre Raman <sup>178,202</sup>, telles que :

- Sa position dans le spectre (reliée à la fréquence d'un mode de vibration et renseigne sur les espèces chimiques en présence),
- Son intensité (qui peut être relié à la concentration de l'espèce),
- La largeur des pics à mi-hauteur qui fournit des informations sur la structure,
- Son état de polarisation (renseigne sur la symétrie du mode correspondant),
- Son profil (qui permet l'étude de mouvements ou d'interactions en phases considérées)
- Leur déplacement qui est fonction de l'état de contrainte et/ou de température.

Les vibrations sont spécifiques à la liaison moléculaire, ce qui permet de construire une empreinte biochimique de l'échantillon <sup>203</sup>. Ainsi, chaque échantillon biologique présente un motif spectral typique en raison de leur composition biochimique inhérente <sup>204</sup>. Il est important de noter que, selon que la longueur ou l'angle de la liaison change, les vibrations sont subdivisées en deux classes :

- Étirement (symétrique et asymétrique)
- Flexion (ciseaux, balancement, rotation et torsion)



**Figure 21 :** Spectre Raman typique du cartilage articulaire et ses différentes régions vibratoires



Un spectre Raman peut être divisé en trois parties comme indiqué sur la figure 21 :

- La région  $< 1800 \text{ cm}^{-1}$ , correspondant aux empreintes digitales ou empreintes moléculaires des groupes fonctionnels,
- La région de  $1800$  à  $2800 \text{ cm}^{-1}$  encore appelée région silencieuse et,
- La région  $> 2800 \text{ cm}^{-1}$ , correspondant à la région des hautes fréquences ou vibrations de l'étirement C-H.

Il est intéressant de noter que les empreintes moléculaires des groupes fonctionnels peuvent être trouvées aussi bien en dessous de  $1800 \text{ cm}^{-1}$  et au-delà de  $2800 \text{ cm}^{-1}$ , ce qui est dominé par les vibrations d'étirement C-H. La région vibratoire CH ( $2800 - 3800 \text{ cm}^{-1}$ ) présente un intérêt particulier pour les études spectroscopiques, car elle fournit des informations sur les compositions chimiques des échantillons en raison des différences dans l'environnement des liaisons CH <sup>13</sup>.

Toutes organisations des liaisons chimiques et leurs perturbations sont transcrites par la forme des pics. Les bandes spectrales (position des pics) dans les spectres vibratoires sont spécifiques aux molécules et fournissent des informations directes sur la composition biochimique.

Dans le cartilage articulaire, les bandes Raman sont caractérisées par quatre modes vibratoires représentés par :

- Les structures d'amide III ( $1200-1280 \text{ cm}^{-1}$ ) ;
- Les modes de flexion des liaisons C-H ( $1447-1452 \text{ cm}^{-1}$ ) ;
- Les structures d'amide I ( $1600-1720 \text{ cm}^{-1}$ ) ;
- Les modes d'étirement de la liaison C-H ( $2840-2986 \text{ cm}^{-1}$ )

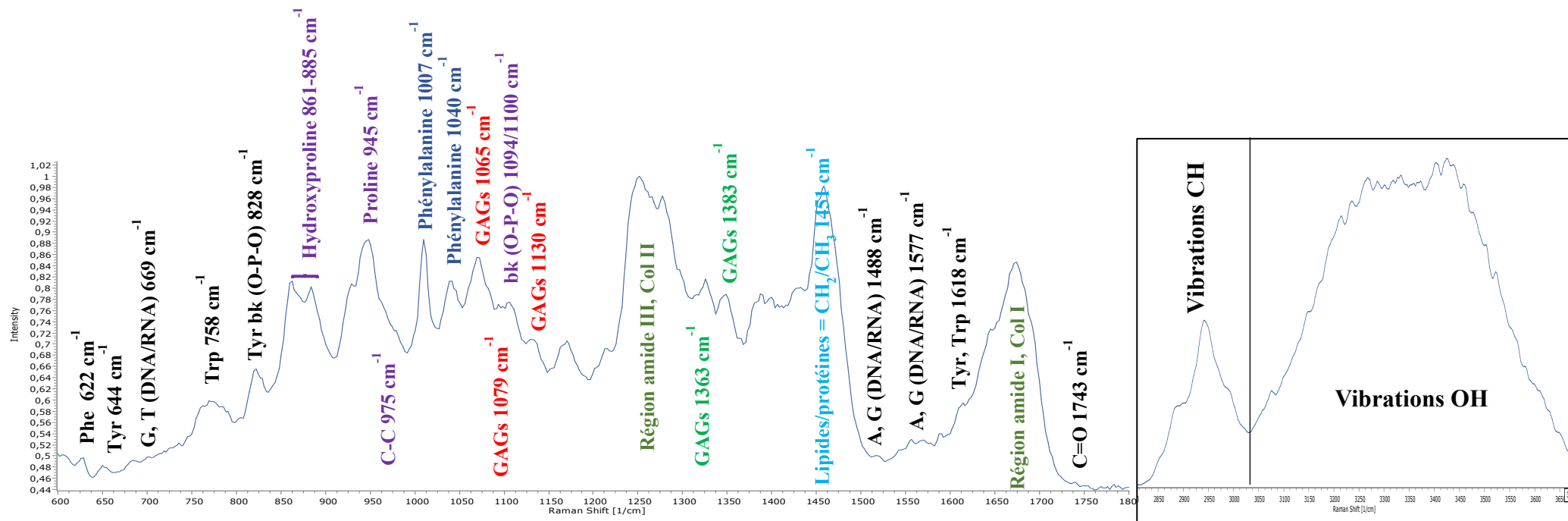


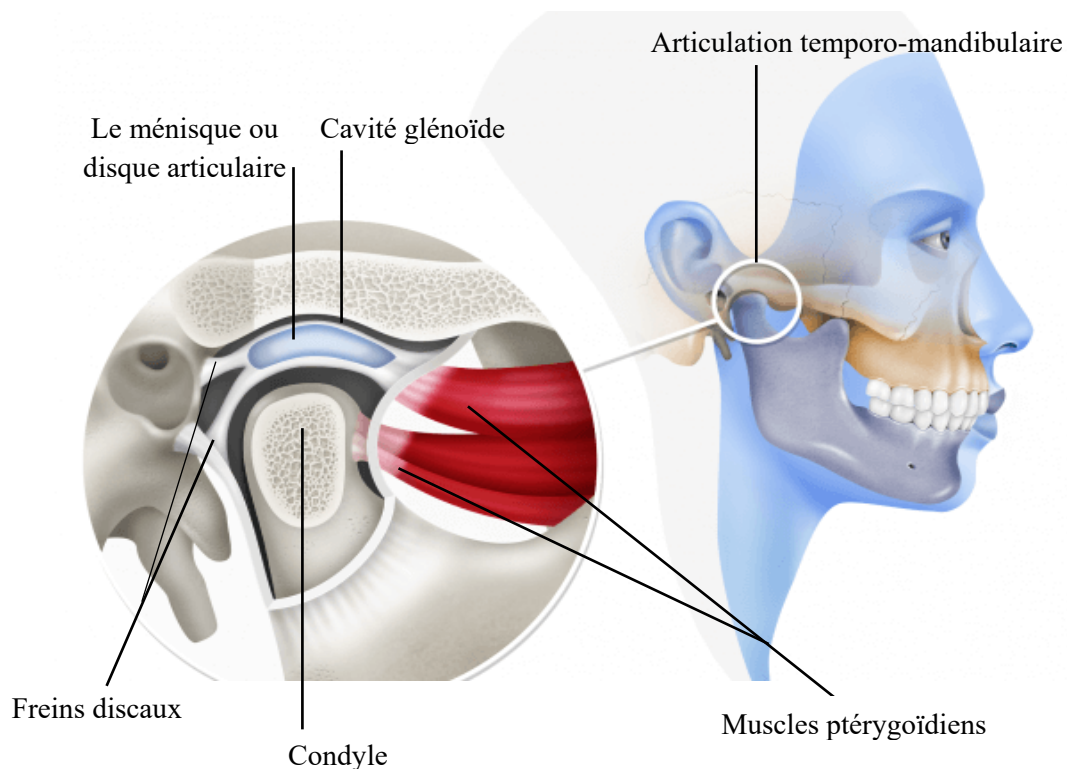
Figure 22 : Spectre Raman caractéristique du cartilage articulaire. Bandes Raman dans la région de 600 à 1800  $\text{cm}^{-1}$  et 2800 à 3670  $\text{cm}^{-1}$

Pics Raman (cm <sup>-1</sup> )	ASSIGNATIONS MOLECULAIRES		
	ADN/ARN	Protéines	Lipides
622		C-C tw, Phe	
644		C-C tw, Tyr	
669	G, T		
758		Trp	
787	U, T, C ring br, O-P-O stretch		
828	O-P-O stretching	Tyr	
857		$\nu(\text{C-C})$ , Pro, Hydro, Tyr (Col I)	
878		$\nu(\text{C-C})$ , Hydro, Trp	C-O-C ring / C-C-N <sup>+</sup> sym str
885		(C-O-C) skeletal mode	
937		C-C stretching, $\alpha$ -helix	C-O-C glycodides
946		$\nu(\text{C-C})$ stretch backbone	
975	Ribose vibration	C-C backbone	= CH bending
1007		$\nu_s(\text{C-C})$ Phenylalanine	
1040		C-H in-plane Phe	
1063	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> stretching	C-C sk str random conform	$\nu_s(\text{S=O})$ (GAG)
1079	C-C or PO <sub>2</sub> str		$\nu(\text{C-C})$ or $\nu(\text{C-O})$
1094	Phosphodioxy (PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) groups		$\nu(\text{C-C})$ -lipids
1130		C-N stretching	$\nu(\text{C-C})$ sk of acyl bk/ C-O str
1155		C-C, C-N stretching	
1171		$\delta(\text{C-H})$ , Tyr or Phe	
1205/7		$\nu(\text{C-C}_6\text{H}_5)$ , Trp, Phe, Hydro, Tyr	
1246		Amide III $\nu(\text{C-N})$ and $\delta(\text{N-H})$	
1271		C-N stretch /Amide III ( $\alpha$ -helix)	$\delta$ (=C-H) (phospholipids)
1308		CH <sub>3</sub> /CH <sub>2</sub> tw, wag &/or bend	C-N asym str/ CH <sub>3</sub> /CH <sub>2</sub> tw, wag
1338	A, G (ring breathing)	Trp, $\delta$ (CH <sub>3</sub> ) $\delta$ (CH <sub>2</sub> ) twisting	
1345	G	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> wagging	CH deformation
1363	G	Trp	
1383		CH <sub>3</sub> band	$\delta$ (CH <sub>3</sub> ) symmetric $\nu\text{COO}^-$
1407			
1421	A, G, CH deformation	CH deformation	CH deformation/ CH <sub>2</sub> scissoring
1450		$\delta(\text{CH}_2)$ deformation	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) scissoring
1484/8	G, A (ring breathing modes)		
1554		$\nu(\text{C=C})$ , Trp, $\nu(\text{CN})$ & $\delta$ (NH) amide II	COO <sup>-</sup>
1560/8	G, A (ring breathing modes)	Trp, Tyr, amide II	COO <sup>-</sup>
1577	G, A (ring breathing modes)		
1587/90		Phe, Hydroxy	$\nu(\text{C=C})$ aromatic ring (Phe, Tyr)
1611/8		$\nu(\text{C=C})$ , Trp, Tyr	
1656	T, G, C (ring breathing modes)	Amide I ( $\alpha$ -helix)	$\nu(\text{C=C})$ cis
1668		Amide I $\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=C})$ trans
1743			$\nu(\text{C=O})$
2806-3035		C-H vibrations	CH <sub>2</sub> symmetric stretch
3032-3670		$\nu(\text{OH})$	

**Tableau II : Table des pics Raman du cartilage articulaire.** Abréviations: (p) Protéine, (l) Lipide, (d) ADN / ARN, (A) Adénine, (T) Thymine, (G) Guanine, (C) Cytosine, (U) Uracile, (Phe) Phénylalanine, (Tyr) Tyrosine, (Trp) Tryptophane, (bk) Backbone, (Def) Déformation, (Tw) Twist, (Sym) Symmetric, (asym) Asymmetric et (Str) Stretching, (Rand) Random (Bergholt et al, 2017 ; Matthiew et al,2010)

### 1.2.3 Impacts sur la sphère oro-faciale

Directement impliquée dans l'élaboration et le contrôle du mouvement mandibulaire, l'articulation temporo-mandibulaire (ATM) est en prise directe avec l'expression de la plupart des composants du comportement manducateur. L'ATM est considérée comme l'articulation la plus mobile de toutes les articulations humaines. Il s'agit d'une double articulation condylienne ou diarthrose bicondylienne paire, symétrique, agrémentée d'un ménisque, dont, en réalité, les deux arcades dentaires en font une articulation temporo-maxillo-dentaire (Frey) ou encore une articulation cranio-bicondylo-occlusale (Gola). Sa dynamique est coordonnée par le système neurosensoriel <sup>205</sup>. Contrairement aux autres articulations de l'organisme, l'ATM est une articulation bicondylaire à surfaces convexes et à disque interposé. Elle a pour fonction essentielle de permettre les mouvements, notamment les mouvements d'élévation et d'abaissement de la mandibule, les mouvements de diduction (Chung Kau How, 2004), ce qui permet à l'appareil manducateur d'entrer en jeu afin d'en assurer les fonctions de mastication, de déglutition, de phonation, etc... L'étude de son organisation et de ses manifestations cliniques est très importante pour identifier les pathologies inflammatoires dégénératives (arthrite traumatique aigue, arthrite rhumatoïde, ostéoarthrite, etc..) y afférentes.



*Figure 23 : Mise en évidence de l'ATM et son disque*

### 1.2.3.1 Caractérisation du disque articulaire de l'ATM

Le disque articulaire est un composant essentiel de l'ATM. Anatomiquement, le disque articulaire se situe entre le processus condyloïde et la cavité glénoïde. Il est de nature fibrocartilagineux, responsable de la résolution de l'ajustement incongru entre les deux surfaces articulées et renforce ainsi la stabilité de l'articulation. Sur le plan immunohistochimique, le disque articulaire de l'ATM est constitué d'un mélange de cellules de type fibroblastique et de chondrocyte qui sécrètent une matrice extracellulaire faite principalement de collagène de type I contrairement au collagène de type II trouvé dans le cartilage hyalin <sup>206</sup>, de glycosaminoglycanes, notamment le sulfate de chondroïtine et le sulfate de dermatane qui y sont en quantité significativement plus faible que dans le cartilage hyalin.

De forme semblable à une lentille biconcave aplatie verticalement avec un bourrelet périphérique et un centre aminci, le disque permet de séparer, protéger et stabiliser le condyle dans la fosse mandibulaire pendant les mouvements fonctionnels. Il partage l'articulation synoviale en deux compartiments l'un supérieur dit disco-temporal et l'autre inférieur dit condylo-discal. Chacun de ces compartiments est le siège de mouvements particuliers au cours des mouvements mandibulaires <sup>207</sup>. Le fonctionnement de cette articulation est compliqué du fait qu'il existe deux ATM ne fonctionnant pas de manière symétrique, mais en synergie l'une par rapport à l'autre. Dépourvu de fibres nerveuses et de vaisseaux sanguins, cette composition lui permet de résister à de lourdes forces sans créer de stimulations douloureuses. En raison de ses propriétés viscoélastiques, le disque articulaire aide à la répartition des charges soumises au niveau de l'ATM <sup>208</sup>.

L'architecture fibreuse du ménisque est très particulière : elle évolue avec la croissance par une densification progressive, passant d'un stade de tissu conjonctif assez lâche à un tissu constitué de faisceaux très serrés, fortement imbriqués les uns avec les autres, lui permettant ainsi de résister à des forces de compression de  $180 \text{ Kg/cm}^2$ , pouvant aller jusqu'à  $220 \text{ Kg/cm}^2$ . <sup>209</sup>. Il adhère à la face profonde de la capsule articulaire par les ligaments méniscaux antérieurs et postérieurs. Les mouvements du ménisque sont solidaires du condyle grâce à ces ligaments, ainsi qu'une partie des fibres du muscle ptérygoïdien latéral qui trouve leur origine sur la partie antérieure du ménisque. Le disque avec la synoviale intervient pour réduire les effets du frottement aux contacts.

### 1.2.3.2 Troubles de l'ATM (dégradation du disque)

L'ATM est l'articulation la plus complexe, mais fragile de l'organisme, amenée à supporter des pressions incroyables. L'articulation temporo-mandibulaire (ATM) est depuis longtemps établie comme une source de pathologie <sup>210</sup>. Les dysfonctionnements patho-anatomiques de l'ATM ont été définis comme des troubles temporo-mandibulaires (TMD). Les surfaces articulaires de l'ATM sont très incongrues et sont constituées de fibrocartilage et non de cartilage hyalin comme les autres articulations synoviales. L'ATM est sujet à des changements dégénératifs, bien que l'os temporal et l'espace articulaire supérieur subissent généralement moins de dégénérescence que le condyle mandibulaire et l'espace articulaire inférieur. Des changements dégénératifs locaux et étendus peuvent survenir. Lorsque des modifications locales se produisent, l'aspect latéral du tubercule articulaire de l'os temporal est le plus susceptible d'être affecté, mais aucune partie du condyle mandibulaire n'est plus à risque. Des changements importants peuvent aboutir à une perte totale de cartilage articulaire. L'arthrose (OA) de l'articulation temporo-mandibulaire (ATM) est une maladie dégénérative caractérisée par la perte du réseau de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage condylien mandibulaire, qui affecte l'os sous-jacent et les composants musculo-squelettiques environnants. L'ATM subit régulièrement des troubles variés qui surviennent le plus souvent chez les adultes.

Dans de nombreux rapports, il est rapporté qu'environ un quart de la population présente un trouble de l'articulation temporo-mandibulaire (TATM). D'autres rapports annoncent qu'entre 3,6 et 7% de la population ont une TATM suffisamment importante pour être traitable <sup>211,212</sup>, mais seulement 3-4% des gens recherchent un traitement <sup>213</sup>. Une méta-analyse réalisée par Al-Jundi et ses collaborateurs en 2008 a estimé à 16% les besoins de prise en charge des TATM chez les adultes <sup>214</sup>. Actuellement, les dentistes et les physiothérapeutes fournissent des services aux patients pour TATM.

### 1.2.3.3 Relation entre l'occlusion et l'ATM

Si l'ATM est une entité anatomique en elle-même, dans son fonctionnement, elle appartient à l'appareil stomatognathique et les mouvements à son niveau ne sont en fait que la conséquence des déplacements dentaires d'où l'importance de l'occlusion. Son efficacité dépend de l'harmonie et de l'équilibre de tous ses différents composants. Par conséquent, la moindre pathologie à ces niveaux peut entraîner de graves perturbations tant physique <sup>215,216</sup> que psychique, et parfois même esthétique.

Selon Blum Charles <sup>217</sup>, la présence de troubles de l'articulation n'est pas systématiquement liée à l'existence d'anomalies occluso-posturales. A l'inverse, un trouble de l'ATM affecte la position du disque articulaire et la trajectoire de la mandibule pendant les mouvements d'ouverture et de fermeture buccale et, peut avoir des répercussions sur la manière dont les dents s'articulent avec leurs antagonistes <sup>218</sup>. A l'inverse, des désordres occlusaux tels que des restaurations dentaires mal ajustées peuvent provoquer une altération du disque articulaire. Ces caractéristiques occlusales participent d'abord à la bonne stabilité intra- et interarcade, ce qui est remarquable sur le plan clinique. Les contacts dento-dentaires doivent permettre une distribution des efforts selon le grand axe des dents. Ainsi, la relation entre l'occlusion et l'ATM peut être mise en évidence au cours de l'examen clinique conduit par un chirurgien-dentiste. C'est pourquoi, il apparaît indispensable que lors du rétablissement de cette occlusion par le chirurgien-dentiste, non seulement de rétablir la physiologie en respectant les courbes de Spee et de Wilson, mais en plus d'enregistrer des informations concernant les patients quand cela est possible (d'où l'intérêt de l'interrogatoire lors de l'examen clinique), afin de rester le plus proche possible de l'occlusion d'origine et d'éviter une désorganisation de l'ATM et par conséquent de l'appareil stomatognathique.

#### 1.2.3.4 Intérêt de l'étude dans la pratique odontologique

Les fonctions les plus importantes de l'articulation temporo-mandibulaire (ATM) sont la mastication et la parole et sont d'un grand intérêt pour l'odontologiste. Cet intérêt découle des points de vue de la structure, de la fonction, de la symptomatologie, de la pathologie, de l'imagerie et de l'adaptabilité. L'ATM est une articulation bicondylienne semblable aux autres articulations de l'organisme, telle que l'articulation du genou. Cependant, les caractéristiques qui différencient et rendent cette articulation unique sont sa surface articulaire couverte par du fibrocartilage au lieu de cartilage hyalin. Le mouvement n'est pas seulement guidé par la forme des os, des muscles et des ligaments, mais aussi par l'occlusion des dents, puisque les deux articulations sont reliées par un seul os mandibulaire et ne peuvent pas se déplacer indépendamment l'une de l'autre.

L'occlusion est la manière dont les dents maxillaires s'engrènent avec les dents mandibulaires. Autrement, il s'agit du rapport d'équilibre de 2 systèmes : système crânio-sacré et système mandibulaire. Selon Clauzade et ses collègues <sup>219</sup>, ces deux (2) systèmes ne sont pas indépendants l'un de l'autre, ils participent à l'homéostasie générale et vont donc trouver des zones d'adaptation et plus tard de compensation. Ainsi, dans les cas de serrement constant des



dents ou bruxisme fait que ces excitations fallacieuses deviennent permanentes. Les structures incriminées n'ayant plus la possibilité temporelle de s'adapter décompensent et les troubles cliniques apparaissent.

Les dents des secteurs latéraux ont une morphologie occlusale comportant des cuspidés et des fosses. L'inclinaison des pans cuspidiens et l'anatomie de la face occlusale (masticatrice) ont un rapport très précis avec la forme de la cavité articulaire. Cet engrenement ou occlusion dentaire détermine la position de la mandibule par rapport au crâne et, par conséquent, la position des deux condyles à l'intérieur des cavités articulaires. Les buts de l'odontologiste seront, entre autres de :

- Déceler les symptômes dont la cause est une dysharmonie du système stomatognathique ;
- Faire le diagnostic étiologique ;
- Aborder le traitement de la façon la plus simple ;
- Réaliser des reconstructions dentaires en harmonie avec l'anatomo-physiologie du système.

En cas de troubles de l'occlusion ou des articulations temporo-mandibulaires (ATM), une étude détaillée de la statique et de la dynamique du système manducateur par le chirurgien-dentiste, associée à une étroite collaboration avec un ostéopathe qualifié permet de définir quels sont les paramètres d'un point de vue crânien et postural qui conviennent le mieux au patient, en vue de la rééducation de ses articulations temporo-mandibulaires au moyen d'une orthèse.

Longtemps l'occlusion est considérée comme la référence principale du système manducateur<sup>219</sup>, à cause du fait que les dents entrent en contact et ont une fonction masticatoire. A cet effet, l'étiopathologie du dysfonctionnement cranio-mandibulaire a été associée à l'occlusale<sup>219,220</sup>. Ce syndrome occlusal se révèle soit par une usure dentaire, soit par des spasmes musculaires douloureux, soit par un dérangement interne de l'articulation temporo-mandibulaire, soit par les uns et les autres en même temps.

Dans le domaine qui nous intéresse, certaines mesures peuvent être prises directement sur le patient, telles que l'information spatiale fournie par les dents et distribuée au niveau de leurs faces occlusales et donc au niveau des plans d'occlusion. En effet, les dents doivent être d'abord examinées dans leur organisation générale, par rapport à leur référentiel neuronal qui est l'orthogonalité, etc...) Ainsi, le rôle de l'odontologiste visera à maintenir les arcades dentaires dans un état qui leur permet d'exercer une fonction d'occlusion correcte afin d'éviter des troubles fonctionnels.

En cas de dommages graves du disque articulaire, la seule alternative thérapeutique actuelle est le traitement chirurgical, en cas d'échec de la prise en charge médicale <sup>221</sup>. Des preuves radiologiques ont cependant, mis en évidence l'existence d'ostéoarthrose après ces interventions <sup>222</sup>. Devant l'insuffisance des différentes approches thérapeutiques, le recours à la médecine régénérative, sous sa forme de l'ingénierie tissulaire, constitue une alternative prometteuse pour la prise en charge des lésions du disque articulaire de l'ATM. A l'instar de l'étude de Puelacher, de nombreuses études sont en cours pour caractériser les facteurs susceptibles d'améliorer la différenciation chondrogénique de cellules, mais aussi pour comprendre les signaux moléculaires et environnementaux qui favoriseraient la différenciation chondrogénique et aideraient à optimiser les applications d'ingénierie tissulaire de ces cellules.

A ce jour, la recherche d'une source cellulaire idéale est sans doute l'un des plus grands défis dans les efforts de régénération d'un disque fibrocartilagineux, mais également l'application des techniques innovantes telles que la microscopie confocale Raman, contribuerait énormément aux efforts de construction de disque articulaire par ingénierie tissulaire. Le disque ATM est une structure unique au niveau cellulaire et tissulaire. L'utilisation de cellules compétentes avec un échafaudage approprié et la fourniture à cette construction des indices moléculaires nécessaires peuvent permettre une régénération sur mesure d'un disque articulaire fibrocartilagineux de l'ATM qui reflète la structure pré-lésée. Par conséquent, caractériser les signaux moléculaires et environnementaux qui conduisent à la différenciation de la population fibrochondrocytaire serait d'un gros avantage pour atteindre cet objectif.

En somme, l'ingénierie tissulaire des tissus fonctionnels de l'ATM est une technologie prometteuse pour le traitement des troubles de l'ATM (TMD), ce qui pourrait améliorer la vie de millions de personnes. En raison des modèles complexes de chargement que les tissus manipulés expérimentent dans l'ATM, les paramètres de conception complets des tissus indigènes sont essentiels. Au sein de l'ATM, le disque fibrocartilagineux a reçu le plus d'attention jusqu'à présent, mais des efforts sont en cours pour l'ingénierie du cartilage du condyle mandibulaire. L'implantation de tissus artificiels peut aider à soulager la douleur, à restaurer la plage de mouvement et ramener le patient à la fonction normale de la mâchoire. L'impact potentiel d'un remplacement biologique de l'ATM est encore plus important étant donné l'absence significative d'options de traitement à long terme pour les patients atteints de TDM.

### 1.3 Problématique

Face à la difficulté du cartilage à cicatriser et à se régénérer, les recours en termes de prise en charge sont désormais orientés vers des thérapies cellulaires. Cette dernière approche s'intègre dans un domaine plus vaste, celui de l'ingénierie tissulaire, qui fait appel à des compétences pluridisciplinaires dans les sciences physiques (biomécanique), les sciences chimiques (biopolymères), les sciences pour l'ingénieur, les sciences du vivant (biologie cellulaire et moléculaire) et la médecine. La régénération des tissus endommagés du cartilage dans les différentes situations pathologiques et inflammatoires constitue dès lors un défi majeur à atteindre. Les tentatives d'ingénierie tissulaire, qui ont progressé de manière significative, peinent encore à produire un tissu de remplacement du cartilage avec des structures et des propriétés mécaniques appropriées pour fonctionner correctement *in vivo* à la surface articulaire. Les études d'ingénierie tissulaire du cartilage, bien qu'abondantes, sont souvent contradictoires et laissent beaucoup d'incertitudes dans les critères de conception <sup>21</sup>, car les défis rencontrés par le cartilage artificiel pour une application sont très différents de ceux rencontrés par le cartilage artificiel pour l'autre application. De plus, les statuts des investigations animales précliniques et de la traduction clinique du cartilage artificiel sont également à des niveaux différents pour chaque application <sup>223</sup>.

Malgré tous les progrès de la technologie des cellules souches et des biomatériaux et l'invention de divers systèmes de bioréacteurs, peu de choses ont progressé au-delà de cet événement scientifiquement historique. La plupart des constructions ne parviennent pas à se développer au-delà d'un néocartilage immature et inflexible qui manque de la durabilité essentielle à la plupart des applications cliniques. La stagnation de la traduction en pratique clinique peut être imputée à un certain nombre de raisons entre autres, la faible capacité de migration des chondrocytes qui pourrait être responsable de l'infiltration ralentie du tissu de réparation dans l'environnement de l'hôte. Aussi, les taux naturellement lents de production de MEC de chondrocytes pourraient-ils ralentir l'intégration, ainsi que les disparités dans l'organisation de la matrice néocartilagineuse par rapport à la disposition zonale du tissu cartilagineux natif <sup>4,224</sup>. Par ailleurs, la dédifférenciation des cellules chondrogéniques est un autre problème, probablement à cause de la nature hautement fibreuse du néocartilage produit, ce qui suggère que les cellules peuvent au fil du temps se dédifférencier en fibroblastes ou se différencier de manière incomplète en chondrocytes.

Il est évident que si nous ne savons pas de quoi le cartilage est fait, il nous sera difficile de savoir si nous avons créé un cartilage? Par conséquent, une étude approfondie de l'ingénierie

tissulaire permettrait de caractériser le contenu et la distribution des composants principaux de la matrice cartilagineuse (collagène et des protéoglycanes), en plus d'obtenir des propriétés mécaniques et de caractériser les marqueurs à titre de validation. En plus de la validation, les études d'ingénierie tissulaire doivent examiner la structure et la fonction du cartilage pour une conception plus stratégique des expériences<sup>21</sup>. Il est connu que la capacité du cartilage à remplir ses diverses fonctions est directement liée à son organisation zonale complexe en fonction de la profondeur. La plupart des études sur la morphologie et la biologie du cartilage articulaire décrivent une structure élaborée et hautement ordonnée, constituée principalement de trois zones : superficielle, moyenne et profonde, selon la forme différente des cellules, la composition biochimique de la MEC et l'orientation des fibrilles de collagène. Le collagène et les PGs doivent être examinés car ils constituent les composants principaux de la matrice du cartilage et sont connus pour contribuer à la performance mécanique. Ainsi, les études mécaniques devraient quantifier le module de traction et la résistance du tissu en différents endroits et directions.

Longtemps, les études réalisées pour étudier la composition et la qualité du cartilage articulaire sont généralement effectuées par des méthodes invasives et destructrices telles que des techniques immunohistologiques, moléculaires et/ou biochimiques. Ces méthodes restent qualitatives et semi-quantitatives et requièrent des marquages. Aussi, ne sont-elles pas facilement accessibles pour des analyses approfondies et précises des distributions des composants de la matrice du cartilage<sup>7,8</sup>. De plus, la quantification biochimique du collagène et des GAGs fournit un aperçu de la répartition dépendante de la profondeur des constituants majeurs de la MEC, mais reste limitée dans la résolution spatiale qui peut être obtenue de manière fiable. Il nous a donc semblé nécessaire d'explorer d'autres méthodes non invasives et non-destructrices, car celles-ci permettent non seulement l'observation de la formation de tissus, mais aussi les changements dans le type de phénotype cellulaire, basés sur la microscopie chimique, telle que la spectroscopie confocale Raman.

L'application de toutes ces nouvelles technologies utilisées dans le cadre de notre étude, constitue un avantage pour étudier le tissu cartilagineux dans ses moindres détails aux échelles micro et nanométrique et anticiper ainsi sur la conception de dispositifs qui soient utilisables dans la pratique clinique.

## **2 METHODES EXPERIMENTALES**

L'objectif principal de notre étude était de suivre la maturation du cartilage produit par ingénierie tissulaire à partir de la microscopie confocale Raman. Ainsi, notre démarche scientifique a consisté à :

Premièrement valider notre protocole d'étude : méthodes de traitement et de préparation des échantillons, techniques d'analyse et traitements des données spectrales Raman.

Secondairement, évaluer les phénomènes de différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines et à l'inverse la dédifférenciation des chondrocytes à partir de la microscopie confocale Raman.

Enfin, établir une cartographie des principaux marqueurs biochimiques de la matrice du cartilage articulaire nécessaires au bon fonctionnement du cartilage articulaire suivant les différentes régions de la matrice du cartilage en fonction des trois zones et afin différencier le cartilage normal du cartilage dégradé.

## 2.1 Source des échantillons

Trois (3) sources d'échantillons ont été utilisées dans le cadre de nos expérimentations :

Le premier groupe était constitué de cartilages articulaires prélevés sur des rats et qui ont servi à la mise au point de nos protocoles. Cette expérimentation a permis d'évaluer non seulement les différentes techniques et matériels nécessaires ou indispensables, mais également à apprécier les difficultés liées à la conduite et optimiser ainsi nos protocoles.

Le second groupe d'échantillons était constitué par les cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) et des chondrocytes (extraits par des techniques enzymatiques). Ces différentes cellules mises en culture nous ont permis d'évaluer les caractéristiques sous-jacentes au développement de tissu cartilagineux par ingénierie tissulaire, en particulier la formation et la maturation du cartilage, mais les phénomènes de dédifférenciation des chondrocytes, respectivement.

Enfin, la dernière source était constituée des explants de cartilages articulaires humains (sain et dégradé) prélevés sur des patients venus consultés au CHU de Montpellier. Ces explants de cartilage ont été obtenus pour des fins de recherche avec le consentement du donneur et l'approbation du comité d'éthique appropriée du CHU de Montpellier. Ces échantillons de cartilages ont permis non seulement d'évaluer la structure de la matrice du cartilage articulaire et d'en établir une cartographie des principaux marqueurs biochimiques suivant les différentes régions en fonction des zones, mais aussi différencier le cartilage sain du dégradé.

## 2.2 Préparation des échantillons pour les mesures microscopiques

La préparation de nos échantillons s'est déroulée en deux étapes :

- Méthode de fixation et de congélation des échantillons
- Méthode de fixation des échantillons sur la lame CaF<sub>2</sub>

### 2.2.1 Méthode de fixation et congélation des échantillons

Les objectifs de la fixation sont de :

- ✓ Précipiter les macromolécules, de préférence à leurs sites chez l'animal vivant intact, mais si cela n'est pas possible, à leurs sites dans les tissus de l'animal mort;
- ✓ Empêcher les changements de forme ou de taille de toute partie du tissu;
- ✓ Maintenir ses réactions chimiques à leurs équilibres dans la vie;
- ✓ Tuer les organismes qui provoqueraient sa décomposition;
- ✓ Conserver le tissu pendant longtemps <sup>8</sup>.

En sommes, la fixation peut empêcher la délocalisation des molécules et particules qu'elles précipitent, telles que les protéines et le glycogène. Pour la circonstance, tous nos échantillons ont été fixés en appliquant la technique de fixation développée par le Dr. Tadafumi Kawamoto (Université Tsurumi, Yokohama, Japon) en 1981 et mis en œuvre en 1990 <sup>225</sup>. Cette technique avait pour but de produire des sections complètes très minces à partir de tissus durs et de gros spécimens. La méthode a été appliquée à de nombreux types d'échantillons tels que les animaux expérimentaux, les poissons, les insectes et les plantes (*Figure 22*). Les avantages majeurs de cette technique résident dans le fait qu'elle favorise la réalisation des sections sans distorsion avec une quasi-conservation parfaite de tous les composants tissulaires.

De façon pratique et selon la disponibilité des équipements et le contexte expérimental, quelques modifications ont été apportées à certaines conditions et procédures de fixation et de coupe telles que décrites par Kawamoto. Tous les échantillons de cartilage dans notre étude ont d'abord été congelés dans de l'hexane (-94°C) refroidi dans un appareil de refroidissement (Neocool Bath, Yamato, Japon). L'échantillon congelé a été par la suite immergé dans un récipient en acier inoxydable puis recouvert d'un gel de carboxyméthylcellulose (CMC) à 5% afin de l'enrober. La particularité du gel CMC 5%, contrairement à la paraffine, enrobe les échantillons sans les infiltrer. Le récipient a été placé dans l'hexane refroidi jusqu'à congélation complète du gel CMC autour de l'échantillon tout en s'assurant que la face supérieure du gel

CMC dans le récipient ne soit immergée dans le réfrigérant pour éviter les fissures pendant la congélation. Les blocs obtenus ont été placés dans une boîte et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour des coupes histologiques au cryostat à l'INM (Institut de Neurosciences de Montpellier).

Lors des coupes, le bloc CMC congelé a été fixé à la phase échantillon du cryomicrotome (Leica 3050, Leica Instruments, Allemagne) dans la chambre cryogénique ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Les coupes ont été réalisées par une lame de carbure de tungstène montée et ayant un angle de jeu de  $5^{\circ}$ . L'échantillon a été coupé à une vitesse n'excédant pas  $4\text{mm/s}$ . La section a été ensuite étalée sur une lame de verre (dimension  $25 \times 75 \times 1.0\text{ mm}$ , Menzel-Glaser, Superfrost Plus® Gold) pour des analyses immunohistochimiques ou sur des lames  $\text{CaF}_2$ .



**Figure 24** : Illustrations de la méthode Kawamoto: (A) Une souris enceinte, de  $6\ \mu\text{m}$  d'épaisseur; (B) Section de  $2\ \mu\text{m}$  d'épaisseur: un thighbone de rat adulte, lame: lame de laboratoire de section, Milieu d'enrobage : SCEM-L1; (C) Section congelée fraîche (Une incisive de rat adulte,  $2\ \mu\text{m}$ ; (D) Section congelée fraîche (par Mme K. Izumi; Une truite arc-en-ciel de  $5\ \mu\text{m}$  d'épaisseur (Section Méthode Kawamoto-Lab Co. Ltd. Site: <http://section-lab.jp/English/Gallery%20E.htm>)



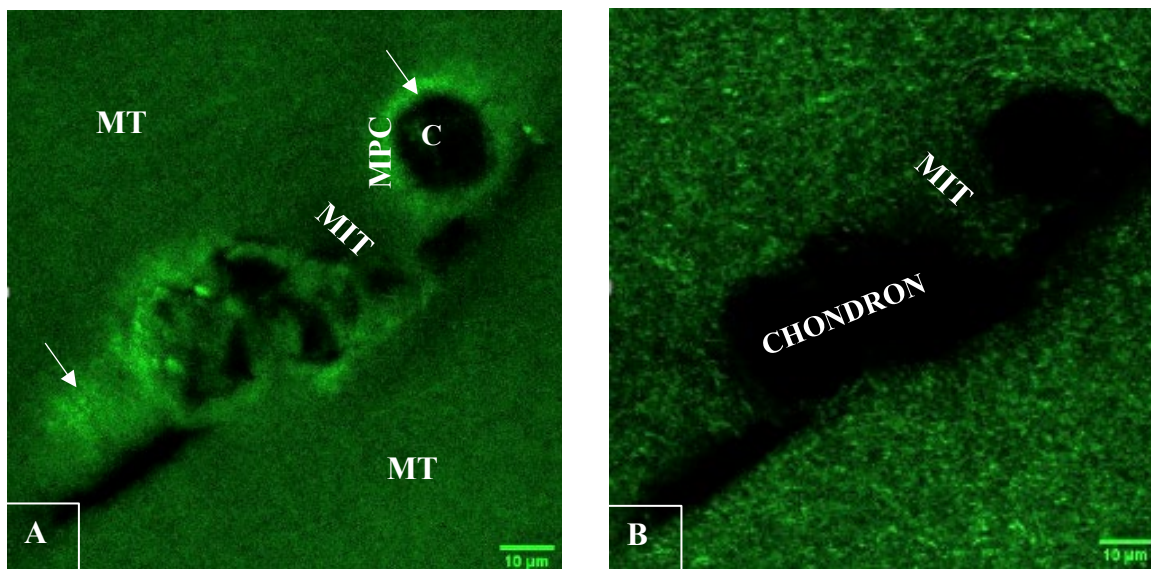
## 2.2.2 Méthode de fixation des échantillons sur la lame CaF<sub>2</sub>

L'immobilisation des échantillons de tissus mous hydratés est capitale pour une manipulation aisée lors des mesures au microscope confocal Raman. Pour éviter la mobilité des échantillons sur les lames CaF<sub>2</sub> lors des mesures Raman et AFM, toutes les coupes ont été immobilisées avec du Cell-Tak<sup>®</sup>, un adhésif tissulaire à base de protéines polyphénoliques largement utilisé (Corning Cell-Tak), et connu pour se lier fortement à pratiquement toutes les surfaces inorganiques et organiques dans des environnements aqueux <sup>226</sup>. L'immobilisation a été réalisée en suivant la méthode d'étalement manuelle du fabricant en mélangeant 10 µl de Cell-Tak dans de l'acide acétique à 5% dans un tube Eppendorf<sup>®</sup> à l'aide d'une pointe de micropipette. Le mélange a été étalé sur la lame CaF<sub>2</sub> et laissé à l'air ambiant jusqu'à adsorption de l'acide acétique pendant au moins 30 minutes. Après évaporation de l'acide acétique, le reste du Cell-Tak a été aspiré avec la micropipette, puis la lame a été lavée avec de l'éthanol à 95% et rincée à deux reprises avec de l'eau stérile. Enfin, les coupes hydratées avec du PBS ont été étalées avec soin sur la lame tout en respectant l'orientation de l'échantillon conformément au biseau initialement réalisé par le chirurgien, puis laissé à la température ambiante pendant au moins 30 min jusqu'à adhérence complète et l'ensemble a été déposé dans une boîte de Pétri et du PBS (quantité raisonnable) a été ajouté pour l'analyse soit au Raman ou à l'AFM. Dans certaines conditions, les lames étaient prétraitées avec le Cell-Tak et conservées au réfrigérateur à 4° C dans l'attente des coupes histologiques où celles-ci étaient directement étalées sur les lames.

## 2.3 Microscopie multiphotonique (MMP)

La microscopie multiphoton utilise les interactions non-linéaires entre la lumière et la matière comme source de contraste. Le processus non-linéaire à l'origine du développement de la microscopie multiphoton est l'absorption à deux photons et la fluorescence qui en découle (2PEF), démontré par Maria Goepfert-Mayer en 1929. Cette non-linéarité présente de nombreux avantages, tels qu'une faible phototoxicité, une résolution 3D intrinsèque et une grande profondeur de pénétration, etc. L'autre avantage qui a motivé notre choix pour cette technique, est la possibilité de la microscopie multiphoton d'utiliser simultanément différents modes de contraste, en particulier de combiner la fluorescence (2PEF) et la génération de seconde harmonique (en anglais SHG pour Second Harmonic Generation). La fluorescence permet d'évaluer la concentration et la localisation de fluorophores exogènes ou endogènes. La

SHG, quant à elle provient des structures denses non centrosymétriques et permet de visualiser, entre autres les fibres de collagènes. La microscopie SHG permet ainsi, par ses spécificités de sonder l'organisation tridimensionnelle des liaisons peptidiques en prenant en compte la structure hiérarchique des assemblages de collagène (*figure 25*). En effet, les molécules de collagène sont organisées sous forme de phases cristallines liquides ou insérées au sein d'une fibrille et sont capables de générer un signal SHG. Il faut toutefois préciser qu'en raison de la trop faible densité des groupements diffusants, il n'est pas possible d'observer une molécule unique de collagène par SHG. Le diffuseur élémentaire, au sein de la triple hélice, est la liaison peptidique.



**Figure 25** : Images en microscopie multiphotonique : (A) : autofluorescence de la matrice cartilagineuse (indication fléchée) dans la région immédiatement autour de la cellule, correspondant à la matrice pérircellulaire, mettant ainsi en évidence la régionalisation de la matrice autour de la cellule ; (B) : amas de structure fibreuse de collagène de la région MT de la matrice cartilagineuse en mode de génération de seconde harmonique (SGH). Barre d'échelle = 10 µm. Abréviations : MT = matrice territoriale ; MIT = matrice interterritoriale ; MPC = matrice pérircellulaire ; C = chondrocyte.

Cette approche combine les techniques avancées d'optique du microscope confocal avec une excitation multiphotonique de grandes longueurs d'onde pour imager des échantillons en haute résolution en trois dimensions avec des fluorochromes très spécifiques. Elle est principalement utilisée pour suivre des marqueurs fluorescents dans les tissus grâce au processus de fluorescence sous excitation à deux photons. L'avantage d'utiliser des

fluorophores endogènes permet de s'affranchir de toute préparation des échantillons et rend de ce fait la technique applicable directement sur n'importe quel type d'échantillon *in vivo*. Ces fluorophores permettent d'obtenir des informations structurales, morphologiques et fonctionnelles au niveau de la cellule ou du tissu. Au cours des expérimentations, cette technique a permis de visualiser la matrice péri-cellulaire (MPC) en mode autofluorescente autour de la cellule individuelle représentée par un vide (*Figure 25 (A)*).

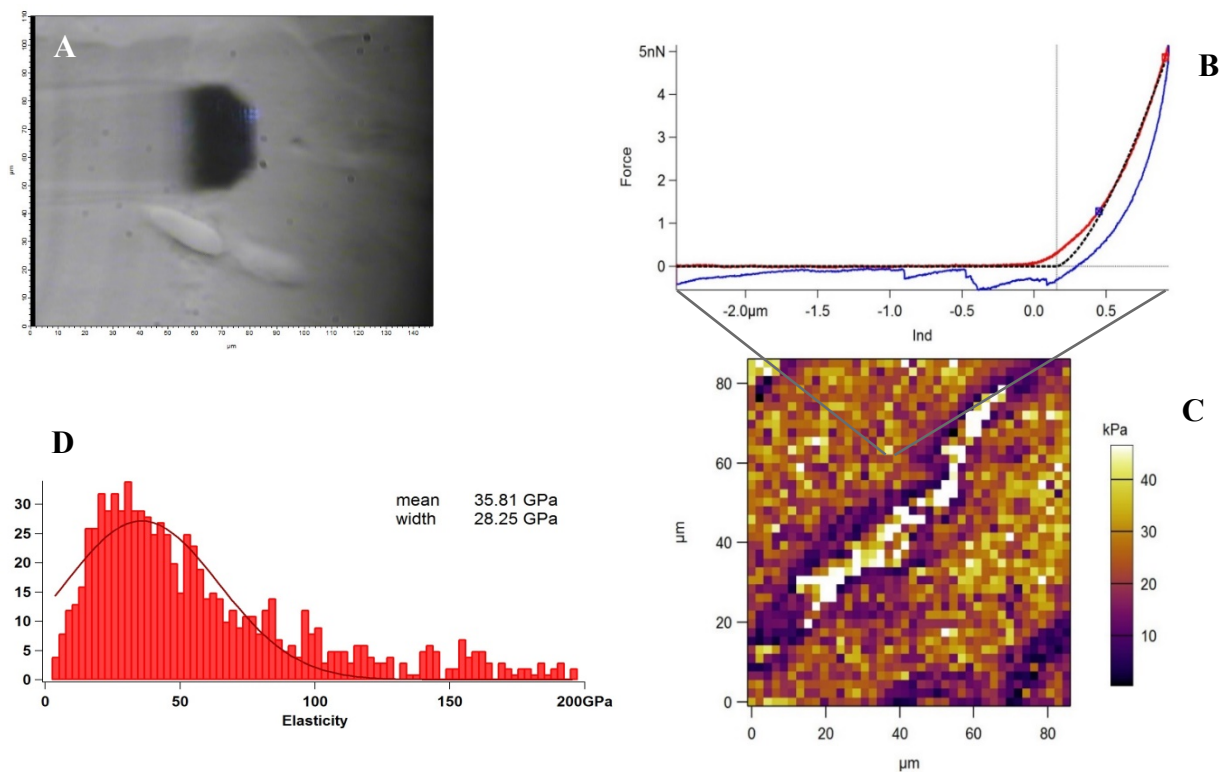
Ainsi, elle sert à suppléer la microscopie confocale pour visualiser des phénomènes à des profondeurs de pénétration qui lui sont inaccessibles, et permet de travailler sur l'ensemble de l'échantillon. De plus, l'excitation provient uniquement du point focal permettant d'obtenir une section optique d'échantillon épais qui pourra être exploitée pour une reconstruction 3D.

#### 2.4 Microscopie à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (AFM) est un microscope à sonde de très haute résolution qui peut être utilisée aussi bien sur les tissus vivants ou fixés. A ce jour, la recherche de tissus vivants ouvre la possibilité d'étudier des mesures biomécaniques, par exemple, le module d'élasticité de Young <sup>227</sup>. Dans le cartilage, les principaux composants de la MEC (aggréganes et fibrilles de collagène II), sont chargés négativement et possèdent une structure tridimensionnelle caractéristique et ordonnée. L'interaction entre ces composants confère au cartilage sa capacité d'absorber les chocs et lui permet de fonctionner pour protéger les extrémités des os ; l'AFM peut être utilisée pour examiner les relations structure-fonction du cartilage aux deux échelles micrométrique et nanométrique. Par ailleurs, les pointes nues de l'AFM sont en mesure de révéler les composants moléculaires de la MEC à l'échelle du nanomètre.

L'AFM se présente comme une technique de microscopie non-optique qui utilise une pointe nanométrique à l'extrémité d'un levier très souple comme sonde mécanique pour balayer la surface de l'échantillon et construire une image topographique tridimensionnelle hautement résolue <sup>228</sup>. Outre sa capacité d'imagerie à haute résolution, l'AFM peut aussi fournir des données quantitatives sur une grande variété de propriétés physico-chimiques de l'échantillon. Ce que Marcus et ses collaborateurs ont qualifié de spectroscopie de force <sup>229</sup>. De plus, elle nécessite une préparation minimale de l'échantillon et permet d'effectuer des mesures dans des conditions physiologiquement pertinentes. Pendant la spectroscopie de force, la position horizontale (x, y) du levier est fixe, tandis que son mouvement vertical (z) et sa déflexion

instantanée, en réponse à diverses forces, sont enregistrés, ce qui donne lieu à des courbes de force-distance (courbes FD) (Figure 26). De ces différents paramètres, de nombreuses informations peuvent être extraites liées aux propriétés mécaniques de l'échantillon et/ou aux interactions entre le substrat et la pointe, tels que le module élastique (ou Young's), l'adhérence maximale, mais aussi le nombre, la taille du pas ou la distance des ruptures individuelles. En définissant une grille sur une zone sélectionnée de l'échantillon et en effectuant des mesures de force dans chaque nœud de grille, on peut cartographier la distribution spatiale des propriétés mécaniques des tissus, cellules ou structures sous-cellulaires entières.



**Figure 26 :** Procédures de mesures du cartilage articulaire à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) : (A) l'image optique de la matrice de cartilage lors des mesures d'un échantillon avec la pointe du cantilever et des chondrons alignés. (B) L'unique courbe force-distance (FD) enregistrée à chaque pixel de la carte de force (C). Les valeurs du module de Young (E) sont obtenues en ajustant les courbes FD avec une courbe modèle (ligne en pointillée noire) (C) Le code couleur représentant les valeurs du module de Young (YM) obtenues des pixels allant du violet foncé (régions de forces plus ou moins douces) à l'orange jusqu'au blanc (région de forces plus dure) (D) Représentation de la distribution de toutes les valeurs du module de Young (YM) de la carte de force. Tous les histogrammes montrent une forme normalement distribuée et équipés d'une fonction gaussienne obtenant une valeur moyenne ( $E_0$ ) qui caractérise l'élasticité du site spécifique

Le choix de cette technique a été motivé par le fait l'AFM soit capable de tracer la topographie des échantillons avec une résolution très élevée, mais également d'évaluer les propriétés de surface locales telles que l'adhérence et la rigidité. De sorte qu'en associant ces deux techniques, l'AFM et la microscopie confocale Raman, il a été possible d'étudier à la fois la composition chimique des échantillons et leurs caractéristiques de surface, notamment le module de Young, dans notre cas.

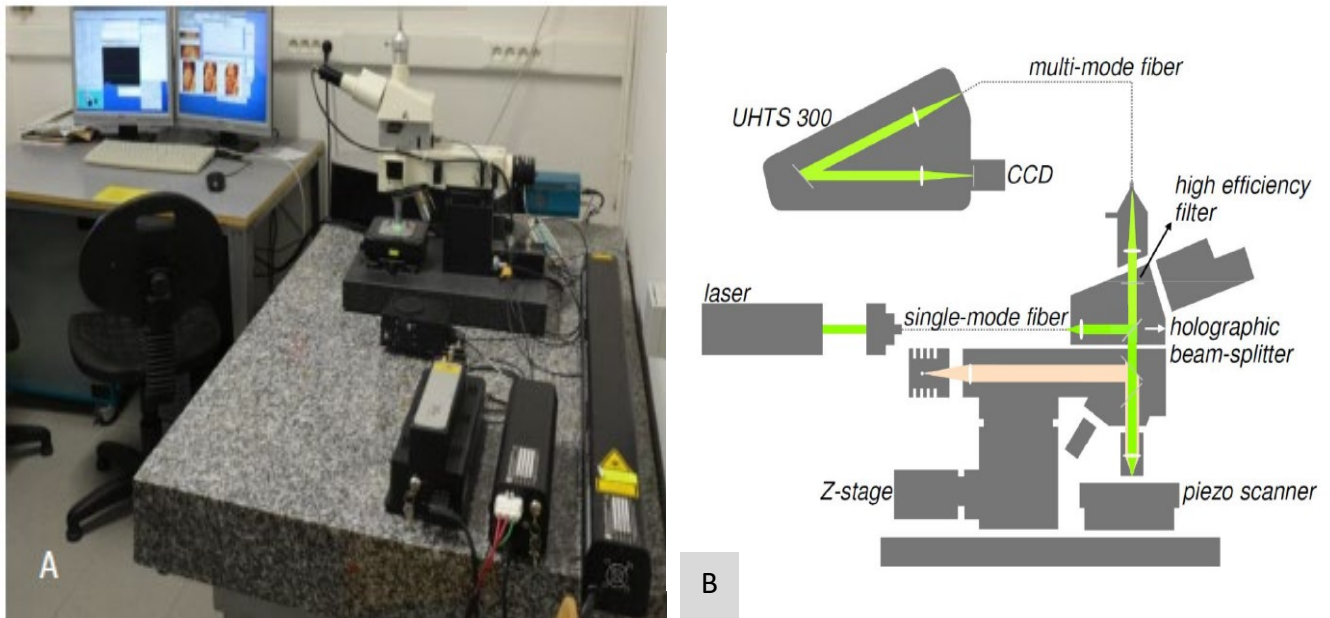
Le dispositif utilisé dans le cadre de notre travail pour effectuer les différentes mesures était constitué d'une tête de microscopie à force atomique MFP-3D Asylum Research, reliée à un contrôleur 3D Molecular Force Probe (Asylum Research, Santa Barbara, Californie ; logiciel de pilotage écrit en IgorPro 6.34A, Wavemetrics) et soutenu par un microscope optique inversé (Zeiss Axiovert 200/Olympus ix-71) pour le positionnement et l'acquisition optique d'images. Le module de Young a été calculé pour chaque force à partir de la partie approchante des courbes de force, en utilisant un modèle Hertz modifié <sup>230</sup> basé sur les travaux de Sneddon <sup>231</sup> et développé pour différentes formes de type AFM <sup>232-234</sup>. Le coefficient de Poisson des cellules a été supposé être de 0,5, comme suggéré pour les matériaux incompressibles mous <sup>235</sup>. Toutes les courbes de force ont été ajustées manuellement afin d'éviter tout point de données mal ajusté, conséquence possible de calculs logiciels automatiques pouvant conduire à des cartes d'élasticité inexacts.

## 2.5 Microscope confocal Raman

Le microscope confocal Raman utilisé dans notre étude est le système Witec alpha 300R (Witec Inc., ULM, Allemagne). La configuration du système est présentée sur la figure 27(A). Il comporte un laser Nd: YAG double fréquence 532 nm et un laser He-Ne 633 nm, utilisés comme sources de lumière. Pour notre étude, nous avons eu recours au laser Nd: YAG. Il faut préciser que chaque laser nécessite un coupleur de microscope laser spécial avec filtre coupe-bande. Ce dispositif comporte trois objectifs x20, x60 (immersion dans l'eau) et x100. L'objectif à immersion dans l'eau a été l'objectif utilisé pour analyser nos échantillons.

Par ailleurs, deux fibres optiques sont utilisées dans ce système. La première permet de transporter les photons du laser au microscope et la seconde du microscope au détecteur. Sur la figure 27(B), nous pouvons apprécier le schéma du système. La deuxième fibre agit comme un trou d'épingle pour obtenir une confocalité pour le microscope. La caméra EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device ; DU 970N BV353, Andor, Hartford, USA) est utilisé dans

le système Witec alpha 300R. La taille de la puce EMCCD était de  $1600 \times 200$  pixels, dont le contrôleur de la caméra était un convertisseur A / N 16 bits fonctionnant à 2,5 MHz. La caméra était refroidie par un système Pelletier.



**Figure 27 :** *Microscope Raman LBN Montpellier (A) ; B : Différentes composantes schématisées de la microscopie Raman (www.witec.de)*

Sur le système, le Witec control est le logiciel qui permet de contrôler le microscope confocal Raman et d'analyser les spectres Raman acquis. Une interface est présentée sur la figure 27. Dans un premier temps, une image optique est prise, puis on choisit la zone de balayage Raman et on réalise juste un seul spectre ponctuel. Aussi, sur cette interface, le temps d'intégration et le CCD (Charge Coupled Devices) ou l'EMCCD peuvent être réglés, car sont d'autres options qui jouent un grand rôle pour obtenir des acquisitions adéquates. D'autres logiciels tels que Witec Project et Project Plus sont utilisés pour analyser les données Raman. Par exemple pour les analyses K-means Clustering, nous pouvons avoir recours au logiciel Project Plus. Outre ces différents logiciels, le système est équipé d'autres logiciels qui facilitent le traitement des spectres avant leur utilisation dans des analyses uni ou multivariées.

Le microscope est également équipé d'un étage de balayage piézo-conducteur avec une précision de positionnement de 2 à 3 nm à l'horizontale et de 10 nm verticalement, respectivement.



## 2.5.1 Méthodes d'analyse des échantillons

Tous les spectres Raman ont été collectés à l'aide du Microscope Confocal Raman. Dans le cadre de notre étude, le laser à double fréquence Nd : YAG (Newport, Evry, France) avec une longueur d'onde de 532 nm et l'objectif aérien  $\times 60$  NIKON à immersion avec une ouverture numérique NA de 0,46 (Nikon, Tokyo, Japon) ont été utilisés. La puissance laser de sortie était de 50 mW. La résolution spatiale était de 300 nm et la résolution en profondeur d'environ 1  $\mu\text{m}$ . Le temps d'acquisition d'un seul spectre a été fixé à 0,5 s. Au total,  $150 \times 150$  points par image ont été enregistrés, ce qui a donné 22 500 spectres pour une image. L'acquisition de données a été possible grâce au logiciel Image Plus 2.08 de Witec. Ainsi, à l'aide d'un filtre de bord, les rayonnements Raman rétrodiffusés ont été séparés de la lumière dispersée de Rayleigh. De ce fait, les photons Raman sont transférés à la caméra EMCCD. Le système de spectroscopie UHTS 300 avec une transmission de 70% et un réseau de 600 lignes par mm (fonctionnant à  $-60^\circ\text{C}$ ) offraient une résolution spectrale de  $3\text{-}5\text{ cm}^{-1}$ .

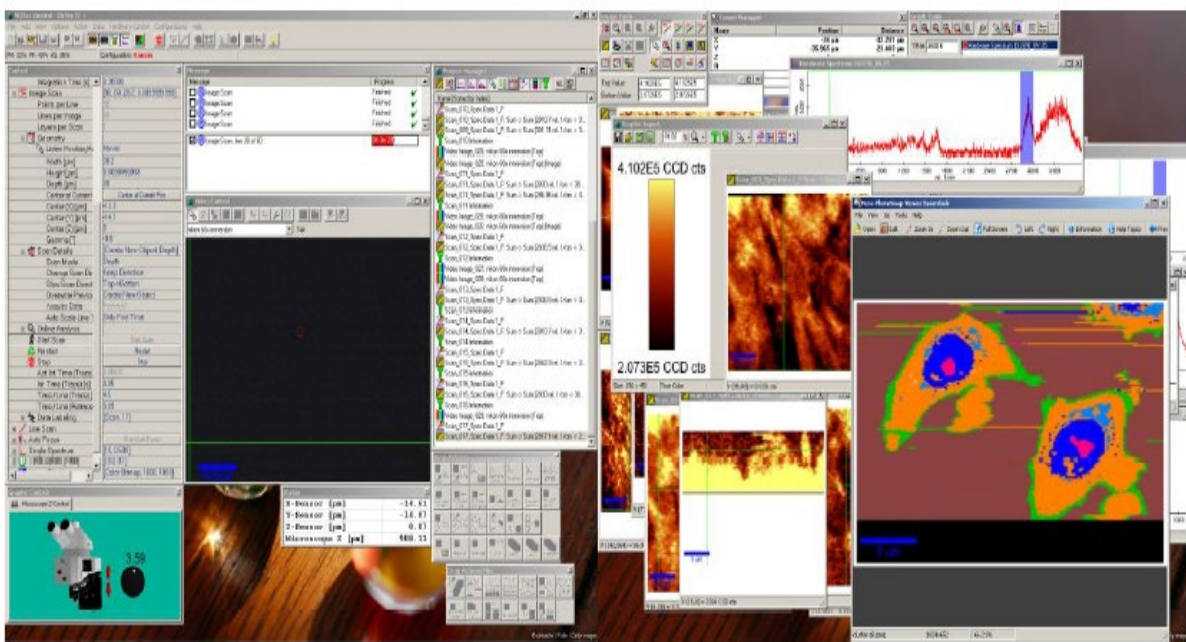


Figure 28 : Interface du logiciel de contrôle Witec

## 2.5.2 Analyse du signal Raman

Le signal peut être divisé en deux parties : l'une causée par le ou les analytes, l'autre par les composants du substrat de l'échantillon et de l'instrumentation<sup>236</sup>. Il existe des variations de signal et de réponse dans les spectres Raman qui résultent des rayons cosmiques, de la

fluorescence (en tant que fond variable), des variations de l'efficacité du détecteur en fonction de la plage spectrale et des variations d'intensité entre les acquisitions spectrales. Cette section décrit les procédures essentielles pour le traitement des données brutes afin d'optimiser le signal dû à l'échantillon et de réduire ainsi l'intensité spectrale superflue.

### 2.5.3 Traitements des données spectrales

Des dizaines de milliers de spectres Raman ont été acquis à chaque mesure. Il faut rappeler que chaque spectre contient une foule d'informations à la position où le spectre est enregistré. Les informations pertinentes peuvent être extraites pour permettre la détermination de la composition chimique, des différentes phases ou des contraintes dans l'échantillon. Pour obtenir toutes ces informations, un pré-traitement des spectres est nécessaire à l'aide de filtres et d'algorithmes appropriés. Ainsi, les données peuvent être visualisées sous forme d'image traitée et exportée. Le pré-traitement des données a été effectué à l'aide soit du logiciel de graphisme de Witec Project Plus (Ulm, Allemagne) et/ou soit du logiciel Spectragryph version 1.2.14.

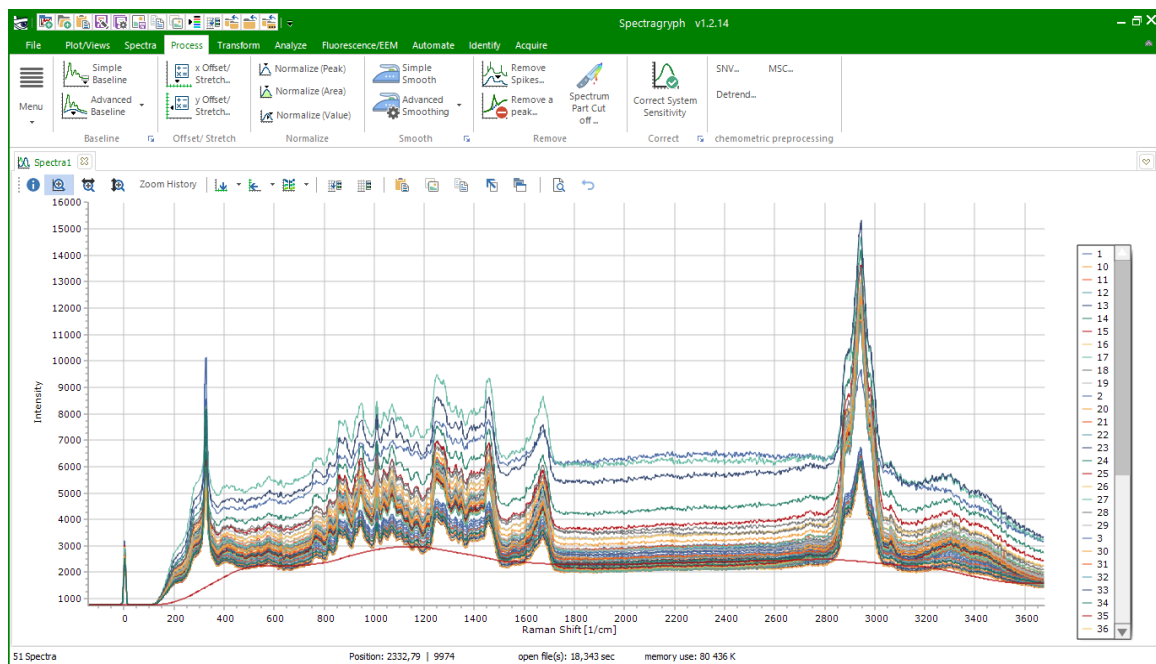


Figure 29 : Interface de traitement des spectres du logiciel Spectragryph version 1.2.14



## 2.5.4 Prétraitement des données spectrales

L'une des premières manipulations sur les données est l'étape du prétraitement. En effet, l'inspection visuelle des spectres sur les différentes longueurs d'onde est longue et impossible lorsque l'on tente de comparer des spectres très similaires ou encore plusieurs spectres en même temps. Ces prétraitements permettent donc la suppression des artefacts spectraux et spatiaux tels que les différences d'épaisseur de l'échantillon, les effets optiques, l'influence de l'appareil et le bruit de fond du détecteur. Ces techniques sont désormais considérées comme essentielles pour développer des modèles de classification robustes. De ce fait, les spectres doivent être prétraités avant de les soumettre à des méthodes statistiques (multivariées ou chimiométriques) parce que les résultats obtenus par les techniques de classification (par exemple : ACP, LDA, etc...) en dépendent. Ces prétraitements spectraux ont concerné successivement l'élimination des rayons cosmiques, la correction de la ligne de base, le lissage des spectres, la soustraction du signal de fond et la normalisation.

### 2.5.4.1 Elimination des rayons cosmiques (Cosmic Ray Removal)

Les rayons cosmiques sont des particules de haute énergie provenant de l'espace. Ce sont principalement des mésons chargés qui se désintègrent rapidement en muons. Ces muons atteignent la surface de la Terre et interagissent avec des molécules de l'atmosphère terrestre. Si un rayon cosmique frappe un détecteur CCD, il créera un faux signal sous forme de pic très net. Diverses méthodes mathématiques peuvent être utilisées pour éliminer les faux signaux des rayons cosmiques. L'une est l'élimination des rayons cosmiques spectraux et l'autre est l'élimination des rayons cosmiques temporels. Le principe de la méthode d'élimination des rayons cosmiques spectraux est que chaque pixel est comparé à ses pixels adjacents et s'il dépasse un certain seuil, il sera identifié comme un rayon cosmique. Dans la méthode de suppression des rayons cosmiques dans le temps, chaque spectre est comparé aux autres enregistrés précédemment et chaque pixel est comparé à sa variation dans le domaine temporel. Cette méthode n'est pas valable dans les cas où l'échantillon change rapidement de signature spectrale.

#### 2.5.4.2 Correction de ligne de base

La correction de la ligne de base est l'étape de prétraitement la plus souvent requise. Outre les sources environnementales et instrumentales (variations de température ou d'intensité de source, vibrations, etc.), les variations de référence peuvent être causées par les propriétés optiques et physicochimiques inhérentes à l'échantillon (effets de bord, points chauds, autofluorescence, hétérogénéités d'indice de réfraction, etc.). Ces signaux sont étroitement liés à la nature de l'échantillon et de la source lumineuse. Ainsi, la ligne de base d'un spectre brut se présente sous une forme inclinée (ou autres formes) d'où la nécessité de la corriger afin de corriger le spectre. Cette correction se fait selon des paramètres bien définis : degré du polynôme et nombre de points et se fait en estimant une ligne de base passant par les minima du spectre et qui sera ensuite soustraite à ce dernier. Dans notre étude, la correction de la ligne de base a été réalisée avec le logiciel Spectragryph en choisissant les paramètres nécessaires pour obtenir une ligne de bas optimum.

#### 2.5.4.3 Lissage des spectres

Le lissage est une méthode courante pour traiter les spectres Raman afin de réduire le bruit associé à un spectre enregistré. Les algorithmes reposent sur un changement progressif des données spectrales d'un point à un autre, alors que dans le bruit, un changement très rapide est observé. Le lissage peut être appliqué en remplaçant chaque valeur par une valeur calculée à partir de son environnement. Il faut cependant, prendre soin d'éviter l'élimination des signaux Raman réels avec le filtre de lissage. Parmi les différentes méthodes de lissage spectral, le filtrage de Savitzky-Golay (SG) <sup>237</sup> est le plus largement utilisé, car il permet d'améliorer le rapport signal sur bruit sans déformer le signal. Le lissage est contrôlé par deux facteurs : l'ordre polynomial et la taille de la trame (ou nombre de coefficients de convolution). Ainsi, plus la différence entre l'ordre polynomial et la taille de la trame est grande, plus le lissage est appliqué. Si la différence est égale à 1, aucun lissage n'est produit. Cet algorithme a l'avantage de réaliser un lissage de la courbe tout en préservant l'existence et la largeur des intensités des pics d'intérêt. Dans notre étude, nos données ont été lissées avec un polynôme d'ordre 4 avec une taille de trame de 13. A noter qu'un lissage trop important peut induire une perte d'information spectrale.

#### 2.5.4.4 Procédure de soustraction de signal de fond

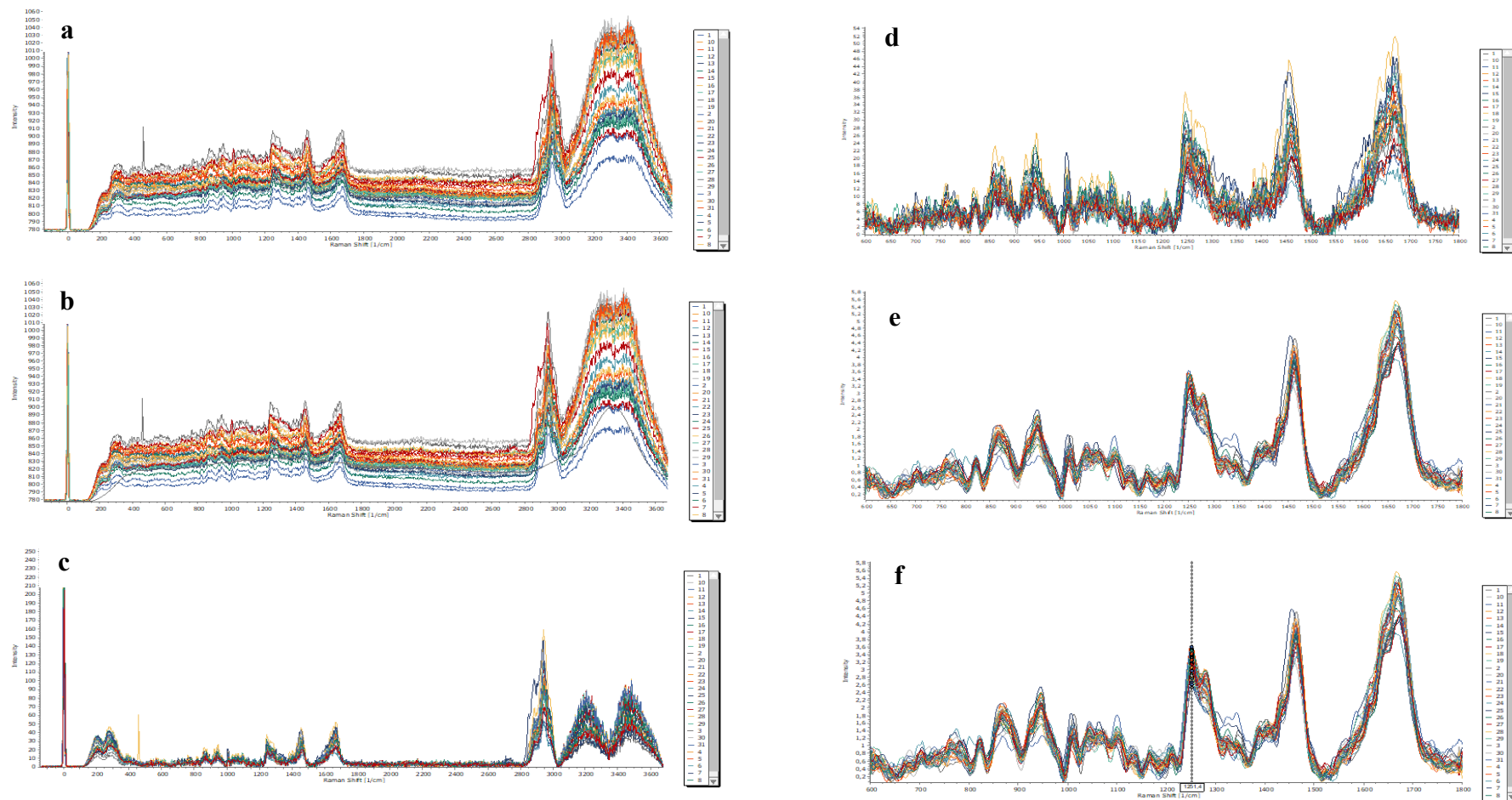
Tout signal Raman montre un peu de signal de fond. Afin de comparer uniquement la contribution des spectres enregistrés aux spectres des pics Raman, le signal de fond a été supprimé de chaque spectre. Ce signal peut être dû à un certain nombre de facteurs, notamment les contributions du matériau utilisé pour soutenir l'échantillon, ainsi que la fluorescence de revêtements antireflet sur l'objectif du microscope. Les sources d'arrière-plan sont de deux catégories, la première est l'arrière-plan provenant de la caméra CCD et la seconde est l'arrière-plan du signal vrai. Une caméra CCD ajoute une tension continue pour éliminer la tension négative due au bruit. Cette tension continue provoque un fond constant de quelques centaines à quelques milliers de comptes CCD (unités numériques). Il peut être facilement éliminé en soustrayant la valeur constante ajoutée par la caméra. Le second est le vrai fond de signal Raman. Il y a peu de matériaux avec vraiment zéro fond dans leurs signaux Raman. Une bonne confocalité peut réduire le fond du signal Raman. En plus de supprimer le vrai fond de signal, peu de moyens sont disponibles. Les plus importantes sont la soustraction d'arrière-plan polynomiale à passe unique et la soustraction de moyenne mobile. Pour la soustraction d'arrière-plan polynomiale à passe unique, un polynôme sera ajusté au spectre et soustrait. Dans ce cas, il faut faire attention à ne pas éliminer les signaux Raman. La deuxième méthode est la soustraction de fond de moyenne mobile. Dans cette méthode, un nombre définissable de valeurs à gauche et à droite de la valeur actuelle est moyenné. La valeur actuelle sera soustraite de la valeur moyenne.

#### 2.5.4.5 La normalisation

Ce traitement est appliqué pour éliminer les facteurs liés aux variations de la source ou du détecteur et pour corriger les différences d'épaisseur de l'échantillon ce qui permet par ailleurs de simplifier la comparaison entre les données spectrales qualitativement et quantitativement. Cela garantit que tous les pixels ont la même intensité totale et, par conséquent, les variations d'intensité observées représentent les variations (proportionnelles) de la concentration chimique. Les spectres sont donc ramenés à la même échelle d'intensité. Il existe plusieurs types de normalisation :

- ✓ Normalisation Min / Max : l'intensité d'un pic du spectre est ramenée à une échelle où l'unité d'absorbance minimale sera de 0 et la maximale de 1.

- ✓ Normalisation vectorielle : Cette méthode calcule la moyenne « y » des absorbances du spectre qui sera ensuite soustraite du spectre. La somme des carrés de toutes les valeurs « y » est calculée et le spectre est divisé par la racine carrée de cette somme. L'écart-type est égale à 1.
- ✓ Correction de l'offset : Cette méthode déplace la ligne de base du spectre pour que l'unité d'absorbance minimale soit à 0.



**Figure 30:** Les différentes étapes de prétraitement des spectres : (a) Spectres brutes, (b) Soustraction de la ligne de base suivant l'ordre polynomial, (c) Spectres brutes sans la ligne de base, (d) Spectres brutes sans ligne de base pris dans la région spectrale de 600-1800  $\text{cm}^{-1}$ , (e) Lissage avec le filtre Savizsky Galay et normalisation par rapport à l'aire de la région spectrale 600-1800  $\text{cm}^{-1}$ , (f) Curseur multilignage et détermination de l'intensité de signal

### 2.5.5 Analyse des données

Le but de l'analyse des données est d'identifier la composition chimique de l'échantillon de manière résolue spatialement. Cela inclut souvent l'identification de zones chimiquement distinctes et leur corrélation avec des informations biologiques, telles que l'anatomie, l'expression de gènes et / ou de protéines, les gradients hormonaux, l'activité enzymatique, etc. Différentes approches peuvent être adoptées pour identifier des zones chimiquement différentes. L'ajustement des pics a été réalisé à l'aide d'un ajustement des pics gaussien au centre de chaque pic ou de ses composants. Afin de comparer les spectres et de permettre des comparaisons cohérentes là où les variations d'intensité peuvent être relatives à l'intensité de chaque spectre, les données ont été normalisées à des pics d'intensité constante entre les échantillons. La normalisation rend ainsi chaque spectre d'une série comparable en vertu du fait que l'intensité des données dans chaque spectre est normale à l'intensité d'un pic dans un ensemble de données, ce qui était censé être cohérent dans la série de spectres. Les données spectrales ont été normalisées à un pic / à des pics d'intensité / contribution connue au spectre. Dans notre étude, plusieurs possibilités ont servi à la normalisation de nos données :

- Avec le pic de phénylalanine ( $1004\text{ cm}^{-1}$ ) a été principalement utilisé pour cela. En effet, il a été démontré que ce pic semble plus constant selon les milieux <sup>238-240</sup>
- Avec le pic CH localisé soit à  $1450\text{ cm}^{-1}$  ou  $2935\text{ cm}^{-1}$  <sup>241</sup>
- Par rapport à la surface de la région d'intérêt du spectre ( $600 - 3000\text{ cm}^{-1}$ ), en raison de l'évaluation des éventuelles modifications de la teneur du pic de collagène de type I dans le tissu <sup>242</sup>. Pour le traitement final des données, c'est cette méthode qui a été retenue.

### 2.5.6 Analyses multivariées

Les spectres Raman contiennent diverses bandes Raman qui se chevauchent. De sorte qu'il est difficile d'inspecter et d'interpréter visuellement les données spectrales. Les méthodes d'analyse spectrale multivariée sont souvent utilisées pour traiter les spectres Raman et faciliter l'interprétation des données <sup>243</sup>. Elles sont généralement classées en méthodes supervisées ou non supervisées. Pour les analyses non supervisées, telles que l'analyse par grappes et l'ACP, aucune connaissance a priori des caractéristiques de classe n'est requise qui, cependant doit être déterminée à partir de l'analyse elle-même. A l'inverse, dans une analyse supervisée, le nombre de classes et d'échantillons représentatifs de chaque classe sont connus a priori, comme c'est le cas dans l'analyse linéaire discriminante (LDA), l'analyse de régression et les réseaux de

neurones artificiels (RNA) <sup>244</sup>. Dans le cas de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la composante principale (ACP), l'analyse k-means clustering (KMCA), l'analyse discriminante linéaire (LDA) et la dérivée seconde. Ces différentes méthodes sont brièvement décrites sous-dessous.

#### 2.5.6.1 Analyse de la Composante Principale (ACP)

L'ACP est l'une des méthodes d'analyse de données multivariées les plus utilisées. L'objectif de l'analyse en composantes principales (ACP) est d'exprimer la structure de variation d'un ensemble de variables descriptives d'une matrice de données (les longueurs d'onde des spectres obtenus d'un procédé, par exemple) en utilisant un nombre restreint de variables définies comme des combinaisons linéaires des variables originales <sup>245</sup>. Ces combinaisons linéaires sont appelées Composantes Principales (CP). La variance totale d'une matrice de données à  $n$  variables peut souvent être condensé autour de  $k$  composantes principales (avec  $k < n$ ) ; ou encore  $k$  directions de variance maximale. Les composantes obtenues sont classées par importance de la variance expliquée, ce qui veut dire que la première CP expliquera davantage de variance que la seconde qui en expliquera elle-même plus que la suivante, et ainsi de suite. L'ACP peut être aussi définie comme une méthode d'extraction des variations systématiques d'un jeu de données <sup>246</sup>. L'ACP cherche donc à reconstruire la structure de variance/covariance des données dans un modèle représentant les variations significatives et où le bruit aléatoire (supposé indépendant et identiquement distribué) est considéré comme une erreur. Cette méthode permet :

- l'étude et la visualisation des corrélations entre les variables, afin d'éventuellement limiter le nombre de variables à mesurer par la suite ;
- l'obtention de facteurs non corrélés qui sont des combinaisons linéaires des variables de départ, afin d'utiliser ces facteurs dans des méthodes de modélisation telles que la régression linéaire, la régression logistique ou l'analyse discriminante ;
- la visualisation des observations dans un espace à deux ou trois dimensions, afin d'identifier des groupes homogènes d'observations, ou au contraire des observations atypiques.

En définitive, l'ACP peut être considérée comme une méthode de projection qui permet de projeter les observations depuis l'espace à  $p$  dimensions des variables  $p$  vers un espace à  $k$

dimensions ( $\mathbf{k} < \mathbf{p}$ ) tel qu'un maximum d'information soit conservée (l'information est ici mesurée au travers de la variance totale du nuage de points) sur les premières dimensions. Si l'information associée aux 2 ou 3 premiers axes représente un pourcentage suffisant de la variabilité totale du nuage de points, on pourra représenter les observations sur un graphique à 2 ou 3 dimensions, facilitant ainsi grandement l'interprétation.

Dans le cas des données spectrales, l'ACP est considérée comme une méthode d'analyse multivariée prenant en compte l'ensemble des pixels des spectres pour décrire la variation dans l'image à l'aide d'un petit nombre de contributions de base (composantes principales) liées aux comportements spectral et spatial <sup>247</sup>. Il résout donc les problèmes susmentionnés de cartes thermiques d'intensité de bande et est mieux adapté pour gérer les variations biologiques.

#### 2.5.6.2 Linear Discriminative Analysis (LDA) <sup>248</sup>

L'analyse discriminante linéaire (LDA) ou discriminants de Fisher est une approche discriminante qui tente de modéliser les différences entre les échantillons affectés à certains groupes. Le but de la méthode est de maximiser le rapport entre la variance inter-groupe et la variance intra-groupe. Lorsque la valeur de ce rapport est à son maximum, alors les échantillons au sein de chaque groupe ont la plus petite dispersion possible et les groupes sont le plus séparés les uns des autres. Une fois que l'hypothèse LDA de covariances de groupe égales pour un problème discriminant à deux classes est satisfaite, on essaie de maximiser l'expression :

$$S = \frac{\mathbf{p} \mathbf{C}_b \mathbf{p}^T}{\mathbf{p} \mathbf{C}_w \mathbf{p}^T} \quad 249$$

Où  $\mathbf{C}_b$  et  $\mathbf{C}_w$  sont des matrices de covariance entre et intra-groupe, respectivement, et  $\mathbf{p}$  est la direction dans l'espace de données multivariées qui sépare le mieux les deux groupes d'échantillons. A ce stade, il est important de souligner que  $\mathbf{p}$  est le vecteur propre obtenu à partir de la décomposition ACP de la matrice  $\mathbf{C}_w^{-1} \mathbf{C}_b$ . Le problème discriminant à deux classes peut être généralisé pour un problème multi-classes.

#### 2.5.6.3 Analyse k-means Clustering (KMC)

Le k-means Clustering ou encore k-moyenne de repartitionnement est un algorithme non supervisé qui résout les problèmes de partitionnement <sup>250</sup>. Ces méthodes utilisent les



enregistrements d'une base de données et les répartissent (les « partitionnent ») dans les « meilleurs »  $k$  groupes sur la base de certains critères. L'algorithme KMC est une méthode «grossière» pour classer les spectres car un spectre unique peut être membre d'une seule classe (cluster). L'algorithme classe les spectres de manière à minimiser les différences spectrales au sein des clusters et à maximiser les différences spectrales entre les clusters. La distance euclidienne est utilisée pour définir les différences entre les spectres <sup>251</sup>. En effet, l'algorithme sélectionne un nombre prédéfini ( $k$ ) de spectres aléatoires à partir de l'ensemble de données comme spectres centroïdes. Ensuite, l'algorithme calcule la distance entre chaque spectre et chaque spectre centroïde et classe les spectres en  $k$  classes en fonction des distances. De nouveaux spectres centroïdes sont créés en calculant le spectre moyen pour chaque classe. Là encore, les distances entre chaque spectre et chaque spectre centroïde sont calculées et de nouvelles classes  $k$  sont créées. À la suite de cette boucle, nous pouvons remarquer que les  $k$ , centres de gravité changent leur emplacement étape par étape jusqu'à ce qu'aucune modification supplémentaire ne soit nécessaire. En conséquence, l'algorithme génère une image dans laquelle une couleur représente la classe particulière (ou cluster) <sup>251,252</sup>. Les pixels noirs dans les images de cluster sont dus à la suppression des spectres de mauvaise qualité. Pour chaque cluster, le spectre moyen peut être isolé et les différences spectrales peuvent être soumis à l'étude.

En tout état de cause, cet algorithme vise à minimiser une *fonction objective*, et par conséquent une fonction d'erreur quadratique.

$$J = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n \left\| S_i^{(j)} - m_j \right\|^2$$

La fonction objective où  $\left\| S_i^{(j)} - m_j \right\|^2$  est une mesure de distance choisie entre un point de données  $S_i^{(j)}$  et le centre de cluster  $m_j$ , est un indicateur de la distance entre les données de  $n$  points de leurs centres de classe respectifs. L'algorithme *k-moyenne* ne trouve pas nécessairement la configuration la plus optimale, correspondant au minimum de la fonction objectif globale, bien qu'il puisse être prouvé que la procédure soit toujours terminée. L'algorithme est également significativement sensible aux centres des premiers clusters sélectionnés au hasard. Pour réduire cet effet, l'algorithme k-moyenne peut être exécuté plusieurs fois.

#### 2.5.6.4 La dérivation

La dérivation joue un rôle important dans la séparation des informations spectrales. En effet, les petites différences entre deux spectres très corrélés (des pics qui se recouvrent) ne sont pas visibles à l'œil nu. La dérivation permet une identification plus spécifique des pics d'absorption petits et voisins qui ne sont pas résolus dans le spectre initial, offrant ainsi un moyen d'augmenter la spécificité des pics d'absorption de certaines molécules du tissu et donc de les révéler au manipulateur. Autre avantage de la dérivée est que les composantes constantes et linéaires des erreurs de base sont éliminées lors de la différenciation. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance peut être exprimée comme suit :

$$A(\tilde{\nu}) = \alpha(\tilde{\nu})lc, \quad (\text{Equation 1}) \quad 253$$

où  $A$  est l'absorbance dépendante du nombre d'onde  $\tilde{\nu}$ ,  $\alpha$  est le coefficient d'absorption dépendant du nombre d'onde,  $l$  est la longueur du chemin optique (principalement déterminée par l'épaisseur de la coupe) et  $c$  est la concentration. Lorsque l'équation (1) est différenciée deux fois, le résultat est le suivant :

$$\frac{d^2 A(\tilde{\nu})}{d\tilde{\nu}^2} = \frac{d^2 \alpha(\tilde{\nu})}{d\tilde{\nu}^2} \quad (\text{Equation 2}) \quad 253$$

D'après l'équation (2), on peut voir que des informations quantitatives peuvent également être obtenues à partir des spectres de la dérivée seconde, puisque  $l$  et  $c$ , en termes constants, ne sont pas affectés par la différenciation. La spectroscopie en dérivée seconde permet une identification plus spécifique des pics d'absorption petits et voisins qui ne sont pas résolus dans le spectre initial, offrant ainsi un moyen d'augmenter la spécificité des pics d'absorption de certaines molécules du tissu.

En tout état de cause, la dérivée seconde accroît considérablement le nombre de points caractéristiques des spectres. En effet, à chaque bande du spectre d'origine correspond trois bandes dans le spectre dérivé, soit 2 maxima, un minimum et 2 points d'annulation. L'accroissement du nombre de maxima, de minima et de points d'annulation améliore très nettement la définition du spectre. Les dérivés les plus communément utilisées sont celles d'ordre 1 ou 2. Le seul inconvénient de ce prétraitement est qu'il est sensible au bruit de fond.

### **3 RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **3.1 Caractérisation de la matrice du cartilage articulaire : Cartographie des principaux marqueurs de la matrice du cartilage articulaire à partir de la Microscopie Confocale Raman**

### 3.1.1 Introduction

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hautement spécialisé <sup>254-256</sup>. Il est subdivisé en trois zones très distinctes : superficielle (avec une épaisseur d'environ 10–20%), moyenne (avec une épaisseur d'environ 20–70%) et profonde (70–100%). La matrice du cartilage est faite d'une matrice extracellulaire (MEC) constituée en majorité de collagène de type II qui confère au tissu sa forme et sa résistance et des protéoglycanes dont la principale est l'aggrécane, assurant une résistance aux contraintes mécaniques <sup>24</sup>. Au voisinage des cellules individuelles, la MEC est organisée en zone immédiatement péri-cellulaire et en une matrice interterritoriale entre les cellules. La matrice péri-cellulaire (MPC) est riche en protéoglycanes (PGs) <sup>257</sup>, possède une composition et une architecture de collagène particulière (avec une prédominance de collagène de types VI) et forme une couche mince autour du chondrocyte associé. Elle semble jouer un rôle important dans la mécanotransduction et le métabolisme de la cellule particulièrement <sup>50</sup>. Selon Hugues LC et al, (2005), il s'agit d'une fine couche spécialisée de la MEC, mais très différente sur le plan structurel, biochimique et fonctionnel <sup>258</sup>. L'ensemble matrice péri-cellulaire et chondrocytes a été qualifié sous le vocable de « chondron », thème inventé par Benninghoff en 1925 en observant les modifications dans la structure de la matrice autour des chondrocytes à partir de la lumière polarisée. Les chondrocytes noyés dans matrice cartilagineuse ne représentent que 2% du volume total du cartilage articulaire. Ils assurent le maintien de l'homéostasie de la matrice cartilagineuse et procèdent à son renouvellement lors des phénomènes de dégradation de celle-ci sous les charges mécaniques. Quant à la matrice interterritoriale, elle constitue la majeure partie de la matrice extracellulaire du cartilage et fournit une contiguïté structurelle et biomécanique entre les cellules et dans l'ensemble du tissu <sup>259</sup>.

L'ingénierie tissulaire du cartilage combine la biologie et l'ingénierie, un domaine interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie au développement de substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction du cartilage articulaire <sup>79</sup>. Le principal objectif de l'ingénierie tissulaire du cartilage est de générer des tissus de remplacement du cartilage fonctionnel qui peuvent être utilisés pour réparer de manière clinique les défauts du cartilage articulaire <sup>260-262</sup>.

Les efforts entrepris depuis lors pour développer un substitut de cartilage dans le cas de l'arthrose peinent encore à trouver une solution satisfaisante et reproductible au problème, car le changement dans le phénotype du cartilage implanté conduit à un tissu de réparation fibrocartilagineuse dont la stabilité dans le temps est médiocre et la fonction différente du

cartilage hyalin. Avec les dernières avancées de la recherche, il est connu aujourd'hui que les cellules ont la capacité de se réorganiser en structures complexes spécifiques aux tissus, avec un minimum de facteurs de croissance inductifs <sup>6</sup>. Cependant, le manque d'organisation structurée et de taille du tissu raisonnable constitue un obstacle majeur à la réalisation d'une fonctionnalité véritablement *in vivo*. Le défi majeur actuel consiste à développer des substituts biologiques qui soient la réplique fidèle du tissu natif de sorte à faciliter l'intégration et les fonctions de celui-ci une fois implanté dans l'environnement natif.

L'objectif de notre étude a consisté à caractériser la matrice globale du cartilage articulaire et de fournir une cartographie des principaux marqueurs Raman.

### **3.1.2 Matériel et méthodes**

#### **3.1.2.1 Préparation des échantillons**

Des explants de cartilage articulaires prélevés sur le genou d'un patient après son consentement. Lors de la chirurgie, un biseau a été réalisé pour guider l'expérimentateur suivant l'orientation de l'échantillon de la surface à la profondeur au cours des coupes histologiques et des mesures au microscope confocal Raman. Les biopsies réalisées ont été faites à distance des sites de dégradation. Les tissus humains ont été obtenus à des fins de recherche avec le consentement du donneur et l'approbation du comité d'éthique appropriée du CHU de Montpellier.

##### **3.1.2.1.1 Préparation des coupes histologiques**

Tous les échantillons reçus au laboratoire ont été prélevés par l'équipe Danièle de l'IRMB. Les échantillons fraîchement prélevés ont été immédiatement plongés dans du PBS puis conservés au réfrigérateur à 4°C. Dans la même journée, ces échantillons ont été transportés au laboratoire et aussitôt congelés dans de l'hexane refroidissant à -94°C, puis placé dans un récipient en acier inoxydable en respectant l'orientation de l'échantillon grâce au biseau réalisé lors de la biopsie et recouvert d'un gel de carboxyméthylcellulose (CMC) à 5%. L'ensemble (récipient + échantillon + gel) a été plongé dans l'hexane refroidissant tout en préservant la surface de toute immersion dans le réfrigérant pour éviter les fissures pendant la congélation jusqu'à formation d'un bloc <sup>225</sup>. Les blocs obtenus ont été placés dans une boîte et conservés à -80°C jusqu'au jour des coupes histologiques. Pour les coupes histologiques, les échantillons ont été transportés sous glace à l'Institut de Neurosciences de Montpellier (INM)

où plusieurs coupes cryosections d'une épaisseur allant de 20 $\mu$ m à 60 $\mu$ m ont été réalisées au cryostat Leica 3050 dans une chambre cryogénique à -20°C avec une lame coupante de carbure de tungstène montée et ayant un angle de jeu de 5°. L'échantillon a été coupé à une vitesse n'excédant pas 4mm/s. La section a été ensuite étalée directement sur les lames CaF<sub>2</sub> pour les mesures aux microscopes confocal Raman et à force atomique (AFM). Toutes les coupes réalisées ont été ensuite transportées sous glaces au laboratoire et conservées au réfrigérateur à 4°C.

#### 3.1.2.1.2 Préparation et mesures Raman des échantillons

Avant les mesures au microscope Raman, les coupes ont été fixées sur les lames CaF<sub>2</sub> avec du Cell-Tak<sup>®</sup> (une colle adhésive), puis déposées dans une boîte de Pétri et rempli au 2/3 de tampon phosphate salin (PBS). En effet, l'application de cette colle adhésive, en plus de permettre une bonne adhérence de l'échantillon à la lame CaF<sub>2</sub> pour des exploitations futures dans le temps<sup>226</sup>, n'interfère aucunement avec le signal Raman. Durant toute la période des mesures, les échantillons ont été conservés dans le PBS (le PBS était remplacé chaque jour pour éviter les contaminations de l'échantillon) au réfrigérateur à 4°C. Toutes les mesures ont été réalisées à l'aide d'un Microscope confocal Raman Witec  $\alpha$  300R (Witec, Ulm, Allemagne). Le système est équipé d'un laser à double fréquence Nd : YAG (Newport, Evry, France) avec une longueur d'onde de 532 nm et de trois objectifs aériens  $\times 20$ ,  $\times 100$  et  $\times 60$  immersion dans l'eau, version NIKON avec ouverture numérique NA de 0,46 (Nikon, Tokyo, Japon). Pour nos échantillons, seul l'objectif  $\times 60$  immersion a été utilisé. La puissance laser de sortie était de 50 mW. La résolution spatiale était de 300 nm et la résolution en profondeur d'environ 1  $\mu$ m. Le microscope est également équipé d'un étage de balayage piezodriven avec une précision de positionnement de 2 à 3 nm à l'horizontale et de 10 nm verticalement, respectivement. Le temps d'acquisition d'un seul spectre a été fixé à 1 s. 150  $\times$  150 points par image ont été enregistrés, ce qui a donné au total 22 500 spectres pour une image. Les images hyperspectrales ont été acquises dans un intervalle de temps allant de 24 à 48 min. L'acquisition de données a été réalisée à l'aide du logiciel ImagePlus 2.08 de Witec. À l'aide d'un filtre de bord, les rayonnements Raman rétrodiffusés ont été séparés de la lumière dispersée de Rayleigh. Les photons Raman ont été transférés à la caméra EMCCD (DU 970N-BV353, Andor, Hartford, États-Unis). La taille de la puce EMCCD est de 1600  $\times$  200 pixels, le contrôleur de la caméra est un convertisseur A/D 16 bits fonctionnant à 2,5 MHz, et la caméra est refroidie par un système Pelletier. Le système de spectroscopie UHTS 300 avec une transmission de 70% et un

réseau de 600 lignes par mm (fonctionnant à  $-60^{\circ}$  C) offrent une résolution spectrale de  $3\text{-}5\text{cm}^{-1}$ . Ce microscope a été utilisé pour l'analyse des structures du cartilage articulaire. Au total, 120 spectres (en raison de 40 spectres par région matricielle : chondrocyte, la MPC et la MEC) ont été collectés suivant les différentes zones du cartilage articulaire.

#### 3.1.2.1.3 Les mesures au microscope à force atomique (AFM)

Sur chaque échantillon ( $n=9$ ), nous avons effectué des mesures AFM pour déterminer le module d'élasticité de la matrice du cartilage articulaire. Tous les échantillons ont été sondés sur toute la gamme de la matrice en utilisant des porte-à-faux équipés de billes colloïdales (CP-qp-CONT-Au, sQube, Allemagne) avec une vitesse de  $10\ \mu\text{m} / \text{s}$  et une force de déclenchement de  $30\ \text{nN}$ . La taille des cartes a été définie de  $40 \times 40$  à  $64 \times 64$  pixels ce qui semble être un bon compromis entre temps et résolution. Dans une première, la matrice globale a été mesurée en fonction des différentes zones sans distinction des régions. Par la suite, les différentes régions de chaque zone ont été étudiées. Vous trouverez ci-dessous les procédures de mesure AFM des échantillons et de détermination du module de Young. A la fin, nous avons calculé la moyenne et l'écart type résultant des mesures réalisées tant au niveau de la matrice globale en fonction des différentes zones que des différentes régions de la matrice. Le dispositif utilisé dans cette étude pour effectuer les différentes mesures était constitué d'une tête de microscopie à force atomique MFP-3D Asylum Research, reliée à un contrôleur 3D Molecular Force Probe (Asylum Research, Santa Barbara, Californie ; logiciel de pilotage écrit en IgorPro 6.34A, Wavemetrics) et soutenu par un microscope optique inversé (Zeiss Axiovert 200/Olympus ix-71) pour le positionnement et l'acquisition d'images optiques. Le module de Young a été calculé pour chaque force à partir de la partie approchante des courbes de force, en utilisant un modèle Hertz modifié <sup>263</sup> basé sur les travaux de Sneddon <sup>264</sup> et développé pour différentes formes de type AFM <sup>265-267</sup>. Le coefficient de Poisson des cellules a été supposé être de 0,5, comme suggéré pour les matériaux incompressibles mous <sup>268</sup>. Toutes les courbes de force ont été ajustées manuellement afin d'éviter tout point de données mal ajusté, conséquence possible de calculs logiciels automatiques pouvant conduire à des cartes d'élasticité inexactes.



### 3.1.2.2 Analyses des données et images spectrales Raman

Ces analyses avaient pour but d'identifier la composition chimique de l'échantillon de manière résolue spatialement, l'identification des zones chimiquement distinctes et leur corrélation avec des informations biologiques.

#### 3.1.2.2.1 Analyse des données spectrales Raman

Tous les spectres réalisés ont subi un prétraitement afin d'obtenir des spectres ayant non seulement la même échelle, mais comparables entre eux. L'analyse spectrale a été réalisée dans la plage des empreintes digitales ( $600-1800\text{ cm}^{-1}$ ) en raison de sa spécificité moléculaire plus élevée. Avant l'analyse statistique multivariée, les spectres Raman ont été pré-traités au moyen de techniques bien établies. Le processus de prétraitement des spectres a consisté dans un premier temps à la soustraction de la ligne de base suivant la loi polynomiale d'ordre 8. Par la suite, nous avons procédé à l'élimination de l'autofluorescence des tissus et le lissage des spectres en utilisant le filtre « Savitzky Galay », suivant un ordre polynomial = 4 avec un nombre de points (ou intervalle = 13). Afin de comparer les spectres et de permettre des comparaisons cohérentes là où les variations d'intensité peuvent être relatives à l'intensité de chaque spectre, les données ont été normalisées par rapport à l'AIRE de la région comprise entre  $600$  et  $1800\text{ cm}^{-1}$  <sup>242</sup>. Ces étapes de prétraitement des spectres ont été nécessaires avant de les soumettre à des méthodes statistiques. Tous les processus de prétraitement, de normalisation et détermination des différentes intensités des pics ou bande ont été réalisés avec le logiciel Spectragryph<sup>®</sup> version 1.2.12 non commercial développée et offert gracieusement par le Dr Friedrich Menges.

Au-delà des analyses Raman, des analyses multivariées telles que l'analyse de la composante principale (ACP) et la LDA ont été réalisées pour apprécier la répartition ou la distribution de nos données selon les différentes zones du cartilage articulaire. L'ACP est une méthode d'analyse multivariée qui réduit les spectres en un nombre défini de composantes principales (CP) qui tiennent compte de la variance spectrale. Elle prend en compte l'ensemble des pixels des spectres pour décrire la variation dans l'image à l'aide d'un petit nombre de contributions de base (composantes principales) liées aux comportements spectral et spatial <sup>247</sup>. Il résout donc les problèmes susmentionnés de cartes thermiques d'intensité de bande et est mieux adapté pour gérer les variations biologiques. L'ACP a été utilisée ici pour mettre en évidence la variabilité existant dans l'enregistrement des ensembles de données spectrales au

cours des différentes expériences. En tant que méthode non supervisée, l'ACP ne peut être utilisée à des fins de classification et de prédiction. A ce titre, l'analyse discriminante linéaire (ADL ou LDA acronyme en anglais) a été utilisée. Car, contrairement à l'ACP, la LDA tente explicitement de modéliser la différence entre les classes de données. Ces différentes analyses ont été réalisées sur la matrice de données brutes en utilisant le logiciel R version 3.6.1 (2019-07-05).

#### 3.1.2.2.2 Analyse des images hyperspectrales Raman (K-means Clustering)

L'analyse des images hyperspectrales a été effectuée à partir de la méthode de K-means Clustering (KMCA). Cette méthode, à l'instar de l'ACP, permet de discriminer différents échantillons ou régions d'un échantillon, en fonction des différences dans leur contenu biochimique, et d'identifier les caractéristiques spectrales qui présentent le plus haut degré de variabilité<sup>269-271</sup>. Cette analyse est basée sur le principe mathématique développé par McQueen en 1967<sup>272</sup>, et qui vise à minimiser les différences au sein d'une zone tissulaire et à maximiser les différences entre les zones de la matrice. A cet effet, la distance euclidienne est utilisée pour définir les différences entre les zones (clusters). Ainsi, l'algorithme classe les zones en fonction des distances. Lorsque tous les points ont été associés à un centroïde, le regroupement initial est effectué. La deuxième étape consiste à calculer les nouveaux centroïdes en tant que barycentres des groupes résultant de l'étape précédente. Un nouveau regroupement est mis en place entre les mêmes points de données et les nouveaux centroïdes. L'opération se répète jusqu'à ce que les regroupements cessent et génèrent à la fin une image dans laquelle une couleur représente une classe particulière (cluster)<sup>273,274</sup> pour visualiser l'organisation des amas dans l'image originale. De ces images constituées, les spectres Raman moyens représentatifs correspondant aux différents clusters ont été isolés. Par la suite, nous avons déterminé l'intensité de surface intégrée pour chaque bande Raman clairement identifiable.

#### 3.1.2.2.3 Détermination de l'épaisseur de la matrice péricellulaire

La détermination de l'épaisseur de la matrice péricellulaire a été possible en se servant des images clusters formées à partir de l'analyse par k-means clustering suivant les différentes zones. Ainsi, à partir d'un algorithme incorporé dans Witec Project, en utilisant le « curseur manager R », nous avons pu évaluer l'épaisseur de la MPC en mesurant la distance d'un point X (immédiatement en contact avec la région de la cellule) et un point Y (intercession avec la

MEC) (voir tableau IV, colonne 1). Pour chaque zone, nous avons mesuré l'épaisseur en plusieurs points (50 points au total) sur la MPC prise sur quatre (4) images hyperspectrales différentes. Par la suite, la moyenne et l'écart-type ont été calculés pour les comparaisons entre les différentes zones.

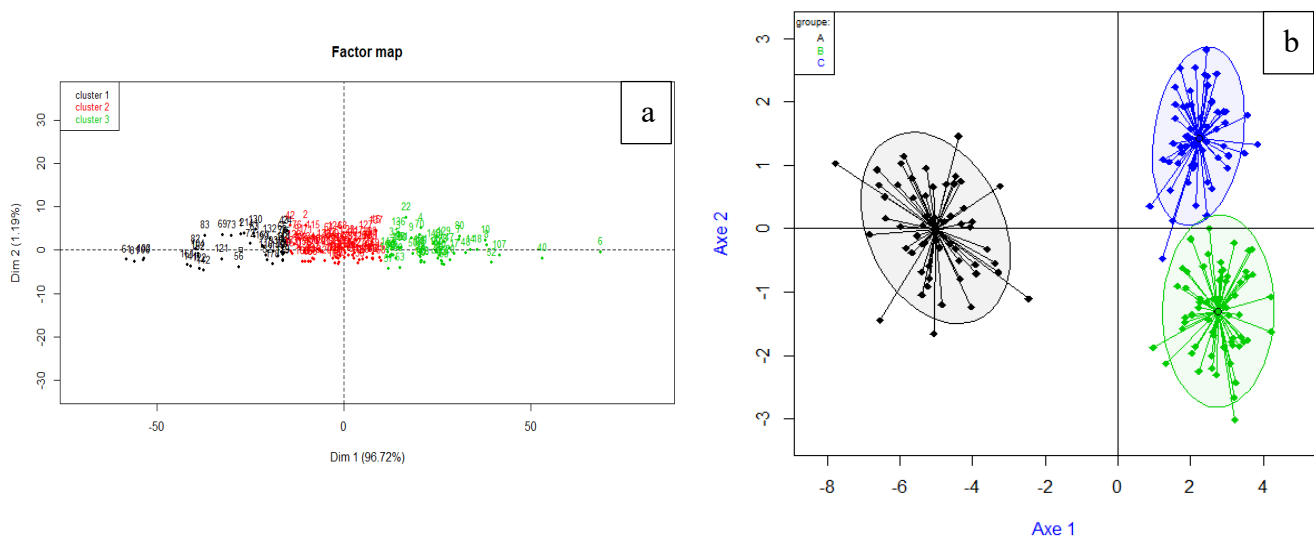
### 3.1.2.3 Analyse statistique

Compte tenu du fait que la distribution de nos données ne suivaient pas une loi normale, toutes nos analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test non paramétrique, notamment le test statistique Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks pour  $p < 0,001$  pour la significativité de nos résultats. Pour les comparaisons entre les différentes zones, le test statistique de Student-Newman-Keuls pour  $p\text{-value} < 0,05$  a été appliqué. Toutes nos données ont été traitées avec le logiciel SigmaPlot for Windows version 11.0 Build 11.0.0.77.

## 3.1.3 Résultats et Discussion

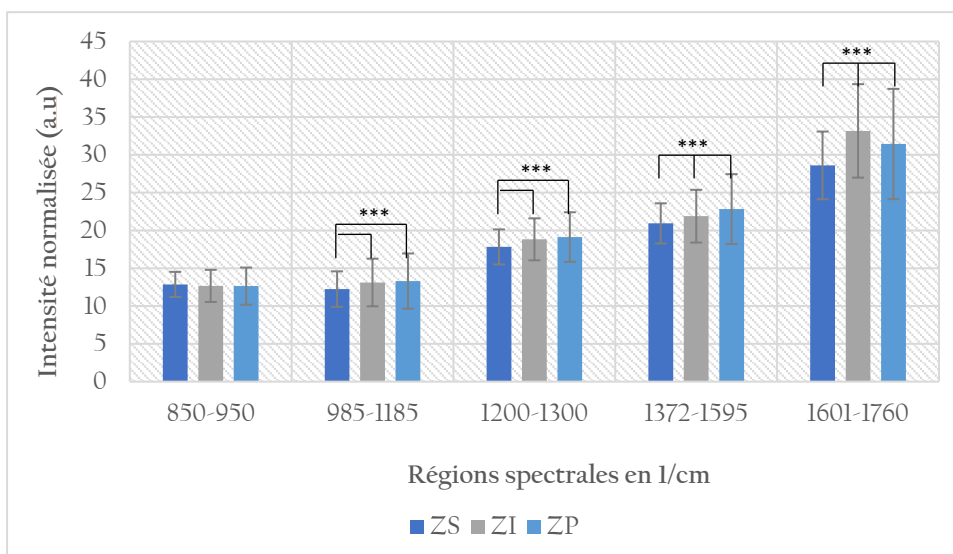
### 3.1.3.1 Caractérisation des différentes zones de la matrice cartilagineuse et la concentration des composants moléculaires des différentes zones

L'application de l'ACP-LDA à partir des spectres bruts recueillis ( $n = 120$  spectres par zone), nous a permis de caractériser les différentes zones distinctes du cartilage. L'avantage avec ces deux analyses (l'ACP et la LDA) est qu'elles sont étroitement liées en ce qu'elles recherchent toutes les deux des combinaisons linéaires de variables expliquant le mieux les données <sup>275</sup>. Contrairement à l'ACP qui ne prend en compte aucune différence de classe, la LDA tente explicitement de modéliser la différence entre les classes de données. Ainsi, en appliquant ces deux analyses, nous avons pu constater une séparation des spectres en trois grappes clairement distinctes correspondant aux différentes zones de la matrice du cartilage sans toutefois en spécifier les différentes régions construites autour de la cellule individuelle. Toutes les variables considérées ont été prises dans la région spectrale de  $600$  à  $1800\text{ cm}^{-1}$  et tracées par rapport aux trois premières composantes principales. Contrairement aux deux autres composantes (CP2 et CP3), la composante principale CP1 décrit la plus grande variation, représentant à elle seule  $96,72\%$  de la variance totale. Cette analyse montre la capacité de la microscopie Raman à mettre en évidence les différentes zones de la matrice du cartilage sans toutefois distinguer les différentes régions (MT, MPC et les chondrocytes).



**Figure 31 :** La réalisation de l'ACP-LDA à partir des spectres bruts (pris en différents points sur les chondrocytes, la MPC et la MT) permet une répartition des données distribuées sur le premier axe Dim 1 (96,72% de la variance totale), avec une classification en trois groupes montrant distinctement les différentes zones de la matrice du cartilage. Cette distinction est plus représentée avec la détermination la LDA avec calcul des pourcentages de biens classés.

En microscopie Raman, un spectre peut révéler simultanément plusieurs biomolécules importantes telles que les lipides, les protéines, les glucides et les acides nucléiques. Selon Barth, chaque biomolécule produit sa signature spectrale en fonction de la nature des liaisons et des concentrations des molécules. Pour évaluer les changements moléculaires dans le cartilage suivant les différentes zones, nous avons, à partir des spectres uniques collectés dans chaque zone, quantifié la teneur en biomolécules dans la matrice du cartilage en calculant l'intensité intégrée (aire) de certaines bandes Raman référencées<sup>276–279</sup>: la bande de 985-1185  $\text{cm}^{-1}$  (attribution de la région glucidique en corrélation avec la teneur en PG), la bande de 1200-1320  $\text{cm}^{-1}$  (bande amide III, correspondant au collagène de type II), 1372-1599  $\text{cm}^{-1}$  (amide II, attribution des protéines/lipides) et 1601-1762  $\text{cm}^{-1}$  (amide I, attribution du collagène de type I). La figure (31) montre une concentration des biomolécules évoluant à mesure qu'on s'éloigne de la surface du cartilage, notamment au niveau de la teneur en collagène II et en protéoglycanes, principaux composants du cartilage, dont la teneur est plus significative entre les zones superficielle et profonde ( $p < 0,05$ ).



**Figure 32** : Histogramme des différentes concentrations moléculaires par zone du cartilage articulaire. Calcul des intensités des 120 spectres collectés au niveau de chaque zone. Une augmentation relative de la concentration des différentes molécules (protéines, lipides et glucides etc.) selon qu'on s'éloigne de la surface du cartilage articulaire. Cette différence significative entre le taux de collagène et de protéoglycane dans les différentes zones superficielle et profonde ( $p < 0,05$ )

Ce résultat est en adéquation avec les observations de Muller et ses collaborateurs<sup>280</sup>, de même que Oswald et ses collaborateurs<sup>281</sup> qui ont respectivement montré qu'il était probable que la plupart, voire la totalité des quantités mesurables dans le cartilage articulaire présentaient certains types de dépendance avec la profondeur avec notamment pour ce qui concerne les concentrations des GAGs et de collagène qui augmenterait de la surface à la profondeur. En tout état de cause, outre les macromolécules (protéoglycanes et fibres de collagène) du cartilage qui dépendent de la profondeur, de nombreuses autres concentrations moléculaires dans le cartilage dépendent également de la profondeur.

**Tableau III : Table des assignations des pics et ou bandes Raman**

<i>Pics ou bandes Raman (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Assignations</i>	<i>Références</i>
700-900	Conformation des nucléotides	282
985-1185	Région glucidique	276-278
1200-1320	Région amide III	
1372-1598	Région amide II	279
1601-1762	Région amide I	279
756	Tryptophane ou Aggrécane à partir de cartilage articulaire bovin	
854	Vibrations des chaînes latérales des acides aminés de la proline et de l'hydroxyproline, ainsi qu'une vibration (C-C) du squelette du collagène	
945	Squelette extensible C-C Proline, hydroxyproline, squelette $\nu$ (C-C) du squelette de collagène	
1004	Phénylalanine	
1094	Phosphodioxy (PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) groups	
1130	Étirement C-O (glucides) ou squelette $\nu$ (C-C) du squelette acyle dans les lipides (transconformation)	
1250	Amide III (of collagen II)	
1452	Bandes de déformation C-H (groupes fonctionnels CH dans les lipides, chaînes latérales d'acides aminés des protéines et glucides)	
1664	Amide I (collagen I assignment)	

### 3.1.3.2 Caractérisation structurelle de la matrice du cartilage

L'application de l'analyse k-means clustering (KMCA) sur les images hyperspectrales Raman collectées ( $n=9$  par zone), a conduit à une spécialisation régionale de la matrice cartilagineuse construite autour de la cellule individuelle (chondrocytes), en matrices péricellulaire (MPC), territoriale et interterritoriale (constituant la majorité de la MEC) (*Tableau VI, colonne 1*). Cette configuration structurelle de la matrice confirme les variations dans la morphologie et l'orientation des chondrons dépendant de la profondeur, avec des chondrons discoïdes aplatis dans la zone superficielle, arrondis dans la zone médiane et allongés et/ou multicellulaires dans la zone profonde (*Tableau VI, colonne 1*). Les spectres Raman moyens représentatifs isolés correspondant aux différents clusters sont dépendants des régions présentant le même ordre d'alignement indépendamment de la profondeur.

La détermination de l'intensité intégrée (surface) correspondant à chaque bande dans chaque spectre Raman moyen, a permis d'obtenir une cartographie de pics en raison de leur concentration dans chaque région. Cet ensemble de pics Raman révèle les informations biochimiques et structurelles contenues dans les spectres dans chaque région matricielle. Le tableau IV présente la cartographie des principaux pics Raman (ou marqueurs Raman) typiques suivant les régions matricielles de la matrice du cartilage. En rapport avec certaines données de la littérature <sup>198,242,283-285</sup>, ces différents pics Raman ont été caractérisés et leurs assignations biochimiques présentées dans le Tableau V. A première vue, il est intéressant de noter des différences majeures dans la composition biochimique entre les différentes régions, indépendamment toutefois des différentes zones du cartilage articulaire.

Dans le compartiment de la MEC, les pics les plus résolus ou représentatifs sont localisés au niveau des bandes Raman à  $857\text{ cm}^{-1}$  (proline, hydroxyproline),  $946\text{ cm}^{-1}$  (proline,  $\nu(\text{C-C})$  épine dorsale du squelette du collagène),  $1207\text{ cm}^{-1}$  (hydroxyproline/tyrosine, assignation du collagène),  $1246\text{ cm}^{-1}$  (amide III  $\nu(\text{C-N})$  et  $\delta(\text{N-H})$  du collagène),  $1383\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{CH}_3)$  des glycosaminoglycanes) et  $1667\text{ cm}^{-1}$  (amide I, collagène I). La plupart des pics identifiés dans cette région sont essentiellement caractéristiques du collagène à l'exception du pic à  $1383\text{ cm}^{-1}$  attribué aux glycosaminoglycanes. Dans la MEC, le pic à  $1207\text{ cm}^{-1}$  semble particulièrement résolu contrairement aux autres régions matricielles (*Figure 33*) et pourrait être considéré comme un marqueur capital pour différencier la MEC des autres régions en termes non seulement de la présence, mais de la concentration du collagène de type II. En somme, ce résultat traduit aisément la nature particulièrement riche de la MEC en collagène

(50-60% du poids sec) <sup>286</sup>, par rapport aux protéoglycanes (15-30% de PGs en poids sec) <sup>286</sup>, traduit ici par le pic à 1383 cm<sup>-1</sup> (N-acétyl-glucosamine, attribution de l'acide hyaluronique <sup>287</sup>), squelette principal des GAGs. En effet, la molécule de l'acide hyaluronique est associée à d'autres glycosaminoglycanes et des protéines non collagéniques pour former de grands agrégats de protéoglycanes <sup>70</sup>. Elle aide à ancrer les protéoglycanes dans la matrice en empêchant leur déplacement pendant les phases de déformation du tissu, et par ailleurs, aide à organiser et stabiliser la relation entre les protéoglycanes et le maillage du collagène <sup>17</sup>.

**Tableau IV : Tableau récapitulatif des pics caractéristiques des différents composants de la matrice cartilagineuse.**

Zones	Régions	Les pics de différenciation (cm <sup>-1</sup> )								
<b>Zone Superficielle</b>	MEC	862	946	1039	1096	1207	1246	1383	1667	
	MPC	701	752	1007	1130	1173	<b>1308</b>	1345	1562	1590
	CELL	1065	1079	1130	1407	1590				
<b>Zone Intermédiaire</b>	MEC	862	946	1039	1096	1207	1246	1383	1667	
	MPC	701	759	1007	1130	1173	1345	<b>1554</b>	1568	1591
	CELL	1065	1079	1130	1407	1590				
<b>Zone Profonde</b>	MEC	856	944	1039	1096	1205	1247	1383	1667	
	MPC	702	752	1007	1130	1171	<b>1338</b>	1345	1560	1587
	CELL	1065	1079	1130	1407	1590				

Dans le cartilage articulaire, les chondrocytes sont immédiatement entourés d'une région matricielle unique appelée matrice péricellulaire (MPC) <sup>52</sup>, dont l'ensemble a été qualifié sous le terme de chondron. En considérant cette entité, les pics les plus résolus ou caractéristiques sont localisés à 752 cm<sup>-1</sup> (GAG), 1007 cm<sup>-1</sup> (vs(C-C) de phenylalanine), 1065 cm<sup>-1</sup> (vs (OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) GAGs), 1079 cm<sup>-1</sup> (vs (OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), GAGs), 1130 cm<sup>-1</sup> (GAGs), 1173 cm<sup>-1</sup> (δ(C-H), assignation des protéines), 1345 cm<sup>-1</sup> (déformation C-H, attribution aux GAGs), 1407 cm<sup>-1</sup> ((vsCOO<sup>-</sup>), GAGs), 1568 cm<sup>-1</sup> (vs(COO<sup>-</sup>), GAGs) et 1590 cm<sup>-1</sup> (phenylalanine/hydroxyproline, Thr) (*Tableau IV et V*). Il est remarquable de constater que la majorité des pics extraits de la MPC et

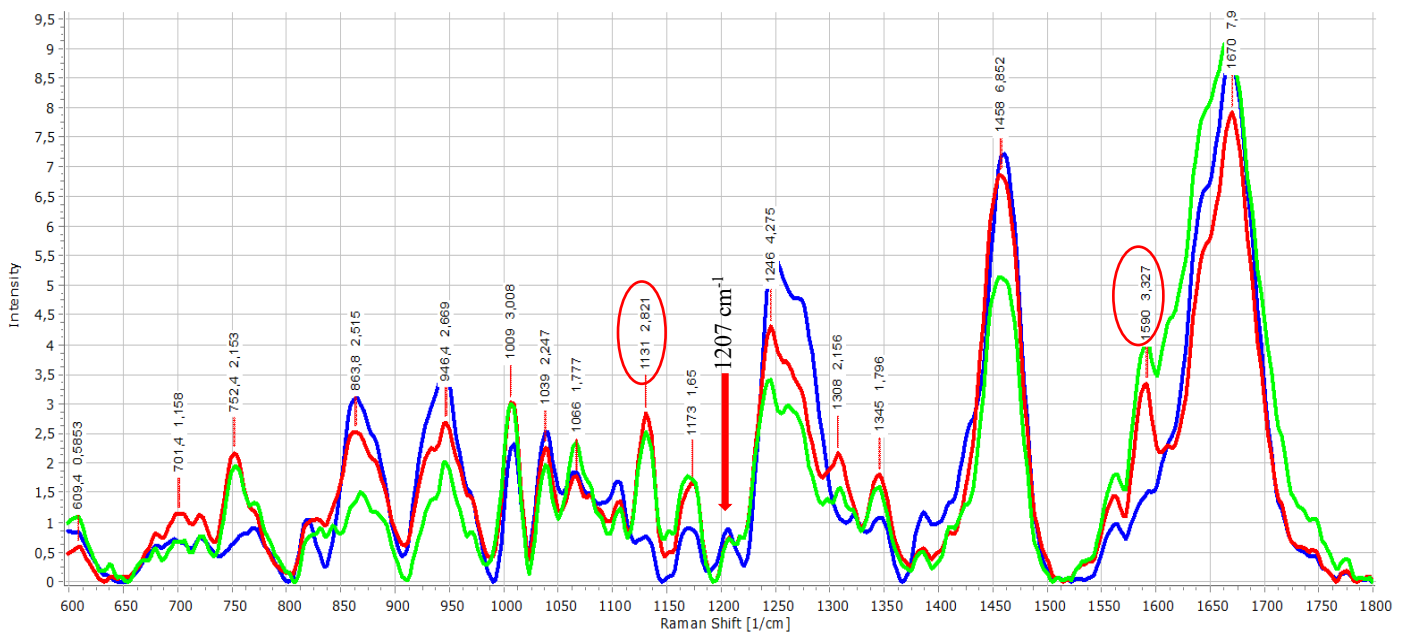


du chondrocytes est caractéristique des protéoglycanes. Ce qui traduit la richesse de ces deux régions matricielles en protéoglycanes et établissant ainsi le lien étroit existant entre ces deux régions matricielles <sup>288-291</sup>. Nos résultats sont en adéquation avec les observations de nombreuses études antérieures qui avaient également démontré que cette région était particulièrement riche en protéoglycanes <sup>52,289,290,292</sup>. Il est intéressant de préciser que la majorité des marqueurs du chondron relèvent principalement ceux de la MPC, contrairement aux chondrocytes. Ce qui n'est pas surprenant, car dans une étude réalisée par Zhang <sup>51</sup>, en comparant les protéomes des chondrons et des chondrocytes isolés, il avait démontré que les profils protéiques différentiels des chondrons comprenaient principalement des protéines de la MPC. Ainsi donc, contrairement à la MEC environnante riche en collagènes, la MPC et les chondrocytes sont particulièrement riche en protéoglycanes <sup>52,289,291,293</sup>.

Par ailleurs, deux remarques méritent d'être faites au niveau de ces deux régions. Les bandes Raman à  $1130\text{ cm}^{-1}$  (*C-O stretching (carbohydrates)*) et  $1590\text{ cm}^{-1}$  (*v(C=C) aromatic ring (Phe, Tyr)*) sont proportionnellement présentes dans le spectre moyen des deux régions. Le pic à  $1130\text{ cm}^{-1}$ , attribution des GAGs a toujours été considéré comme "l'empreinte digitale" de la présence des glycosaminoglycanes et de leurs distributions spatiales <sup>287</sup>, tandis que le pic à  $1590\text{ cm}^{-1}$  est l'attribution d'une protéine <sup>294,295</sup>. En raison de la présence l'hydroxy-proline dans sa composition biochimique, ce pic pourrait être attribué à un collagène. En effet, la présence de la forme hydroxylée de la proline permet la formation de liaisons covalentes entre différentes chaînes polypeptidiques voisines. Ce qui a pour but de rendre la structure plus résistante. Dans le cartilage articulaire, seules les fibres de collagène sont très résistantes à des forces de traction dans le sens de la longueur <sup>296</sup>. De plus, la présence d'hydroxyproline protège les protéines contre la digestion par les protéases. Des études ont montré que les protocoles d'isolement enzymatique des chondrons ont tiré parti de la résistance de la MPC et plus particulièrement du collagène de type VI, à la digestion de la dispase et la collagénase <sup>297</sup> et à l'aggrécane-1 (ADAMTS-4), l'hyaluronidase bactérienne et la chondroïtinase ABC <sup>298</sup>. Par conséquent, ce pic pourrait être considéré comme le marqueur du collagène de type VI.

Se référant à la littérature, la MPC dans un cartilage articulaire adulte normal, a été définie par la localisation et la présence exclusive ou à des concentrations plus élevées de collagène de type VI <sup>52,289,291,293</sup> autour du chondrocyte et de perlécane <sup>299</sup>. Ces deux protéines matricielles sont réputés être essentiels dans le développement normal du cartilage qui, avec la maturation se localise progressivement autour de la cellule jusqu'à ce qu'il se retrouve exclusivement ou à des concentrations élevées dans la MPC du cartilage adulte <sup>300-302</sup>. La

présence des pics à  $1130\text{ cm}^{-1}$  et  $1590\text{ cm}^{-1}$  aussi bien dans la MPC et que dans le chondrocyte pourrait être considérée non seulement comme les signatures spectrales du perlécane et du collagène de type VI respectivement, mais traduire la présence de ces deux protéines dans les deux régions, justifiant ainsi les fortes interactions entre la MPC et les chondrocytes. En effet, le perlécane est un PG de sulfate d'héparane de grande taille qui se trouve en grande concentration dans la MPC et co-localisé avec le collagène de type VI dans le cartilage articulaire normal<sup>290,299,303</sup>. Cette protéine a été trouvée essentielle dans le développement normal du cartilage, facilitant la fixation in vitro des chondrocytes. Il a la capacité de porter des chaînes de chondroïtine sulfate (CS), mais également des chaînes d'héparane sulfate (HS)<sup>299</sup>, ayant une forte affinité de liaison électrostatique pour le collagène de type VI et interagit avec d'autres protéines telles que la fibronectine et la laminine via sa protéine de base et à travers ses chaînes HS<sup>304-306</sup>. Ces différentes interactions permettent au perlécane de jouer un rôle important dans l'organisation structurelle et la stabilisation de la MPC du cartilage.



**Figure 33 :** Spectres moyens des clusters de la MEC (en bleu), la MPC (en rouge) et les chondrocytes (en vert) après prétraitement et normalisation par rapport à la région spectrale de  $600\text{ à }1800\text{ cm}^{-1}$

Le collagène de type VI est quant à lui définie à la fois comme une protéine structurale et de signalisation. Comme le perlécane, le collagène de type VI est également localisé exclusivement ou en quantité importante dans la région péricellulaire du cartilage normal, et facilite la fixation des cellules, mais aussi relie les tissus apparentés à la matrice environnante

<sup>307,308</sup>. Composant majeur du MPC, le collagène de type VI stabilise les phénotypes chondrocytaires et est essentiel à la survie des chondrocytes <sup>51</sup>. Dans de nombreuses études, il a été montré que le collagène de type VI joue un rôle critique dans les propriétés biomécaniques de la MPC et régule la transduction et la transmission des contraintes mécaniques et osmotiques de la MEC à la MPC, et donc au chondrocyte <sup>50,291</sup>. A ce titre, le collagène de type VI apparaît comme un capteur précoce de la réponse de blessure/réparation et peut réguler la fibrogenèse en modulant les interactions cellule-cellule. Par ailleurs, il est spécialisé dans la stimulation de la prolifération des cellules mésenchymateuses et empêcher l'apoptose cellulaire <sup>309,310</sup>.

En tout état de cause, à proximité immédiate des chondrocytes, la MPC apparaît comme le microenvironnement de ceux-ci <sup>49,57</sup> de sorte que tout signal biochimique ou biophysique perçu par le chondrocyte est susceptible d'être influencé et potentiellement régulé par les propriétés de la MPC <sup>291</sup> et vice versa. La MPC canalise la communication entre les chondrocytes et la MEC <sup>50</sup>, agissant ainsi comme un transducteur ou filtre essentiel des signaux biochimiques et biomécaniques du chondrocyte, permettant de réguler l'équilibre homéostatique de l'activité métabolique des chondrocytes, réponse aux signaux environnementaux.

Parmi les marqueurs de la MPC, trois bandes Raman se distinguent particulièrement dans les trois zones de la matrice du cartilage. Les pics  $1308\text{ cm}^{-1}$  (*Amide III, étirement asymétrique C-N dans les amines aromatiques asymétriques*),  $1554\text{ cm}^{-1}$  (*Amide II ; étirement C-N et flexion N-H*) et  $1338\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(N-H)$  et  $\nu(C-N)$ ; *Amide III, hélice  $\alpha$  hydratée*) dans la zone superficielle, médiane et profonde, respectivement. Ces différents pics sont tous des caractéristiques des pics protéiques du collagène. On pourrait donc supposer que la présence de ces trois pics distincts dans la MPC dans les différentes zones soit sûrement des indicateurs essentiels soit des différences dans la morphologie des chondrons dépendant de la profondeur <sup>311</sup>, mais également de l'orientation des fibrilles de collagène. Autrement, ces trois pics ont été considérés comme de bons indicateurs dans le suivi de la progression de l'arthrose, à cause de leur situation géographique zonale.

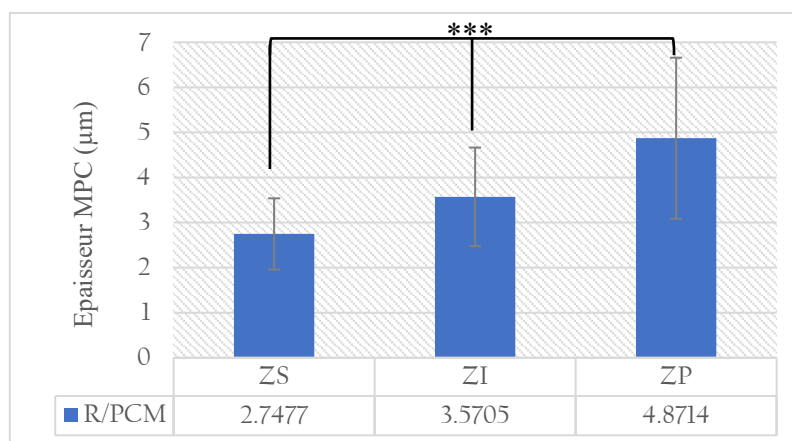
**Tableau V : Tableau des assignations des pics ou marqueurs caractéristiques identifiés au niveau de chaque région de la matrice du cartilage articulaire**

Pics (cm <sup>-1</sup> )	Assignations	Références
701/2-45	$\nu(\text{C-S})$ trans (amino acid methionine)	312
752/9	Symmetric breathing of tryptophan (protein assignment)/ Tryptophan ou Aggrecan from bovine articular cartilage	171,313-316
857/62	Amino acid side chain vibrations of proline & hydroxyproline, as well as a (C-C) vibration of the collagen backbone	315,317
946	Proline, hydroxyproline, $\nu(\text{C-C})$ skeletal of collagen backbone	171,315
1007	Phenylalanine $\nu(\text{CO})$ , $\nu(\text{CC})$ , $\delta(\text{OCH})$ , ring (polysaccharides, pectin)	318,319
1039	Stretching C-O ribose, $\omega(\text{CH}_2)$ , Phenylalanine	318,320
1065	$\nu(\text{S=O})$ (GAG), vibration d'étirement symétrique du groupe $\text{OSO}_3^-$ , attribution de la chondroïtine-4-sulfate	287
1079	Glycosaminoglycanes, vibration d'étirement symétrique du groupe $\text{OSO}_3^-$ , attribution de la chondroïtine-6-sulfate	287
1096	Phosphodioxy ( $\text{PO}_2^-$ ) groups Ring, C-N-R <sub>2</sub> stretch	321,322
1130	C-N stretching (proteins) C-O stretching (carbohydrates) $\nu(\text{C-C})$ skeletal of acyl backbone in lipid (transconformation)	224, 315,323
1171/3	Tyrosine (collagen type I) $\delta(\text{C-H})$ , tyrosine (protein assignment) Cytosine, guanine	313, 315,324
1205/7	Differences in collagen content Hydroxyproline, tyrosine (collagen assignment) Amide III & CH <sub>2</sub> wagging vibrations from glycine backbone & proline side chains Collagen	325,326
1246	Amide III (of collagen II)	315,327
1308	C-N asymmetric stretching in asymmetric aromatic amine CH <sub>3</sub> /CH <sub>2</sub> twisting, wagging &/or bending mode of collagen and lipids	315,318
1338	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> twisting, wagging &/or bending mode of collagen, nucleic acid & tryptophan and lipids// Amide III & CH <sub>2</sub> wagging vibration from glycine backbone and proline chain	315,327
1345	C-H deformation (proteins and carbohydrates) Glycosaminoglycanes, $\delta(\text{C-H})(\text{CH}_2)$	287,317
1383	CH <sub>3</sub> band/ N-acétyl-galactosamine (sulfate de chondroïtine)	171,285
1407	$\nu\text{COO}^-$ (IgG?), Sciss. (CH <sub>2</sub> )	328,329

<b>1554</b>	Amide II, COO <sup>-</sup>	(60)
<b>1560/8</b>	Tryptophan, Tyrosine, amide II, COO <sup>-</sup>	330-332
<b>1587/90</b>	Phenylalanine, hydroxyproline $\nu(\text{C}=\text{C})$ aromatic ring (Phe, Tyr) / Phe, Thr	315,333
<b>1667</b>	Amide I (of collagen I)	

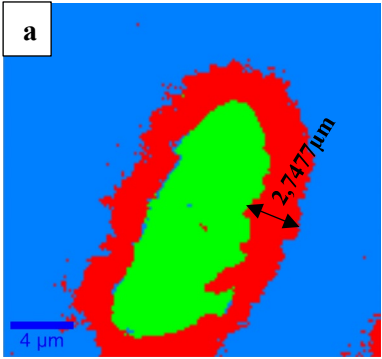
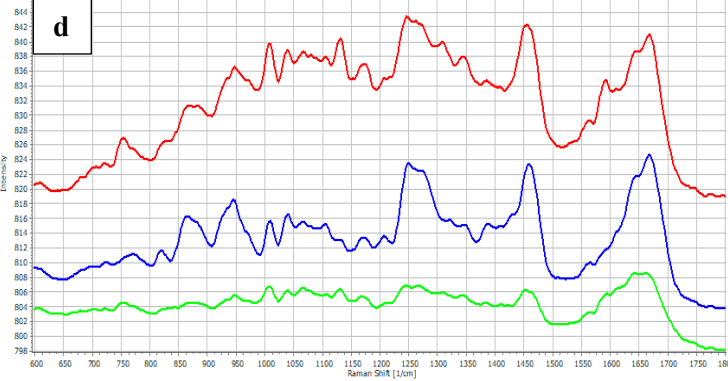
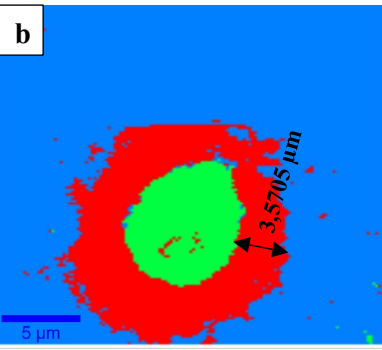
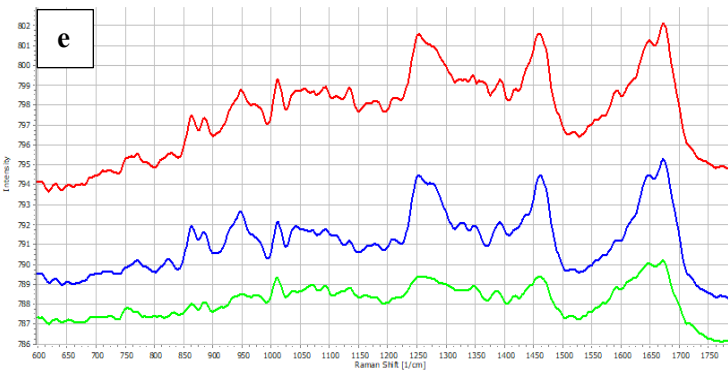
### 3.1.3.3 Caractérisation de l'épaisseur de la matrice péri-cellulaire (MPC)

La MPC est une fine couche spécialisée qui entoure immédiatement les chondrocytes qui, avec la ou les cellules enfermées, ont été appelées «chondrons»<sup>49,52</sup>. Les zones (superficielles, moyennes, profondes) peuvent être identifiées par la structure et la composition de la matrice extracellulaire (comme démontré plus haut), ainsi que par la forme et la disposition des cellules dans le tissu. Les différentes images clusters collectées suivant les zones ont mis en évidence des variations significatives dans la morphologie et de l'orientation des chondrocytes et des chondrons avec la profondeur, montrant ainsi des chondrons discoïdes aplatis dans la zone superficielle, arrondis dans la zone médiane et allongés et/ou multicellulaires dans la zone profonde (Tableau VI, colonne 1). La caractérisation de l'épaisseur de la MPC a été réalisée en déterminant, sur l'image cluster de la MPC dans chaque zone, plusieurs mesures du périmètre de celle-ci. Ainsi, à partir de plusieurs points (50 au total) mesurés sur 4 différentes images hyperspectrales prise sur différents échantillons (Tableau VI, colonne 1), nous avons déterminé l'épaisseur de la MPC. Le calcul de la moyenne et l'écart-type ont permis d'effectuer les comparaisons de la taille de la MPC autour des cellules entre suivant les différentes zones. Il est intéressant de constater une variation significative croissante de la zone superficielle à la zone profonde (zone superficielle est =  $2,7\pm 0,8$ , zone intermédiaire =  $3,6\pm 1,1$  et la zone profonde =  $4,9\pm 1,8$ ) (Tableau VI, colonne 4).

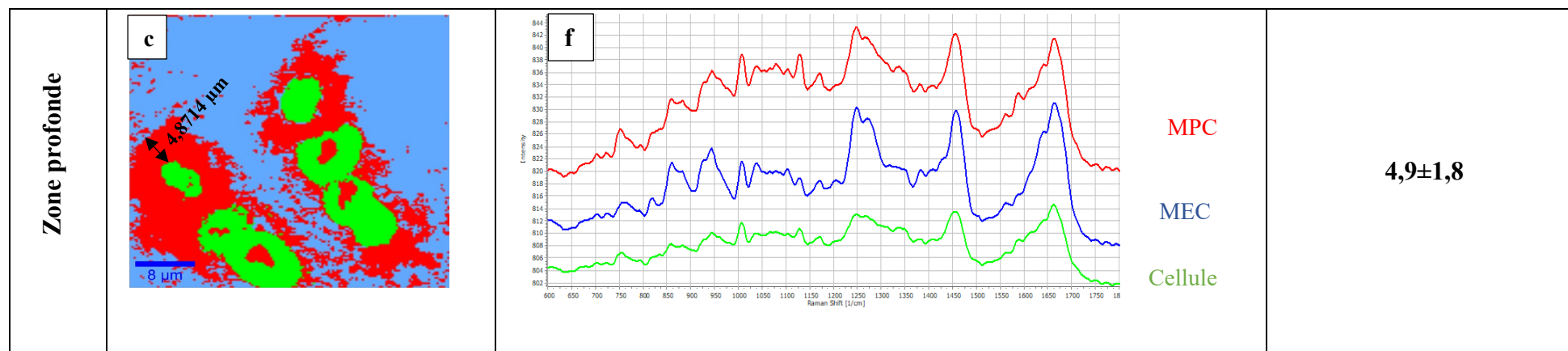


**Figure 34:** Histogramme des moyennes et écart-types calculés de l'épaisseur de la matrice péri-cellulaire (MPC). Données recueillies à 50 points sur 4 différentes images hyperspectrales mettant en évidence la MPC. Différence significative ( $p < 0,001$ ) entre les épaisseurs de la MPC dans les différentes zones

Cette constatation est en adéquation avec les résultats de Youn et al <sup>50</sup> qui ont abouti aux mêmes observations montrant une épaisseur de la MPC augmentant avec la profondeur. Cette différence dans la morphologie de la MPC avec la profondeur a été caractérisée par les différences dans les types et les modèles de compression, de cisaillement et de pression hydrostatique entraînant des changements dans la distribution, l'organisation, la synthèse et les taux de renouvellement de divers composants de la matrice, assurant un rôle de protecteur des chondrocytes lors des charges mécaniques et aide à maintenir le phénotype chondrocytaire.

	Cellules des différentes zones du cartilage articulaire	Spectres moyens des clusters de la matrice cartilagineuse par zone	Épaisseur de la matrice péri-cellulaire (MPC)
Zone superficielle		 <p>MPC</p> <p>MEC</p> <p>Cellule</p>	$2,7\pm 0,8$
Zone intermédiaire		 <p>MPC</p> <p>MEC</p> <p>Cellule</p>	$3,6\pm 1,1$





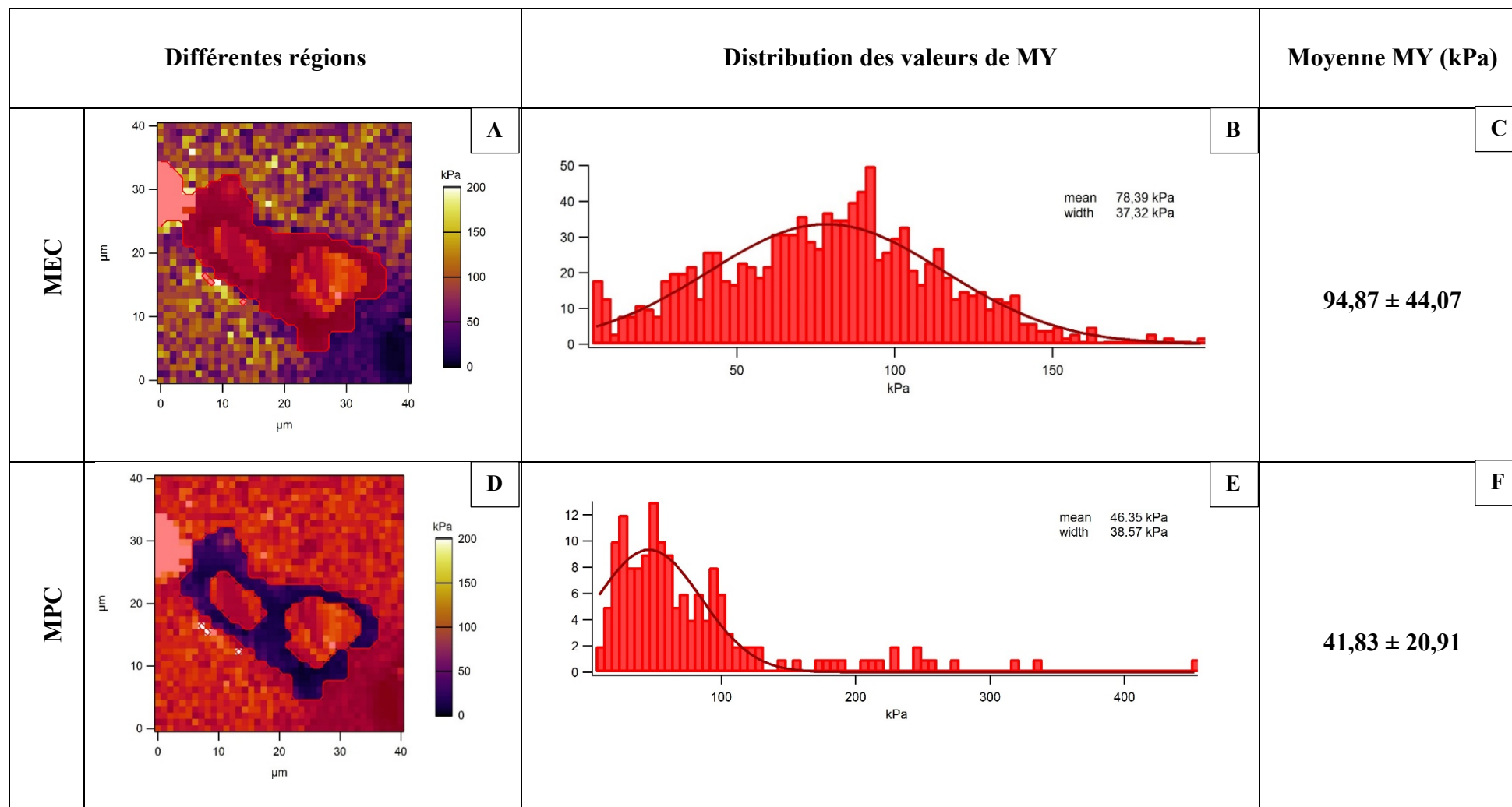
**Tableau VI :** Images hyperspectrales reconstruites de la matrice de cartilage dans les zones superficielle (a), médiane (c) et profonde (e) après traitement k-means Clustering ; alignement des spectres Raman moyens isolés des clusters correspondant aux principaux composants de la matrice du cartilage (vert : chondrocyte, rouge : matrice péricellulaire et vert bleu : matrice territoriale (ou MEC) suivant les différentes zones superficielle (b), zone médiane (d), zone profonde (f). détermination de l'épaisseur de la matrice péricellulaire dépendante de la profondeur

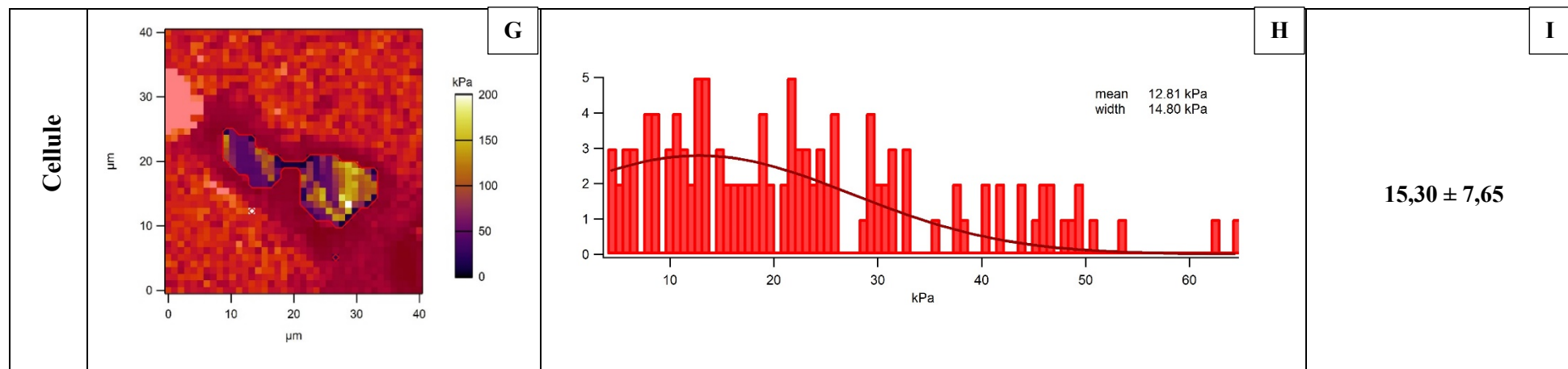
#### 3.1.3.4 Caractérisation du module d'élasticité (module de Young)

La capacité du cartilage articulaire à remplir ses diverses fonctions est intimement liée à ses propriétés biomécaniques. L'utilisation de la microscopie à force atomique a permis d'évaluer les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. Les mesures ont été réalisées de sur les différents échantillons de la zone superficielle à la zone profonde en s'aidant du biseau initialement réalisé lors de la biopsie, mais aussi de l'orientation des chondrons dans chaque zone.

De façon successive, nous avons effectué plusieurs mesures AFM de la matrice globale suivant les différentes zones, mais spécifiquement nous avons déterminé le module d'élasticité ( $E_0$ ) des différentes régions que sont la MEC, la MPC et la cellule en isolant à chaque fois les régions non concernées. Par la suite, nous avons calculé la moyenne et l'écart type résultant des mesures effectuées aussi bien au niveau de la matrice globale suivant les différentes zones que des différentes régions matricielles. Les résultats sont illustrés dans le tableau VII et montrent un module d'élasticité significativement variable de la matrice extracellulaire à la cellule individuelle (matrice extracellulaire  $E_0 = 94,87 \pm 44,07$ , matrice péricellulaire  $E_0 = 44,83 \pm 20,91$  et le chondrocyte  $E_0 = 15,30 \pm 7,65$ ). Dans des études antérieures, de telles différences ont également été observées en sondant le module de Young de la zone superficielle à la zone profonde. Toutes ces variations dans la caractérisation du module d'élasticité ( $E_0$ ) traduisent à la fois l'inhomogénéité de la matrice du cartilage sur toute son épaisseur et sa complexité.

Ces résultats montrent une parfaite complémentarité entre la microscopie à force atomique et la microscopie confocale Raman pour la caractérisation des propriétés biomécaniques de la microstructure de la matrice du cartilage.





**c**

### 3.1.4 Conclusion partielle 1

La simplicité superficielle du cartilage articulaire cache sa complexité sous-jacente. L'organisation microstructurale du cartilage articulaire est intimement liée au métabolisme cellulaire et à la fonction biomécanique des tissus<sup>259</sup>. La capacité à caractériser la composition et la distribution de la matrice du cartilage et les marqueurs spécifiques à chaque région matricielle est essentielle pour comprendre le processus par lequel le cartilage articulaire subit une dégénérescence liée à la maladie, mais aussi pour développer de nouvelles stratégies de réparation tissulaire, afin de restaurer la fonctionnalité des tissus<sup>334</sup>.

L'évaluation du tissu cartilagineux à partir de la microscopie confocale Raman utilisée dans notre étude, a permis de mettre en évidence les variations significatives dans la morphologie, la taille et l'orientation des chondrons à travers toute la profondeur de la matrice. A mesure qu'on s'éloigne de la surface articulaire, la concentration des biomolécules est de plus en plus importante. En utilisant la méthode d'analyse k-means clustering appliquée sur les images hyperspectrales, a conduit à une régionalisation de la matrice en matrice extracellulaire (MEC), matrice péricellulaire construite autour de la cellule individuelle (chondrocyte). Cette organisation structurelle est caractérisée par une répartition variable spécifique des composants biochimiques, avec une MEC riche en collagènes, notamment le collagène de type II, contrairement à la matrice péricellulaire et le chondrocyte plus riches en protéoglycanes, indépendamment des différentes zones de la matrice. Le calcul de l'épaisseur de la matrice péricellulaire a également montré une variation significative de celle-ci dépendant de la profondeur. En outre, la détermination du module de Young (YM) de la matrice, à partir de la microscopie à force atomique, a montré des variations significatives de la matrice cartilagineuse avec respectivement un module de Young  $E_0 = 94,87 \pm 44,07$  pour la matrice extracellulaire,  $E_0 = 44,83 \pm 20,91$  pour matrice péricellulaire  $E_0 = 15,30 \pm 7,65$  pour et le chondrocyte. Ces différences entre la matrice extracellulaire, la matrice péricellulaire et le chondrocyte, traduisent les inhomogénéités de la matrice cartilagineuse qu'il convient d'intégrer dans les conceptions de tissu cartilagineux par ingénierie tissulaire.

Toutes ces variations dans l'organisation morphologique et moléculaire de la matrice traduisent la complexité de la matrice du cartilage qui méritent d'être pris en compte dans la conception de tissu de construction par ingénierie tissulaire. Aussi, la caractérisation des différences biochimiques spécifiques de la matrice articulaire, a-t-il montré une complémentarité entre la méthode d'analyse k-means clustering (KMCA) et la microscopie confocale Raman pour une évaluation plus détaillée du tissu cartilagineux.

### **3.2 Caractérisation des mécanismes sous-jacents au développement de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire : dédifférenciation des chondrocytes et différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) en chondrocytes**

### 3.2.1 Introduction

La difficulté du cartilage articulaire à se régénérer a suscité le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour remplacer le cartilage lésé. A ce jour, deux sources de cellules progénitrices sont exploitées pour la réparation des défauts cartilagineux pour des applications cliniques : les chondrocytes, seules résidentes et responsables du renouvellement de la MEC dégradée et, les cellules souches mésenchymateuses pour leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires, y compris les chondrocytes<sup>151</sup>. L'implantation des chondrocytes autologues (ICA) est l'une des stratégies de réparation cellulaire les plus utilisées pour le cartilage articulaire. L'idée est de combler le défaut cartilagineux avec des chondrocytes autologues prélevés directement sur le patient sur une articulation saine non portante, puis amplifier *in vitro* et réimplantés. Malgré tous les progrès réalisés avec l'ICA au cours des deux dernières décennies, l'un des principaux obstacles à la réparation réussie du cartilage est la dédifférenciation des chondrocytes pendant la phase d'expansion en culture monocouche. Au lieu d'un cartilage hyalin attendu, les chondrocytes se dédifférencient pour adopter un phénotype fibroblastique en produisant des protéoglycanes non spécifiques et de collagène de type I<sup>129,140</sup>.

L'amélioration de ces stratégies intègre désormais l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour obtenir un nombre suffisant de cellules pour l'implantation<sup>123</sup>. En raison de leur adhérence à la boîte de culture, elles peuvent être développées en culture tout en conservant leur multipotence<sup>152</sup>. De ce fait, elles peuvent être induites pour générer des chondrocytes<sup>153,154</sup>. Des études antérieures ont révélé des propriétés immunomodulatrices des CSM qui peuvent être exploitées pour le traitement des affections inflammatoires et rhumatismales<sup>154,155</sup>. De plus, les CSM peuvent migrer vers les sites de lésion et induire une tolérance périphérique en inhibant la libération de cellules souches pro-inflammatoires. Ce qui fait des CSM de bons candidats.

En général, l'évaluation de la formation de la matrice cartilagineuse est réalisée par des dosages biologiques, tels que l'immunocytochimie, le tri cellulaire activé par fluorescence, la réaction en chaîne par polymérase et l'analyse d'hybridation *in situ* de l'ARN, pour identifier et caractériser le phénotype chondrocytaire. L'objectif est de mesurer l'expression de gènes spécifiques, notamment le collagène de type II et les GAGs (en particulier l'aggrécane). Sur le plan pratique, ces techniques sont très invasives et laborieuses, nécessitant en plus des marqueurs ou des lyses cellulaires et la fixation cellulaire.

La nécessité de méthodes non invasives plus rapides pour caractériser et surveiller les mécanismes chondrogéniques *in situ* et en temps réel est évidente. La spectroscopie Raman a largement été utilisée pour analyser des échantillons biologiques, y compris des tissus et des cellules. Il s'agit d'une technique analytique bien établie capable de déterminer la composition chimique et les interactions moléculaires dans des échantillons micrométriques. Elle ne nécessite pas de préparation et ni de contact avec l'échantillon, l'utilisation d'étiquettes et/ou de produits chimiques améliorant le contraste. En raison de ses caractéristiques non destructives et sans étiquette, cette technique semble appropriée pour les mesures *in situ*. Dans de nombreuses études, la spectroscopie Raman a été utilisée pour étudier les cellules vivantes *in situ*<sup>195,335,336</sup> ainsi que divers changements biochimiques liés au cycle cellulaire et à la mort cellulaire<sup>337,338</sup>.

Dans ce travail, nous démontrons que la microscopie confocale Raman est capable de caractériser les changements dans le phénotype des chondrocytes isolés de leur environnement tridimensionnel (3D) et de suivre les changements biochimiques au cours de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs).

### **3.2.2 Matériels et Méthodes**

#### **3.2.2.1 Les sources cellulaires**

Deux types d'échantillons ont été exploités dans ce travail. Le premier groupe d'échantillons était constitué de chondrocytes humains isolés du cartilage du genou d'un patient après son consentement éclairé. Par la suite, les chondrocytes ont été isolés par digestion enzymatique par la collagénase, puis expansés par passage en série en culture monocouche 2D. Cette procédure a été répétée jusqu'au passage quatre (P4), passage au cours duquel la vitesse de croissance en monocouche est estimée insuffisante pour maintenir un nombre de cellules suffisant pour une production supplémentaire<sup>3</sup>. Ces expériences ont été répétées trois fois à différentes dates : un jeu de passage P1 à P4 en mai 2019 et deux jeux en octobre 2019, puis des comparaisons ont été effectuées pour apprécier la dédifférenciation et caractériser les marqueurs Raman. Les chondrocytes étaient directement expansés sur des lames CaF<sub>2</sub> pour les besoins des mesures Raman. Le second type d'échantillons était constitué de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) indifférenciées. Les cellules ont été granulées dans des tubes coniques et maintenues dans des milieux chondrogéniques, additionnés ou non avec le facteur de croissance transformant-bêta 3 (TGF- $\beta$ 3) pendant 21 jours. Les micropellets obtenus ont été lavés plusieurs fois (au moins trois fois) avec du PBS 5%, puis fixés sur des lames CaF<sub>2</sub>



avec du Cell-Tak<sup>®</sup>, puis immergées dans une boîte de Pétri contenant du PBS pour les mesures Raman.

Toutes les cultures cellulaires ont été réalisées et fournies par l'équipe Danièle de l'Institut de Médecine Régénérative et Biothérapies Montpellier (IRMB). Les tissus sains ont été récupérés après approbation par l'Agence de la Biomédecine (N° d'autorisation : PFS16-006) pour les sujets post mortem ou pour les patients amputés (C17-53). L'étude a été menée conformément aux directives et règlements du Comité d'éthique du CHU de Montpellier du Languedoc-Roussillon avec l'approbation du ministère de l'Éducation, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

### 3.2.2.2 Analyse morphologique des chondrocytes dédifférenciés

Pour observer le phénomène de dédifférenciation, plusieurs images optiques ont été réalisées pour chaque passage à l'aide du microscope optique à large champ avec un objectif CP-ACHROMAT 10x/0,25 Ph1). Par la suite, les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ<sup>®</sup> en utilisant un système de changement de contraste afin de visualiser et compter les cellules (mesures relatives). Cette application a la possibilité de déterminer automatiquement le nombre de cellules relativement à partir de paramètres, tels que de forme, surface, périmètre, de diamètre de Feret (décrit la distance moyenne entre les paires de tangentes parallèles au contour projeté de la cellule sélectionnée) et bien d'autres caractéristiques (voir Tableau VIII). Toutes les images ont été réalisées à l'échelle de « 500 pixels jusqu'à l'infinie » pour toutes les cellules lors de l'enregistrement des différents paramètres. Sur les résultats obtenus, on pouvait directement lire la valeur de la circularité des cellules à chaque passage. Cette circularité peut être aussi déterminée en calculant le facteur de forme ( $S$ ) suivant la formule ci-dessous :

$$S = \frac{4\pi A}{p^2} \quad \text{Avec } S \in [0, 1]$$

Où  $A$  correspond à la surface de la cellule et  $p$  au périmètre de la cellule avec  $\pi = 3.14159$ . La circularité est comprise entre 0 et 1. De sorte que pour  $S = 1$ , les cellules sont considérées comme ayant une forme circulaire et pour  $S < 1$  ou proche de 0, les celles ont une forme allongée (caractérisant le phenotype fibroblastique).

### 3.2.2.3 Traitement et Analyse des données spectrales Raman

Pour les chondrocytes différenciés, pour chaque passage de P1 à P4, des mesures spectrales Raman (50 spectres pris à différents endroits sur les cellules) ont été effectuées. Le même procédé a été utilisé pour collecter les spectres Raman sur les hMSCs différenciées. Bien évidemment, avant de soumettre les données spectrales à des analyses statistiques, tous les spectres Raman ont subi un prétraitement au moyen de techniques bien établies et antérieurement décrites<sup>339,340</sup>, afin d'obtenir des spectres ayant la même échelle et de permettre des comparaisons cohérentes là où les variations d'intensité peuvent être relatives à l'intensité de chaque spectre<sup>242</sup>. La plage de longueurs d'onde (ou encore « empreintes digitales ») comprise entre 600-1800  $\text{cm}^{-1}$  a été considérée pour les analyses spectrales, en raison de sa spécificité moléculaire plus élevée. Sur la base des rapports de surface de bande Raman normalisés, le suivi et la caractérisation des différents échantillons ont été effectués en s'appuyant sur certaines bandes Raman de l'ADN, du collagène et des protéoglycanes. Car, cela a permis d'évaluer la concentration relative des biomolécules au sein de chaque échantillon<sup>341</sup>. Des images optiques Raman ont été également réalisées à chaque passage (Figure 35).

Par ailleurs, des analyses chimiométriques telles que l'analyse de la composante principale (ACP), l'analyse linéaire discriminante (LDA) et la dérivée seconde ont été réalisées pour apprécier à la fois la distinction entre les échantillons et caractériser les variations biochimiques. L'ACP est une méthode d'analyse multivariée qui réduit les spectres en un nombre défini de composantes principales (CP) qui tiennent compte de la variance spectrale. Elle prend en compte l'ensemble des pixels des spectres pour décrire la variation dans l'image à l'aide d'un petit nombre de contributions de base (composantes principales) liées aux comportements spectral et spatial<sup>247</sup>. Il résout donc les problèmes susmentionnés de cartes thermiques d'intensité de bande et est mieux adapté pour gérer les variations biologiques. L'ACP a été utilisée ici pour mettre en évidence la variabilité existant dans l'enregistrement des ensembles de données spectrales au cours des différentes expériences. En tant que méthode non supervisée, l'ACP ne peut être utilisée à des fins de classification et de prédiction. A ce titre, l'analyse discriminante linéaire (ADL ou LDA acronyme en anglais) a été utilisée. Car, contrairement à l'ACP, la LDA tente explicitement de modéliser la différence entre les classes de données. Les différentes analyses ACP et LDA ont été réalisées sur la matrice de données brutes en utilisant le logiciel R version 3.6.1 (2019-07-05). Dans certaines conditions, nous avons appliqué la dérivée seconde pour identifier et caractériser de façon spécifique certaines différences subtiles entre les échantillons.

### 3.2.3 Analyses statistiques

Compte tenu du fait que la distribution de nos données ne suivait pas une loi normale, toutes nos analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test non paramétrique, notamment le test statistique Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks pour  $p < 0,001$  pour la significativité de nos résultats. Pour les comparaisons entre les différentes zones, le test statistique de Student-Newman-Keuls pour  $p\text{-value} < 0,05$  a été appliqué. Toutes nos données ont été traitées avec le logiciel SigmaPlot for Windows version 11.0 Build 11.0.0.77.

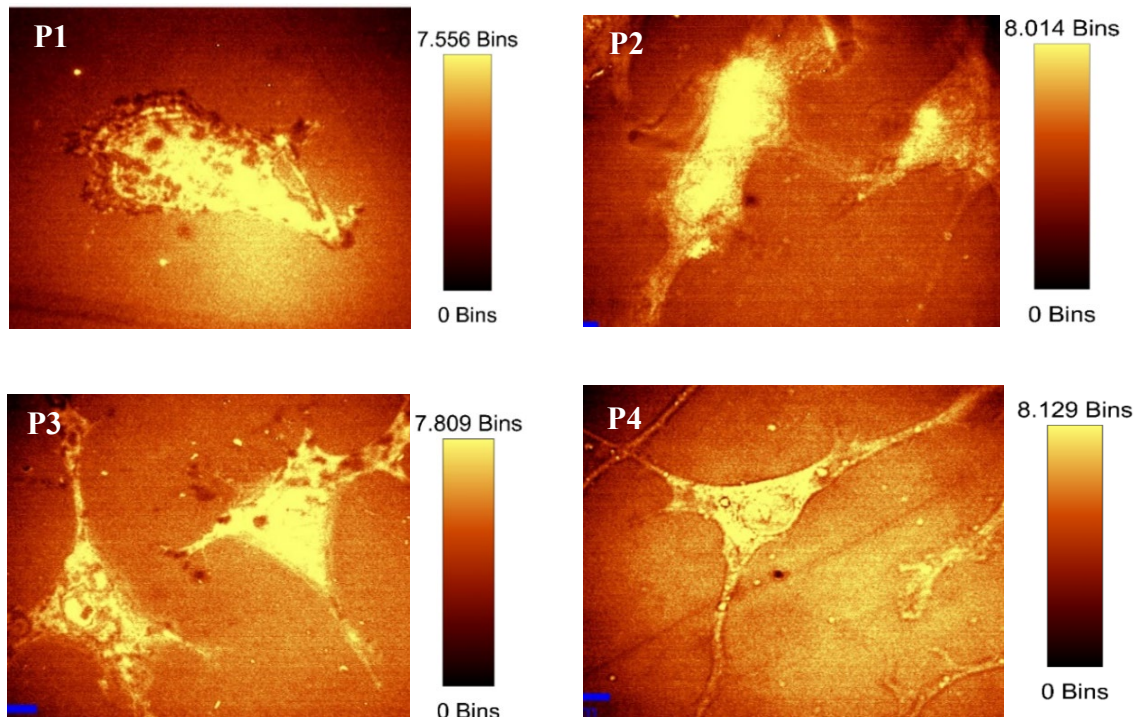
### 3.2.4 Résultats

#### 3.2.4.1 Analyse morphologique des chondrocytes dédifférenciés

Les chondrocytes dans le cartilage articulaire évoluent dans un environnement tridimensionnel (3D). Isolés de leur milieu habituel pour être ensemencés dans des cultures 2D, les chondrocytes ont connu un changement dans leur morphologie. Ces changements morphologiques ont été mis en évidence par le calcul de la circularité qui renseigne la taille de la cellule. Dans le tableau I, la colonne de la circularité (Cir), nous pouvons observer une décroissance de la circularité des cellules au fil et à mesure des passages. Ce qui traduit la dédifférenciation des cellules qui, d'une forme plus ou moins arrondie (P1), adoptent une morphologie plus allongée (P4). En effet, dans des conditions de culture monocouche ou 2D, les chondrocytes sont forcés d'abandonner leur forme ronde afin d'adhérer au plastique pour survivre adoptant ainsi un autre phénotype fibroblastique. Cette observation peut être visualisée sur la figure 35 (images optiques Raman) qui montre les cellules à chaque passage et mettant ainsi en corrélation les changements morphologiques micrométriques intervenus à mesure que le nombre de passage augmente. Les transformations dans la morphologie des cellules au fil des passages sont évidentes : d'une cellule plus ou moins ronde et sans flagelle à P1, les cellules adoptent une morphologie de plus allongée avec le développement des flagelles pour mieux adhérer à la lame CaF2.

Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Perim.	Circ.	Solidité	Feret	Feret X
P1	178	571126	3208,573	5,077	850,684	0,072	0,509	119,355	2201
P2	371	1239578	3341,181	11,018	1139,351	0,044	0,434	127,055	2387,046
P3	410	1479863	3609,422	13,154	1162,983	0,045	0,435	123,892	2221,98
P4	354	1885260	5325,593	16,758	1740,815	0,032	0,39	156,784	2267,904

**Tableau VIII** : Détermination de la circularité des cellules suivant les passages (P1 à P4) à partir des images optiques collectées et traitées avec ImageJ®. Les changements peuvent être observés avec la diminution de la circularité (S) des cellules décroît au fil des passages. La circularité à P4 est plus faible par rapport aux autres passages (P1, P2 et P3). Les cellules à P4 présentent une morphologie plus grande avec un aspect plus allongé. Les cellules à P2 et P3 présentent sensiblement la même densité cellulaire, mais aussi la même morphologie et un aspect un peu moins allongé par rapport à P4. Abréviations : Count = Estimation nombre des cellules/boite ; Perim = Périmètre ; Cir = Circularité



**Figure 35** : Images optiques Raman des cellules aux différents passages de P1 à P4.

### 3.2.4.2 Analyse des données spectrales des chondrocytes dédifférenciés

A partir de certaines bandes Raman choisies pour leurs spécificités moléculaires, mais aussi pour leur capacité à fournir des informations biochimiques et structurales importantes sur les cellules, la concentration relative des biomolécules a été caractérisée. Le calcul de la moyenne et l'écart-type des rapports d'intensité de chaque bande Raman ( $n= 50$  spectres/passages) permet de discriminer les différents passages et d'apprécier les différences moléculaires au sein des spectres des chondrocytes au fil des passages. En principe, l'intensité des bandes Raman mesurées est linéairement proportionnelle à la concentration des constituants moléculaires. Sur les trois groupes d'échantillons, les variabilités dans le rapport d'intensité sont diverses et difficilement interprétables. Cependant, ces trois échantillons semblent sensiblement présenter le même profil au niveau des bandes Raman à  $1063\text{ cm}^{-1}$  (attribution des GAGs),  $1255\text{ cm}^{-1}$  (attribution du collagène de type II),  $1449\text{ cm}^{-1}$  (protéines/lipides) et à  $1659\text{ cm}^{-1}$  (attribution du collagène de type I) au fil des passages. Les bandes à  $1063\text{ cm}^{-1}$  et  $1255\text{ cm}^{-1}$  sont connues pour renseigner sur la teneur en protéoglycanes et en collagène de type II, respectivement <sup>4,198,341</sup>. Ces deux bandes présentent une diminution progressive du taux de protéoglycanes et de collagène de type II dans le milieu au fur et à mesure des passages.

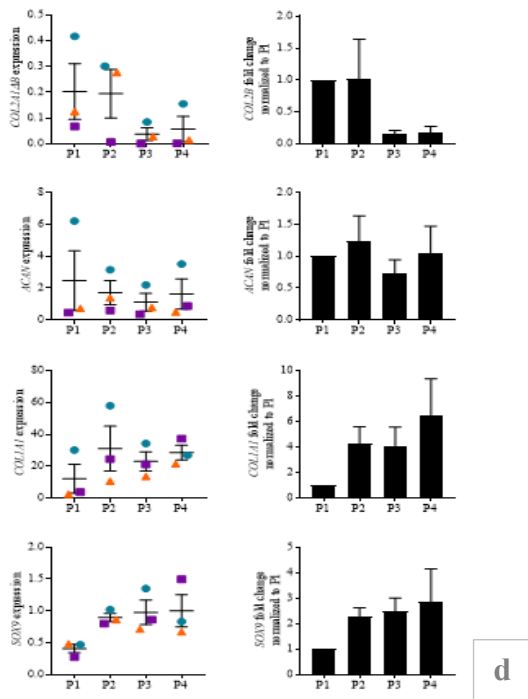
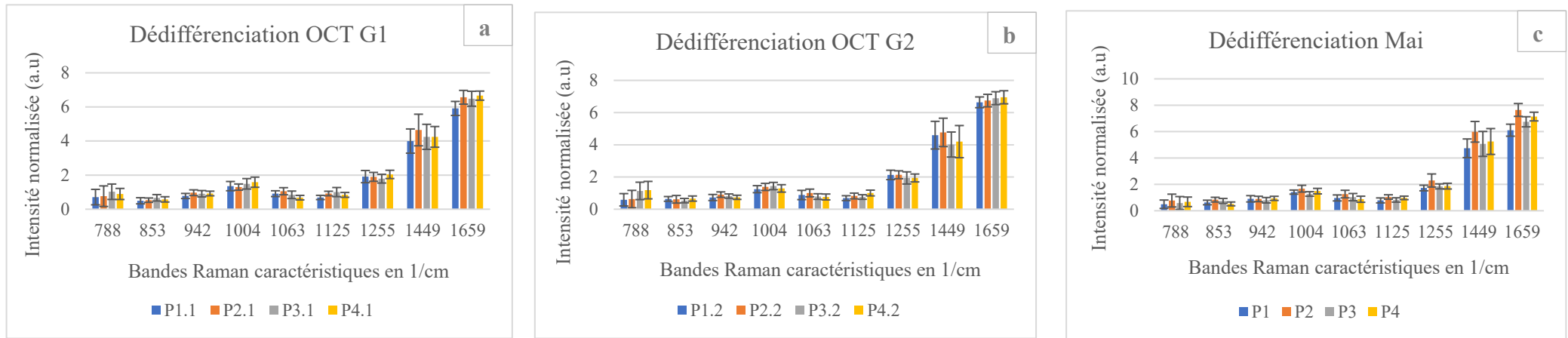
A l'inverse, nous avons un taux de collagène de type I, représenté par la bande à  $1659\text{ cm}^{-1}$  qui croît progressivement avec les passages. Autre constat, la bande à  $1449\text{ cm}^{-1}$  (bande de déformation CH) présente une variabilité dans la concentration biomoléculaire au fil des passages, avec notamment un pic à P2 et diminue progressivement par la suite. Dans les analyses Raman, la bande à  $1449\text{ cm}^{-1}$  renseigne sur la concentration totale relative des protéines et lipides et permet par ailleurs, d'apprécier la contribution du cytoplasme environnant. Cette bande a été trouvée est insensible à certaines conformations environnementales, de sorte qu'elle est parfois considérée comme norme d'intensité <sup>342</sup>. En observant le comportement des cellules à chaque passage et le pic à P2, nous pouvons suggérer que le passage à P2 est largement suffisant pour obtenir une densité cellulaire importante, capable de faciliter la redifférenciation des chondrocytes dans des cultures en suspension. Par conséquent, la bande Raman à  $1449\text{ cm}^{-1}$  pourrait être considérée comme un indicateur pour renseigner sur la viabilité des cellules, sur leur croissance et ou la mort cellulaire.

Nos résultats sur la dédifférenciation des chondrocytes ont été comparés avec des analyses de quantification de l'expression des gènes principaux impliqués dans la chondrogenèse. Les tests qPCR ont montré des expressions du collagène, aussi bien de type IIA

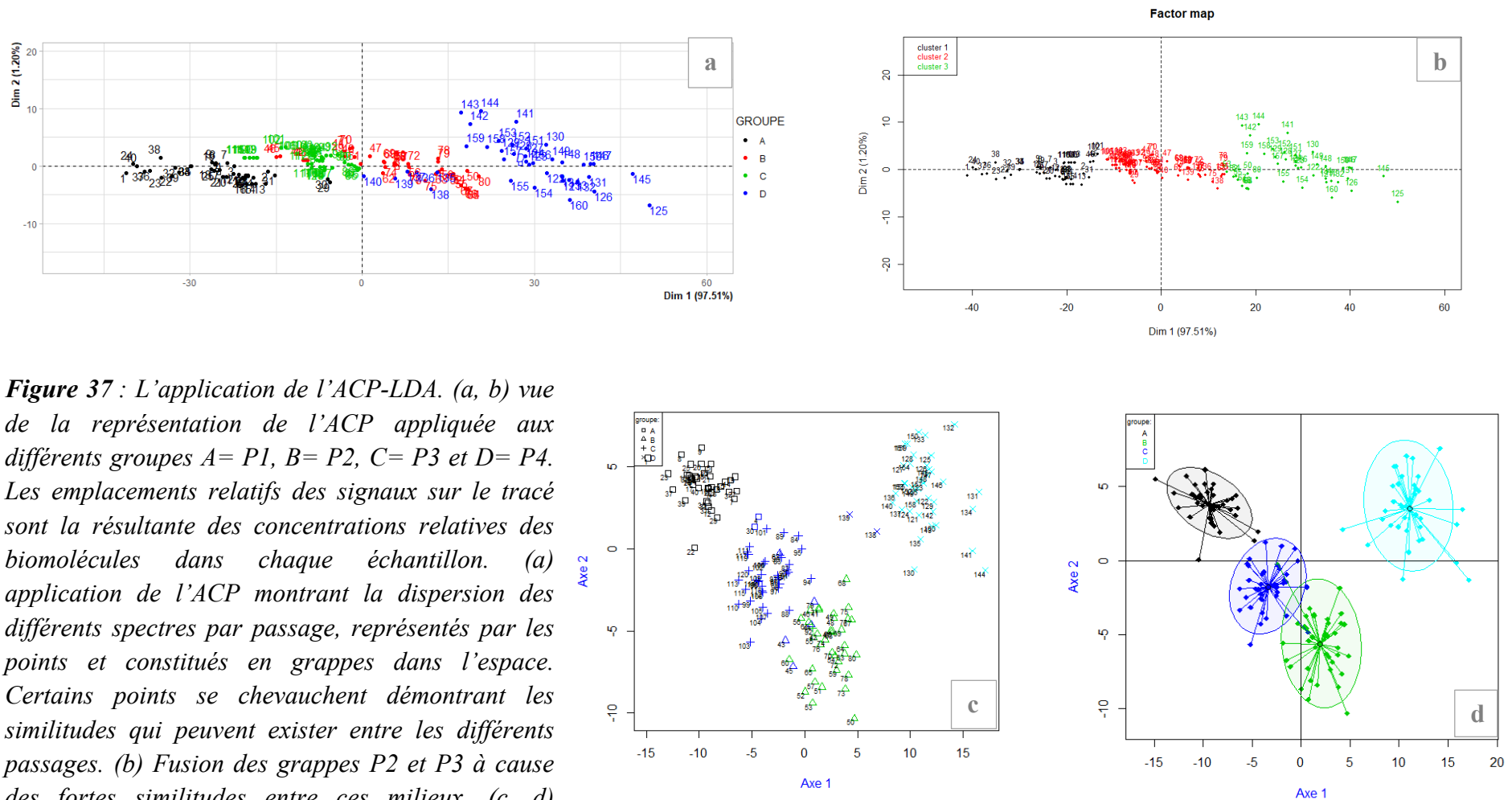
et IIB et de l'aggrécane (ACAN) qui sont régulées négativement, contrairement à celle du collagène de type I (Col A1) qui est régulée positivement (Figure 36.d).

**Tableau IX : Table des assignations des pics et ou bandes Raman caractéristiques**

<i>Pics ou bandes Raman (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Assignations</i>
756	Tryptophane ou Aggrécane à partir de cartilage articulaire bovin
788	C <sub>5</sub> '-O-P-O-C <sub>3</sub> ' phosphodiester bands in DNA
854	Vibrations des chaînes latérales des acides aminés de la proline et de l'hydroxyproline, ainsi qu'une vibration (C-C) du squelette du collagène
945	Squelette extensible C-C Proline, hydroxyproline, squelette v (C-C) du squelette de collagène
1004	Phénylalanine
1063	C-C skeletal stretch random conformation / vs(S=O) (GAG)
1094	Phosphodioxy (PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) groups
1130	Étirement C-O (glucides) ou squelette v (C-C) du squelette acyle dans les lipides (transconformation)
1250	Amide III (of collagen II)
1452	Bandes de déformation C-H (groupes fonctionnels CH dans les lipides, chaînes latérales d'acides aminés des protéines et glucides)
1664	Amide I (collagen I assignment)



**Figure 36** : Caractérisation des principaux marqueurs du cartilage articulaire. **(a, b, c)** Caractérisation du rapport d'intensité de certaines bandes Raman choisies en raison de leurs spécificités moléculaires et leur capacité à fournir des informations biochimiques indispensables sur les changements conformationnels lors de la dédifférenciation des chondrocytes. Variations significatives entre les différents échantillons. De façon particulière, les bandes localisées à  $1063\text{ cm}^{-1}$  (attribution des GAG) et  $1255\text{ cm}^{-1}$  (attribution du collagène de type II) présentent une intensité de signal Raman qui diminue progressivement pour les GAGs et le collagène de type II au fil des différents passages (P1, P2, P3 et P4), contrairement à celle de la bande à  $1659\text{ cm}^{-1}$  (attribution du collagène de type I,) qui augmente plutôt avec les passages. **(d)** L'expression génique par qPCR des principaux gènes impliqués dans la chondrogenèse, notamment le collagène de type IIA et IIB, l'aggrécane (ACAN) et le collagène de type I (Col IA) et SOX9. Le test génique présente une régulation à la baisse des gènes du col IIA et IIB, ainsi que de l'ACAN, tandis les gènes du col IA et de SOX sont régulés à la hausse. Valeur de significativité a été déterminée pour  $p < 0,0$

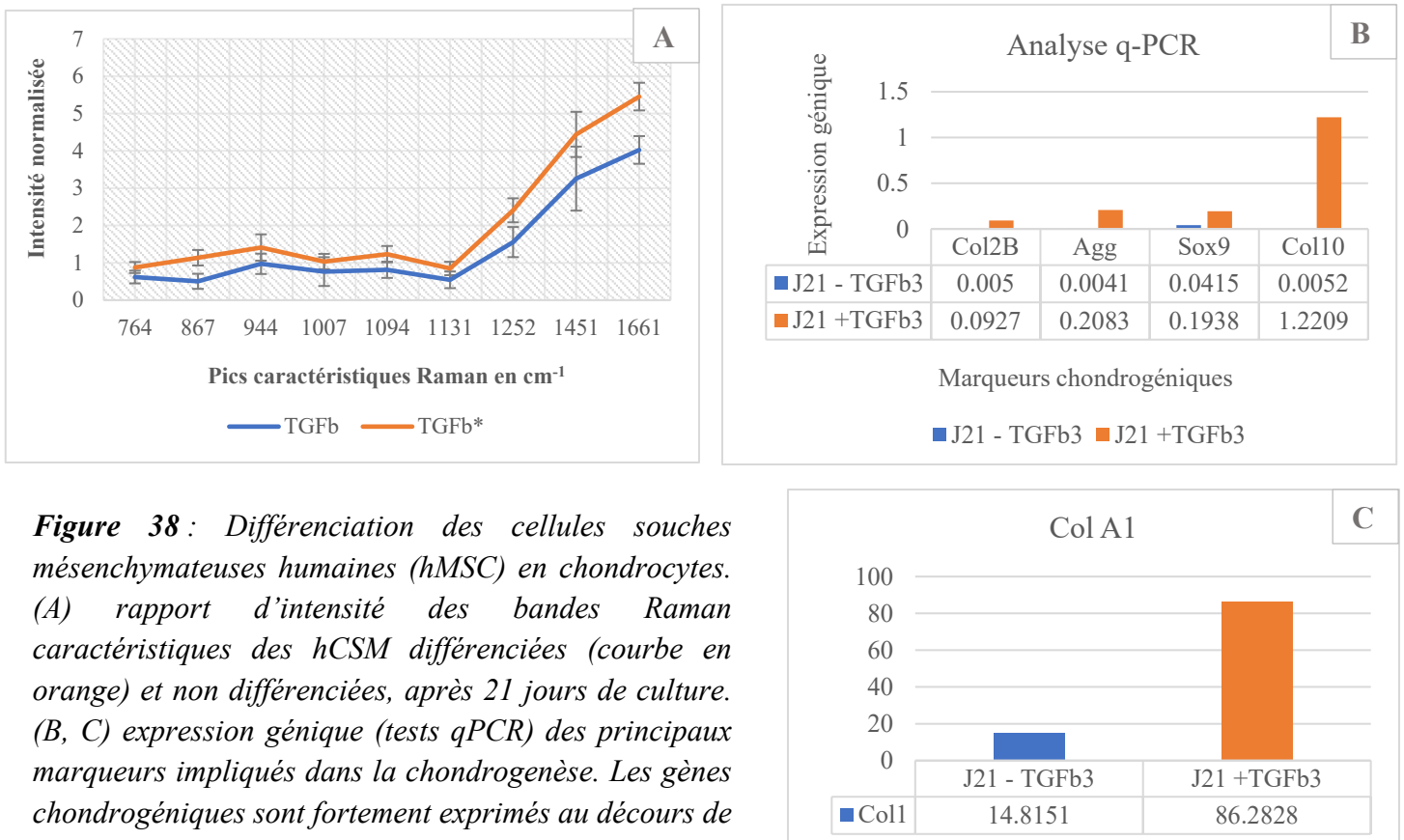


**Figure 37 :** L'application de l'ACP-LDA. (a, b) vue de la représentation de l'ACP appliquée aux différents groupes A= P1, B= P2, C= P3 et D= P4. Les emplacements relatifs des signaux sur le tracé sont la résultante des concentrations relatives des biomolécules dans chaque échantillon. (a) application de l'ACP montrant la dispersion des différents spectres par passage, représentés par les points et constitués en grappes dans l'espace. Certains points se chevauchent démontrant les similitudes qui peuvent exister entre les différents passages. (b) Fusion des grappes P2 et P3 à cause des fortes similitudes entre ces milieux. (c, d) Application de la LDA par détermination des biens classés.



### 3.2.4.3 Suivi de la maturation du cartilage artificiel (différenciation des hCSM)

Sur les différents milieux de cultures, plusieurs spectres Raman (50 spectres au total) ont été collectés à différents endroits et sur différentes cellules. Des comparaisons entre les deux milieux ont été possible en calculant le rapport d'intensité de signal Raman dans les spectres afin de pouvoir les différencier. Le profil spectral des hCSMs supplémentées avec le TGF- $\beta$ 3 présente une intensité de signal Raman plus élevée par rapport aux hCSMs sans induction de TGF- $\beta$ 3. Les intensités calculés des bandes Raman choisies montrent clairement des différences significatives entre les deux milieux (*Figure 38.A*). Ce qui a permis de déduire que les hCSMs supplémentées avec le TGF- $\beta$ 3 sont largement différenciées par rapport au groupe contrôle sans TGF- $\beta$ 3. Les tests de quantification q-PCR des gènes impliqués dans la chondrogenèse ont abouti au même résultat (*Figure 38.B et C*).

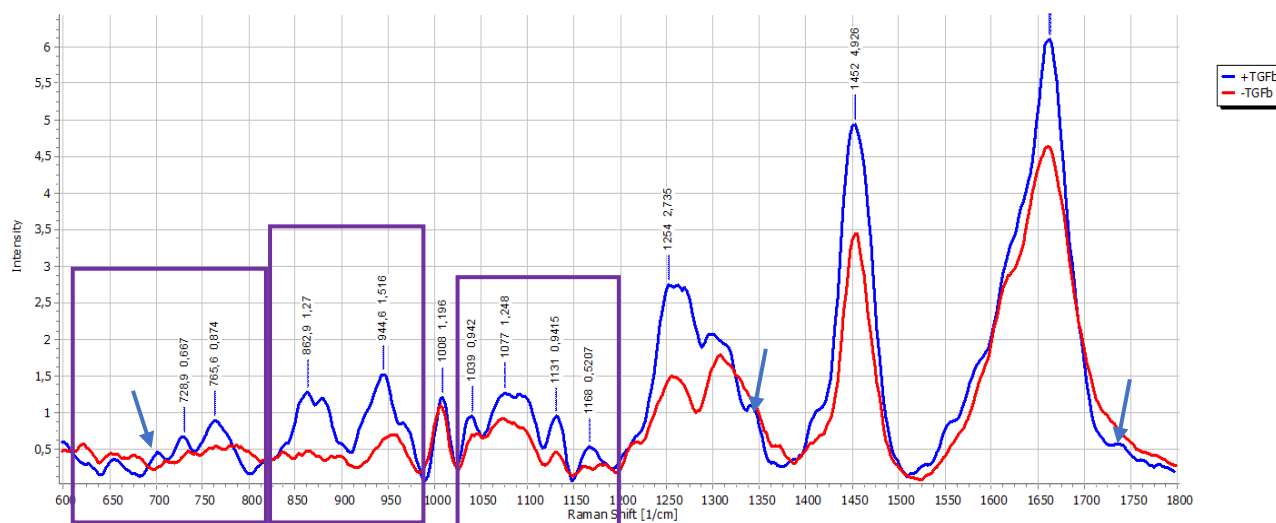


**Figure 38 :** Différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) en chondrocytes. (A) rapport d'intensité des bandes Raman caractéristiques des hCSM différenciées (courbe en orange) et non différenciées, après 21 jours de culture. (B, C) expression génique (tests qPCR) des principaux marqueurs impliqués dans la chondrogenèse. Les gènes chondrogéniques sont fortement exprimés au décours de 21 jours de culture dans les hCSM supplémentées avec du TGF- $\beta$ 3, contrairement aux hCSM sans TGF- $\beta$ 3.

### 3.2.4.4 Caractérisation des principaux marqueurs ou des pics Raman de différenciation

Les spectres moyens des hCSMs supplémentées avec ou non du TGF- $\beta$ 3 sont présentés sur la figure 39. A première vue, les différences entre les spectres moyens des deux échantillons sont clairement observables et, caractérisées par un rapport d'intensité de signal plus élevé dans le spectre des hCSMs supplémentées avec le TGF- $\beta$ 3 (spectre bleu). Ces différences peuvent être observées, en particulier au niveau des bandes à 762  $\text{cm}^{-1}$  (*Pyrimidine ring breathing mode*), 862  $\text{cm}^{-1}$  (*Phosphate group : Hydroxyproline (collagen I)*), 943  $\text{cm}^{-1}$  (*v(C-C) (protein backbone)*), 1040  $\text{cm}^{-1}$  (*Phenylalanine of collagen*), 1078  $\text{cm}^{-1}$  (*v(C-C) or v(C-O), GAG*), 1094  $\text{cm}^{-1}$  (*Symmetric PO<sub>2</sub><sup>-</sup> stretching vibration of the DNA backbone*), 1131  $\text{cm}^{-1}$  (*v(C-C), v(C-N), empreinte digitale des GAG*), 1168  $\text{cm}^{-1}$  (*v(C-C)*), 1254  $\text{cm}^{-1}$  (*amide III, v(C-N) and  $\delta(N-H)$ , collagène II*), 1452  $\text{cm}^{-1}$  (*C-H deformation bands of proteins and lipids*) et 1661  $\text{cm}^{-1}$  (*amide I, v(C=C), collagène I*).

D'autres différences, dont les bandes sont moins résolues, peuvent être identifiées au niveau des bandes à 702  $\text{cm}^{-1}$  (*v(C-S) trans (aminoacid methionine)*), 729  $\text{cm}^{-1}$  (*v(C-C) stretching*), 1342  $\text{cm}^{-1}$  (*biomolécules cytoplasmiques*) et 1736  $\text{cm}^{-1}$  (*C=O stretching (lipids)*). Ces changements dans les spectres Raman suggèrent la formation de matrice cartilagineuse et une accumulation de biomolécules dans les milieux supplémentés avec le TGF- $\beta$ 3.



**Figure 39 :** Spectres moyens des différents des hCSM différenciées (en bleu) et non différenciées (en rouge) sans ou avec du TGF- $\beta$ 3.

### 3.2.5 Discussion

L'introduction de l'ingénierie tissulaire dans le domaine biomédical suscite beaucoup d'espoir pour le développement de tissus cartilagineux fonctionnels pour la réparation du cartilage articulaire lésé. Les approches intègrent l'implantation de chondrocytes autologues (ICA) ou l'emploi de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) pour induire un tissu cartilagineux équivalent biomécaniquement et fonctionnellement. Cependant, les efforts déployés jusque-là peinent encore à satisfaire les attentes des patients.

Dans cette étude, nous avons, à partir de la microscopie confocale Raman, évalué les mécanismes sous-jacents à la production de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire. Ainsi, nous avons évalué simultanément les phénomènes de dédifférenciation des chondrocytes et la différenciation des hCSMs en chondrocyte par la méthode de culture en pastilles pendant 21 jours.

Concernant la dédifférenciation des chondrocytes, les images Raman des cellules réalisées pour chaque passage, donnent d'observer un changement dans la morphologie de celles-ci. Du passage P1 où les cellules semblent plus ou moins rondes et sans flagelles, elles commencent à adopter une forme de plus en plus allongée avec des flagelles (*Figure 28*). Cette observation a été corrélée par la détermination de la circularité (S) des cellules à chaque passage. Il faut rappeler que la circularité permet d'apprécier la morphologie des cellules comprise entre 0 et 1. Plus la valeur calculé est proche de 1, plus la cellule présente une morphologie plus ronde, et inversement, ont une morphologie allongée quand la circularité se rapproche de zéro. Il est intéressant de constater que de P1 à P4, la circularité décroît significativement (*Voir tableau VIII*). Ce qui montre bien un changement significatif dans la morphologie des cellules qui, de la forme plus ou moins ronde ( $S= 0,072$ ), adoptent à une forme plutôt allongée et donc fibroblastique ( $S= 0,032$ ). Nos résultats sont en adéquation avec certaines études qui ont montré que lorsque les chondrocytes sont cultivés en monocouche, ils perdent rapidement leurs caractéristiques morphologiques et synthétiques spécifiques, et se comportent comme des fibroblastes indifférenciés. Schuh et collaborateurs en 2010<sup>343</sup>, dans leur étude sur « Effet de l'élasticité de la matrice sur le maintien du phénotype chondrogénique », avaient montré que l'expansion en monocouche des chondrocytes étaient associée à des modifications dans l'organisation du cytosquelette d'actine F en formant des fibres de stress bien définies et exhibant plus de phénotype fibroblastique. En général, les chondrocytes évoluent dans un environnement tridimensionnel (3D). Pour accroître le nombre de cellules, ils sont isolés du tissu cartilagineux par digestion enzymatique à l'aide de la

collagénase et sont ensuite expansés en culture monocouche pour amplifier le nombre total de cellules. Ces cellules sont secondairement utilisées pour combler les défauts cartilagineux dans la technique d'implantation de chondrocyte autologues (ICA).

Ces différences morphologiques ont été, par ailleurs, mises en évidence par la réalisation de l'ACP-LDA qui est une méthode d'analyse multivariée permettant de discriminer différents échantillons en fonction des différences dans leur contenu biochimique et d'identifier les caractéristiques spectrales. La figure 37 présente une représentation par grappes de la distribution spatiale des différents échantillons (P1 à P4). Un fait remarquable, les grappes P2 et P3 semblent totalement fusionnées en raison des fortes similarités spectrales (37.a et b). Ce qui suggère par ailleurs, qu'il n'y aurait presque aucune différence significative entre les cellules du passage 2 au passage P3. Par conséquent, le nombre de passages jusqu'à P2 serait largement convenable pour obtenir une densité cellulaire acceptable. La distribution des signaux spectraux sont le résultat des concentrations relatives des sources de chaque échantillon selon leurs spécificités biochimiques. Chaque spectre est représenté sur le graphique de scores par un point. Les spectres similaires se regroupent dans certaines régions, alors que les spectres très différents sont largement séparés. Ce qui permet de classer les spectres en fonction de leur similarité. De sorte qu'il est plus aisé d'apprécier les différences entre les différents groupes. Il faut préciser que l'ACP est une méthode non supervisée et ne peut donc pas être utilisée à des fins de classification et de prédiction. C'est pourquoi, nous avons utilisé l'analyse discriminante linéaire (LDA) pour apprécier la répartition ou la distribution des données spectrales et modéliser la différence entre les classes de données. L'application de l'ACP-LDA sur l'ensemble des données associées aux différents passages montre bien une séparation entre les différents groupe d'échantillon, quand bien même certains points semblent se chevaucher.

Pour identifier les marqueurs Raman associés à la dédifférenciation des chondrocytes, nous avons collecté plusieurs spectres Raman des cellules à chaque passage. Quel que soit le nombre de passages, les spectres Raman collectés semblaient sensiblement identiques à première vue. Toutefois, en comparant les intensité de signal Raman de certaines bandes, notamment les bandes à  $788\text{ cm}^{-1}$ ,  $853\text{ cm}^{-1}$ ,  $942\text{ cm}^{-1}$ ,  $1004\text{ cm}^{-1}$ ,  $1063\text{ cm}^{-1}$ ,  $1125\text{ cm}^{-1}$ ,  $1255\text{ cm}^{-1}$ ,  $1449\text{ cm}^{-1}$  et  $1659\text{ cm}^{-1}$ , il a été possible de suivre les événements moléculaires liés à la dédifférenciation des chondrocytes. Ces bandes ont été choisies particulièrement pour leurs spécificités moléculaires et pour leur capacité à fournir des informations indispensables sur l'activité cellulaire et les changements conformationnels éventuels au sein des structures des protéines et des lipides. De façon particulière, nous nous sommes focalisés sur les bandes à

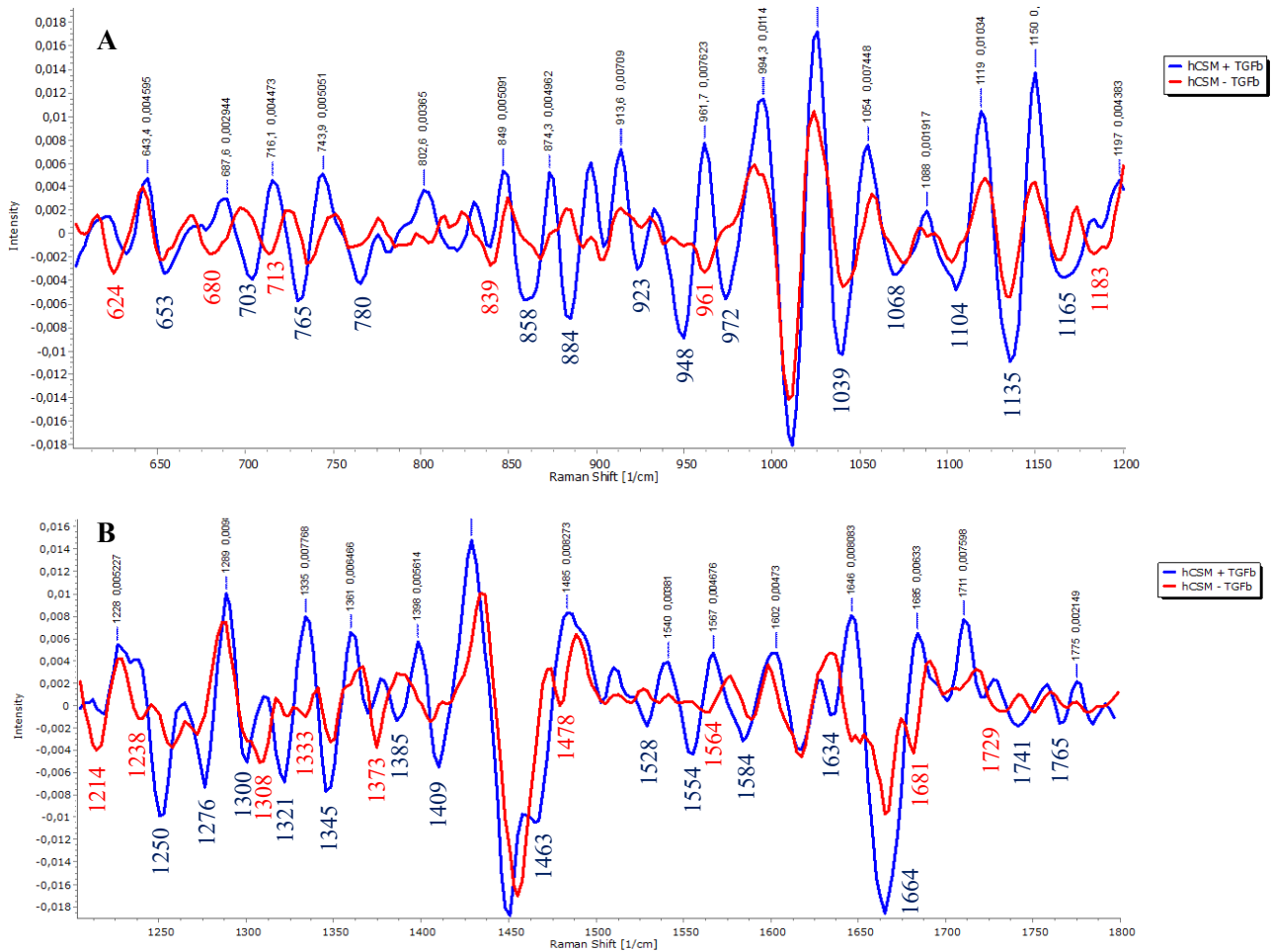
1063 cm<sup>-1</sup>, 1255 cm<sup>-1</sup>, 1449 cm<sup>-1</sup> et 1659 cm<sup>-1</sup>, attribution des GAGs, du collagène de type II, protéines et lipides et du collagène de type I, respectivement. Des analyses statistiques de ces différentes bandes ont montré une diminution significative de la bande des GAGs et du collagène de type II, notamment entre P1 et P3, tandis la bande du collagène de type I augmente significativement. En effet, après une légère augmentation à P2, l'intensité de ces bandes diminue significativement. Cela pourrait expliquer qu'à partir du passage P2, non seulement la densité cellulaire diminue, mais aussi les cellules perdent les principaux marqueurs (collagène de type II et les protéoglycanes) du cartilage hyalin, au profit d'un type fibroblastique riche en collagène de type I. il faut rappeler que les conditions de culture monocouche et le nombre de passages cellulaires prédisposent les chondrocytes à un changement phénotypique qui les amènent à abandonner leurs caractéristiques intrinsèques pour s'adapter aux conditions de culture en adoptant un phénotype fibroblastique<sup>344-346</sup>. Nos résultats ont été comparés à des analyses quantitatives de type qPCR qui ont évalué l'expression des principaux marqueurs chondrogéniques. Les analyses ont montré une expression génique du collagène de type II (dans ses deux isoformes A et B) et de l'aggrécane (ACAN) qui est régulée négativement, contrairement au collagène de type I qui est plutôt régulée positivement. Des études antérieures avaient montré que les chondrocytes en culture monocouche prolongée, au lieu de produire les composants spécifiques du cartilage (collagène de type II et protéoglycanes spécifiques), passent à la fabrication de protéoglycanes non spécifiques et de collagène de type I<sup>129,140</sup>. Ces résultats montrent ainsi la capacité de la microscopie confocale Raman à suivre les modifications moléculaires associées à la dédifférenciation des chondrocytes en culture monocouche.

S'intéressant à la différenciation des hCSMs, il faut rappeler que la capacité de différenciation chondrogénique *in vitro* des CSM est généralement caractérisée par une production accrue de collagènes, notamment de collagène de type II, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes (GAGs) quantifiées à partir des tests immunohistochimiques, tels que ELISA, les colorations au Safranin-O et Alcian Blue<sup>347</sup> ou la quantification de l'expression des gènes principaux impliqués dans la chondrogenèse à l'aide des tests RT-PCR. Dans ce travail, la caractérisation de la différenciation des hCSMs a été analysée à partir de la microscopie confocale Raman, sans marqueurs. En général, les CSM sont granulées dans des tubes coniques et maintenues dans un milieu chondrogénique pendant 21 jours. Les pellets obtenus ont été fixés sur les lames CaF<sub>2</sub> avec du Cell-Tak® et plusieurs mesures Raman ont été réalisées. Les caractéristiques Raman des deux échantillons (hCSM + TGF-β3 et hCSM sans TGF-β3) sont

présentées sur la figure 39. Les différences entre les deux échantillons sont caractérisées les bandes Raman à  $762\text{ cm}^{-1}$  (*Pyrimidine ring breathing mode*),  $862\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}-\text{C})$ , *Hydroxy/Pro, Tyr*),  $943\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}-\text{C})$ , *Pro*),  $1040\text{ cm}^{-1}$  (*Phenylalanine of collagen*),  $1078\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}-\text{C})$  or  $\nu(\text{C}-\text{O})$ ),  $1094\text{ cm}^{-1}$  (*Symmetric PO<sub>2</sub><sup>-</sup> stretching vibration of the DNA backbone*),  $1131\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}-\text{C})$ ,  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , *GAG*),  $1168\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}-\text{C})$ ),  $1254\text{ cm}^{-1}$  (*amide III,  $\nu(\text{C}-\text{N})$  and  $\delta(\text{N}-\text{H})$ , collagène II*),  $1452\text{ cm}^{-1}$  (*C-H deformation bands of proteins and lipids*) et  $1661\text{ cm}^{-1}$  (*amide I,  $\nu(\text{C}=\text{C})$ , collagène I*). Ces différences sont marquées par de fortes concentrations en protéines des hCSMs supplémentées avec le TGF- $\beta$ 3, contrairement aux hCSM sans induction TGF- $\beta$ 3. Ce montre que les hCSMs supplémentées avec le TGF- $\beta$ 3 sont fortement différenciées, contrairement aux hCSM sans TGF- $\beta$ 3 au terme des 21 jours de culture.

Par ailleurs, en appliquant la dérivée seconde aux spectres moyens, nous avons pu identifier certaines différences subtiles et caractériser les changements conformationnels entre les hCSMs différenciées et non différenciées. La dérivée seconde est une technique d'analyse des spectres Raman permettant une identification plus spécifique des pics d'absorption petits et voisins qui ne sont pas résolus dans le spectre initial. Cette méthode d'analyse offre donc un moyen d'augmenter la spécificité des pics d'absorption de certaines molécules dans l'échantillon. De sorte qu'elle soit capable de fournir des informations qualitatives à l'analyse sur l'identification de l'échantillon. Les caractéristiques spectrales transformées des hCSMs différenciées et non différenciées sont résumées sur la figure 40 (A) et (B) et les attributions dans le tableau X. Outre les bandes Raman caractéristiques identifiées dans le spectre initial, bien qu'elles soient légèrement décalées après l'application de la dérivée seconde, d'autres bandes peuvent être identifiées. Il s'agit pour le spectre des hCSMs différenciées, notamment des bandes localisées à  $653\text{ cm}^{-1}$  (Tyr),  $780\text{ cm}^{-1}$  (U,C,T),  $820\text{ cm}^{-1}$  (C-C),  $923\text{ cm}^{-1}$  (C-C),  $973\text{ cm}^{-1}$  (C-C),  $1068\text{ cm}^{-1}$  (OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>),  $1275\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -hélice, amide III),  $1300\text{ cm}^{-1}$  (lipides),  $1321\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -hélice, amide III),  $1345\text{ cm}^{-1}$  (A,G, biomolécules cytoplasmiques),  $1385\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub>),  $1409\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ , GAG),  $1465\text{ cm}^{-1}$  (C-H),  $1528\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{C}=\text{C}-$ ),  $1554\text{ cm}^{-1}$  (Trp),  $1584\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(\text{C}=\text{C})$ , Phe),  $1634\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(\text{H}_2\text{O})$ , Amide I) et  $1741\text{ cm}^{-1}$  (C=O). Ces différences observées dans le spectre des hCSMs différenciées sont plus marquées par des vibrations protéiques et glucidiques. Les changements conformationnels essentiels intéressent plus les structures de la protéine secondaire dans la région amide I ( $1585\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ) et III ( $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ). D'autres peuvent être observés avec les modes de vibrations des cycles aromatiques du tryptophane (Trp), la tyrosine (Tyr), la proline (Pro) et la phenylalanine (Phe) qui sont de grands diffuseurs Raman <sup>348</sup>. Tous ces changements conformationnels dans le spectre des hCSMs

supplémentées avec le TGF- $\beta$ 3, sont le signe d'une concentration importante en collagènes et en protéoglycanes.



**Figure 40 :** Caractéristiques de la dérivée seconde des spectres moyens. (A) dérivée seconde dans la région de longueur d'onde de 600 – 1200  $cm^{-1}$  ; (B) dérivée seconde dans la région de longueur d'onde de 1200 – 1800  $cm^{-1}$

Contrairement aux hCSMs supplémentées avec le TGF- $\beta$ 3, les hCSMs non supplémentées présentent une structure plus riche en phosphate et en lipides, caractérisée notamment par la présence de la bande à 961  $cm^{-1}$  ( $\nu_1 PO_4^{3-}$ , attribution de phosphate de l'hydroxyapatite (HA) plus abondant dans la MEC de l'os). Cette bande a été, par ailleurs, assimilée à la vibration d'étirement calcium-phosphate, signe d'une quantité importante de cholestérol dans le milieu. Autrement, le milieu non supplémenté avec le TGF- $\beta$ 3 tend à développer une structure hypertrophique, processus similaire observé dans la minéralisation de

l'os. Il est connu que les milieux supplémentés avec le TGF $\beta$  induisent la prolifération et la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses, conduisant à la fois à une régulation à la baisse des gènes du collagène de type I, puis à une régulation à la hausse des gènes du collagène de type II et de l'aggrécane <sup>163</sup>. En effet, les ligands du TGF $\beta$  inhibent la maturation des chondrocytes hypertrophiques et stabilisent le phénotype pré-hypertrophique des chondrocytes <sup>165</sup>. C'est d'ailleurs pour cela que certains conseillent de retirer le TGF $\beta$  du milieu lorsqu'on veut différencier les cellules souches mésenchymateuses humaines en chondrocytes hypertrophiques. Ces résultats traduisent ainsi l'intérêt de ces morphogènes dans l'ingénierie du tissu cartilagineux, car ils interagissent les uns avec les autres pour contrôler de nombreux aspects de la biologie cellulaire, notamment la prolifération, la différenciation, la sécrétion de la MEC et l'apoptose des cellules.



**Tableau X : Modes vibratoires et assignations des bandes Raman des spectres moyens transformés des hCSM supplémentées avec le TGFβ3 et les hCSM sans TGFβ3**

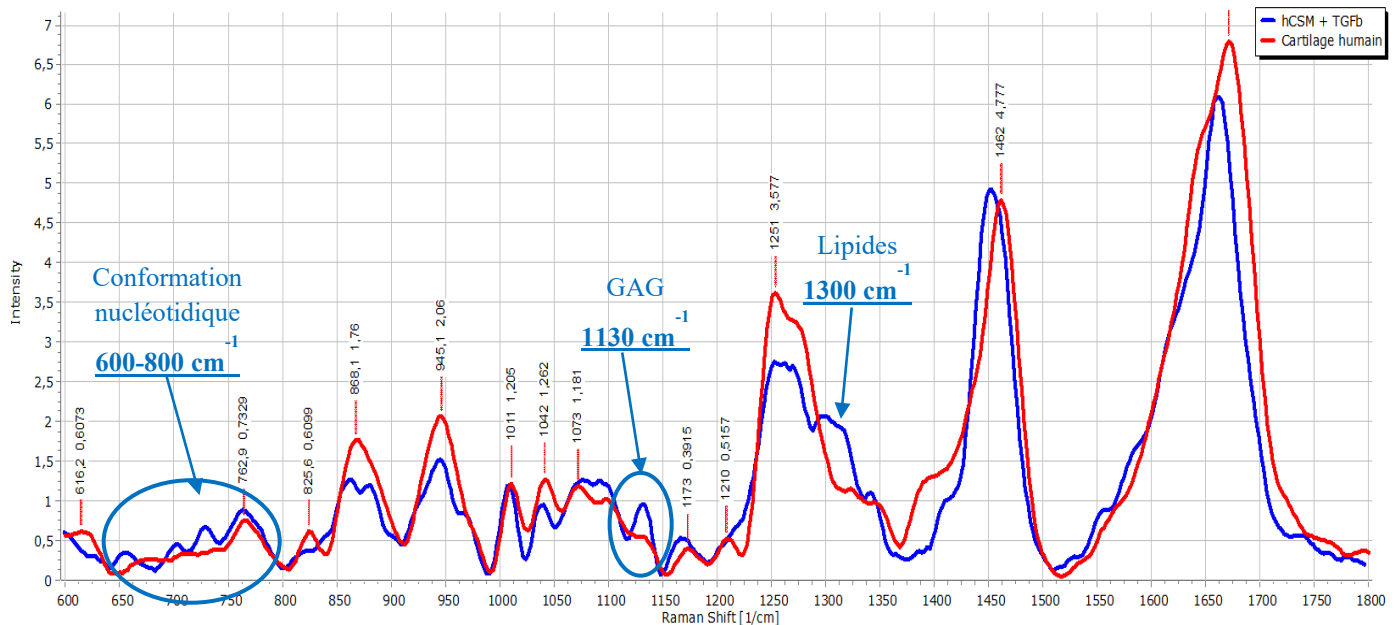
hCSM supplémentées avec TGF-β3

hCSM sans TGF-β3

Raman shift [1/cm]	Assignations	Raman shift [1/cm]	Assignations
653	C-C twisting mode of tyrosine	624	C-C twist Phe
782	U, T, C (ring breathing modes in the DNA/RNA bases)	680	Ring breathing modes in the DNA bases
820	C-C stretch of proline and hydroxyproline	713	C N (membranes phospholipids head)/adenine
923	C-C, proline ring (collagen assignment)	804	Uracil-based ring breathing mode
973	C-C backbone (collagen assignment)	839	Deformative vibrations od amine groups
1068	Stretching C-O ribose	898	Monosaccharides (β-glucose), (C-O-C) skeletal mode
1275	Amide III (α-helix)	961	Symmetric stretching vibration of $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (phosphate of HA)
1300	$\delta(\text{CH}_2)$	1185	Anti-symmetric phosphate vibrations
1321	Amide III (α-helix)	1214	Stretching of C-N
1345	CH deformation (proteins and carbohydrates, biomolecules cytoplasmic)	1235	Amide III
1385	CH <sub>3</sub> band	1308	C-N asymmetric stretching in asymmetric aromatic amines
1409	vs COO- (IgG)	1333	Guanine
1465	Lipids	1376	T, A, G (ring breathing modes of the DNA/RNA bases)
1528	In-plane vibrations of the conjugated – C=C-	1478	C=N stretching
1554	Tryptophan	1564	COO-
1584	C=C bending mode of phenylalanine	1681	Amide I (Disordered structure; non hydrogen bonded)
1634	$\delta(\text{H}_2\text{O}, \text{Amide III})$	1729	Ester group
1741	Ester group		

En comparant le spectre Raman moyen des hCSMs différenciées à celui d'un cartilage natif humain, il est intéressant de constater que ces deux échantillons présentent sensiblement le même motif spectral (Figure 41). Les différences majeures sont caractérisées par les bandes à 654, 702, 728, 1128, 1300  $\text{cm}^{-1}$ , et 618, 825, 1210  $\text{cm}^{-1}$ , pour les hCSM différenciées et le cartilage articulaire natif, respectivement. Les assignations de ces bandes sont résumées dans le tableau XI. Cela qui démontre que les 21 jours de cultures sont largement suffisants pour

obtenir un tissu de construction génique qui soit comparable au cartilage natif. La grosse différence entre les deux échantillons est marquée par une structure des hCSM plus riche en plus riche en lipides et en cholestérol (présence des bandes à 702 et 1300  $\text{cm}^{-1}$ ) avec une activité nucléotidique (600 à 900  $\text{cm}^{-1}$ ) qui semble importante également par rapport au cartilage natif.



**Figure 41** : Spectres moyens comparatifs entre les hCSM différenciées (en bleu) et le cartilage articulaire natif (en rouge)

**Tableau XI** : Assignations et caractérisation biochimique des bandes Raman de différenciation entre les hCSM différenciées et le cartilage natif

Bandes Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modes vibratoires ou Assignment	Caractéristiques biochimiques
618	$\nu(\text{C-C})$	Protéine (Phe)
654	$\nu(\text{C-C})$	Tyrosine
702	$\nu(\text{C-S})$	Cholesterol, Cholesterol ester
728	$\nu(\text{C-C})$	Proline (collagen assignment)
825	$\nu_1(\text{OPO})$	DNA (Proline, hydroxyproline, Tyr)
1128	$\nu(\text{C-C})$	Lipides
1210	C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> stretching mode	Tyr and Phe
1300	$\delta(\text{CH}_2)$	Lipides, acides gras

### 3.2.6 Conclusion partielle 2

L'introduction de l'ingénierie tissulaire dans le domaine biomédical suscite beaucoup d'espoir pour le développement de tissus cartilagineux fonctionnels pour la réparation du cartilage articulaire lésé. Les approches intègrent l'implantation de chondrocytes autologues (ICA) ou l'emploi de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) pour induire un tissu cartilagineux équivalent biomécaniquement et fonctionnellement. Cependant, les efforts déployés jusque-là peinent encore à satisfaire les attentes des patients.

La surveillance de la croissance des tissus en culture cellulaire reste un défi majeur, malgré les techniques analytiques actuelles qui permettent de sonder de nombreux facteurs tels que l'expression de l'ARN, l'expression des protéines intracellulaires/extracellulaire et les composants exogènes. L'évaluation des processus de dédifférenciation des chondrocytes et de différenciation des hCSM différenciées, a montré la capacité de la microscopie confocale Raman (MCR) à suivre en réel les changements biochimiques intracellulaires et extracellulaires. A partir des données spectrales, il a été possible de caractériser les différents échantillons et d'identifier de façon qualitative et quantitative les marqueurs Raman spécifiques. Lors du suivi de la dédifférenciation des chondrocytes, le passage P2 peut être considéré comme suffisant pour obtenir une densité cellulaire qui soit nécessaire à la redifférenciation des cellules. Par conséquent, au-delà des bandes Raman à 1063, 1255 et 1665  $\text{cm}^{-1}$ , qui permettent de suivre les changements dans la composition des GAG, du collagène de type II et du collagène de type I, principalement, la bande Raman à 1449  $\text{cm}^{-1}$  peut être un bon indicateur pour suivre la densité cellulaire au cours de la dédifférenciation. Aussi, la MCR s'est-elle montrée efficace pour suivre la maturation du cartilage artificiel à base de cellules souches mésenchymateuses humains supplémentées avec le TGF $\beta$ 3 et identifiées les marqueurs Raman associés. Ces différentes bandes Raman identifiées pourraient servir d'indicateurs pour la surveillance des hCSMs différenciées versus les hCSM non différenciées.

En somme, contrairement aux méthodes conventionnelles, telles que l'histologie et l'immunohistochimie, qui ne fournissent que des informations sur la présence de composés spécifiques, la spectroscopie Raman crée une «empreinte digitale» représentant l'ensemble de la composition moléculaire de l'échantillon étudié, sans a priori et sans marquage.

### **3.3 Caractérisation de cartilage articulaire arthrosique humain**

### 3.3.1 Introduction

Définir plus simplement, le corps humain est composé principalement d'eau, de protéines, d'acide nucléique, de lipides et de glucides. Par conséquent, tout changement dans l'organisme à la suite des maladies, entraînerait des modifications biochimiques de l'un ou l'ensemble de ces composants. Par ailleurs, si les spectres vibratoires sont sensibles à la structure de ces composants, ils doivent donc évoluer avec l'état malade. Selon l'OARSI (Association Internationale pour l'étude de l'arthrose), l'arthrose est une maladie grave défini comme un trouble impliquant des articulations mobiles, caractérisé par un stress adhésif et la dégradation de la matrice extracellulaire, résultant de macro, et de microdommages qui activent des réponses restauratrices adaptatives anormales, y compris les voies pro-inflammatoires du système immunitaire <sup>5</sup>.

Longtemps, le diagnostic de l'arthrose s'est fait sur la base des scores de Kellgren-Lawrence (0 à 4 échelles), méthode universellement reconnue et basée sur une classification radiographique de l'arthrose articulaire <sup>349</sup>. L'inconvénient est que cette technique n'est valable et réalisable que dans les stades avancés d'arthrose. Récemment, les techniques de spectroscopies Raman ont été montrées capables non seulement pour fournir de façon non invasive et non destructive l'information structurelle dans le cartilage endommagé, mais aussi de permettre une résolution spatiale au niveau biomoléculaire qui puisse être utile dans des analyses structurelles détaillées des maladies cartilagineuses. En effet, ces techniques peuvent identifier les groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présents dans les tissus biologiques et / ou les cellules. De ce fait, il est possible non seulement d'évaluer la structure des protéines, des lipides, des glucides et des acides nucléiques présents dans une molécule biologique, mais également les modifications de leur structure chimique dues au processus pathologique, permettant ainsi de surveiller la progression du processus pathologique et de prédire la voie chimique de la progression.

Dans de récentes études, l'utilisation de la spectroscopie Raman a permis d'identifier certains marqueurs impliqués dans la dégradation du collagène de type II et des protéoglycanes (notamment l'aggrécane) dans l'avènement de l'arthrose <sup>350-352</sup>. La spectroscopie vibrationnelle apparaît ainsi comme un outil analytique éprouvé pour comprendre les changements chimiques associés aux conditions pathologiques dans les tissus.

L'intérêt de notre étude était de caractériser le cartilage articulaire humain dégradé et d'identifier de façon précoce les modifications cellulaires précurseurs au changement phénotypique de la matrice dans arthrose.

### 3.3.2 Matériel et méthodes

#### 3.3.2.1 Préparation des échantillons

Nos échantillons étaient constitués des explants de cartilage articulaires prélevés sur le genou d'un patient. Les biopsies ont été réalisées sur le même genou aussi bien sur le site de cartilage dégradé et à distance de site de la lésion pour le tissu contrôle. Les tissus humains ont été obtenus à des fins de recherche avec le consentement du donneur. L'étude a également été approuvée pour la récupération d'échantillons OA par le Ministère de la Recherche et de l'Innovation et le Comité d'Éthique de la Protection des Données Personnelles (CPP) du Languedoc-Roussillon (agrément DC-2010-1185). Les tissus sains ont été récupérés après approbation par l'Agence de la Biomédecine (N ° d'autorisation: PFS16-006) pour les sujets post mortem ou pour les patients amputés (C17-53). Les échantillons de cartilage ont été prélevés chez le même patient.

##### 3.3.2.1.1 Préparation des coupes histologiques

La préparation des échantillons s'est faite suivant une technique développée par Kawamoto en 1990 qui a été modifiée dans le cadre de notre étude. Tous les échantillons ont d'abord été congelés dans de l'hexane refroidissant à  $-94^{\circ}\text{C}$ . L'échantillon congelé a été placé dans un récipient en acier inoxydable suivant le plan des coupes et recouvert d'un gel de carboxyméthylcellulose (CMC) à 5%. L'ensemble (récipient + échantillon + gel) est plongé dans l'hexane refroidissant tout en préservant la surface de toute immersion dans le réfrigérant pour éviter les fissures pendant la congélation jusqu'à formation d'un bloc. Les blocs obtenus ont été placés dans une boîte et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour des coupes histologiques. Toutes les coupes ont été réalisées au cryostat Leica 3050 dans une chambre cryogénique à  $-20^{\circ}\text{C}$  à l'Institut de Neurosciences de Montpellier (INM). Plusieurs coupes d'une épaisseur de 40 à  $60\mu\text{m}$  ont été réalisées avec une lame coupante de carbure de tungstène montée et ayant un angle de jeu de  $5^{\circ}$ . L'échantillon a été coupé à une vitesse n'excédant pas  $4\text{mm/s}$ . La section a été ensuite étalée sur des lames de verre (dimension  $25\times 75\times 1.0\text{ mm}$ , Menzel-Glaser, Superfrost Plus® Gold) pour les analyses immunohistochimiques et des lames  $\text{CaF}_2$  pour les mesures Raman et les analyses au microscope force atomique (AFM).

### 3.3.2.1.2 Techniques de fixation des coupes sur les lames CaF<sub>2</sub>

Pour éviter la mobilité des échantillons sur les lames CaF<sub>2</sub> lors des mesures Raman et AFM, toutes les coupes ont été immobilisées avec du Cell-Tak<sup>®</sup>, un adhésif tissulaire à base de protéines polyphénoliques largement utilisé (Corning Cell-Tak), et connu pour se lier fortement à pratiquement toutes les surfaces inorganiques et organiques dans des environnements aqueux<sup>226</sup>. L'immobilisation a été réalisée en suivant la méthode d'étalement manuelle du fabricant en mélangeant 10 µl de Cell-Tak dans de l'acide acétique à 5% dans un tube Eppendorf<sup>®</sup> à l'aide d'une pointe de micropipette. Le mélange a été étalé sur la lame CaF<sub>2</sub> et laissé à l'air ambiant jusqu'à adsorption de l'acide acétique pendant au moins 30 minutes. Après évaporation de l'acide acétique, le reste du Cell-Tak a été aspiré avec la micropipette, puis la lame a été lavée avec de l'éthanol à 95% et rincée à deux reprises avec de l'eau stérile. Enfin, les coupes hydratées avec du PBS ont été étalées avec soin sur la lame pendant au moins 30 min jusqu'à adhérence complète et l'ensemble a été déposé dans une boîte de pétri et du PBS (quantité raisonnable) a été ajouté pour l'analyse soit au Raman ou à l'AFM.

### 3.3.2.1.3 Préparation et mesures Raman des échantillons

Les coupes réalisées ont été fixées avec du Cell-Tak<sup>®</sup> (une colle adhésive) sur les lames CaF<sub>2</sub>, puis déposées dans une boîte de Pétri contenant du PBS pour les mesures Raman. Durant toute la période des mesures, les échantillons ont été conservés au réfrigérateur à 4°C. Toutes les mesures ont été réalisées à l'aide d'un Microscope confocal Raman Witec  $\alpha$  300R (Witec, Ulm, Allemagne). Le système est équipé d'un laser à double fréquence Nd : YAG (Newport, Evry, France) avec une longueur d'onde de 532 nm et un objectif aérien  $\times$  20 NIKON avec ouverture numérique NA de 0,46 (Nikon, Tokyo, Japon). La puissance laser de sortie était de 50 mW. La résolution spatiale était de 300 nm et la résolution en profondeur d'environ 1 µm. Le microscope est équipé d'un étage de balayage piezodriven avec une précision de positionnement de 2 à 3 nm à l'horizontale et de 10 nm verticalement, respectivement. Le temps d'acquisition d'un seul spectre a été fixé à 0,5 s. 150  $\times$  150 points par image ont été enregistrés, ce qui a donné au total 22 500 spectres pour une image. L'acquisition de données a été réalisée à l'aide du logiciel Image Plus 2.08 de Witec. À l'aide d'un filtre de bord, les rayonnements Raman rétrodiffusés ont été séparés de la lumière dispersée de Rayleigh. Les photons Raman ont été transférés à la caméra EMCCD (DU 970N-BV353, Andor, Hartford, États-Unis). La taille de la puce EMCCD est de 1600  $\times$  200 pixels, le contrôleur de la caméra est un

convertisseur A/D 16 bits fonctionnant à 2,5 MHz, et la caméra est refroidie par un système Pelletier. Le système de spectroscopie UHTS 300 avec une transmission de 70% et un réseau de 600 lignes par mm (fonctionnant à -60° C) offrent une résolution spectrale de 3-5cm<sup>-1</sup>. Ce microscope a été utilisé pour l'analyse des structures du cartilage articulaire.

### 3.3.2.2 Analyse des données spectrales Raman

Tous les spectres collectés ont subi un prétraitement afin d'obtenir des spectres ayant non seulement la même échelle, mais comparables entre eux. L'analyse spectrale a été réalisée dans la plage des empreintes digitales (600-1800 cm<sup>-1</sup>) en raison de sa spécificité moléculaire plus élevée. Avant l'analyse statistique multivariée, les spectres Raman ont été pré-traités au moyen de techniques bien établies. Le processus de prétraitement des spectres a consisté dans un premier temps à la soustraction de la ligne de base suivant la loi polynomiale d'ordre 8. Par la suite, nous avons procédé à l'élimination de l'autofluorescence des tissus et le lissage des spectres en utilisant le filtre « Savitzky Galay », suivant un ordre polynomial = 4 avec un nombre de points (ou intervalle = 13). Afin de comparer les spectres et de permettre des comparaisons cohérentes là où les variations d'intensité peuvent être relatives à l'intensité de chaque spectre, les données ont été normalisées par rapport à l'aire de la région comprise entre 600 et 1800 cm<sup>-1</sup> <sup>242</sup>. Ces étapes de prétraitement des spectres ont été nécessaires avant de les soumettre à des méthodes statistiques. Tous les processus de prétraitement, de normalisation et détermination des différentes intensités des pics ou bande ont été réalisés avec le logiciel Spectragryph<sup>®</sup> version 1.2.12 non commercial développée et offert gracieusement par le Dr Friedrich Menges.

Par ailleurs, des analyses multivariées telles que l'analyse de la composante principale (ACP) a été appliquée à l'ensemble des données brutes collectées sur les différents échantillons. L'ACP est une méthode d'analyse de données multivariée bien établie qui convient parfaitement pour distinguer les petites variations spectrales récurrentes des grands ensembles de données contenant des variations non corrélées. Il s'agit d'une méthode d'analyse totalement non supervisée pour établir si les spectres des échantillons sont ou non regroupés en classes selon le type d'échantillons entre autres facteurs. Cette méthode permet de réduire considérablement la taille de l'ensemble des données en un nombre défini de composantes principales (CP), car tous les spectres sont exprimés en temps de quelques fonctions de base (généralement < 10) et un « vecteur de score » d'environ  $p$  entrées <sup>353</sup>. Des spectres similaires présentent des scores similaires peuvent être utilisés pour discriminer ou regrouper les spectres. Ainsi, si l'on observe



un regroupement, il y a des variations quantifiables et significatives dans les spectres, qui peuvent être utilisées pour construire des algorithmes discriminantes pour distinguer les différents échantillons. L'ACP décrit les grands changements globaux de la composition sans aucune connaissance préalable.

### 3.3.3 Analyse statistique

Compte tenu du fait que la distribution de nos données ne suivait pas une loi normale, toutes nos analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test non paramétrique, notamment le test statistique Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks pour  $p < 0,001$  pour la significativité de nos résultats. Pour les comparaisons entre les différentes zones, le test statistique de Student-Newman-Keuls pour  $p\text{-value} < 0,05$  a été appliqué. Toutes nos données ont été traitées avec le logiciel SigmaPlot for Windows version 11.0 Build 11.0.0.77.

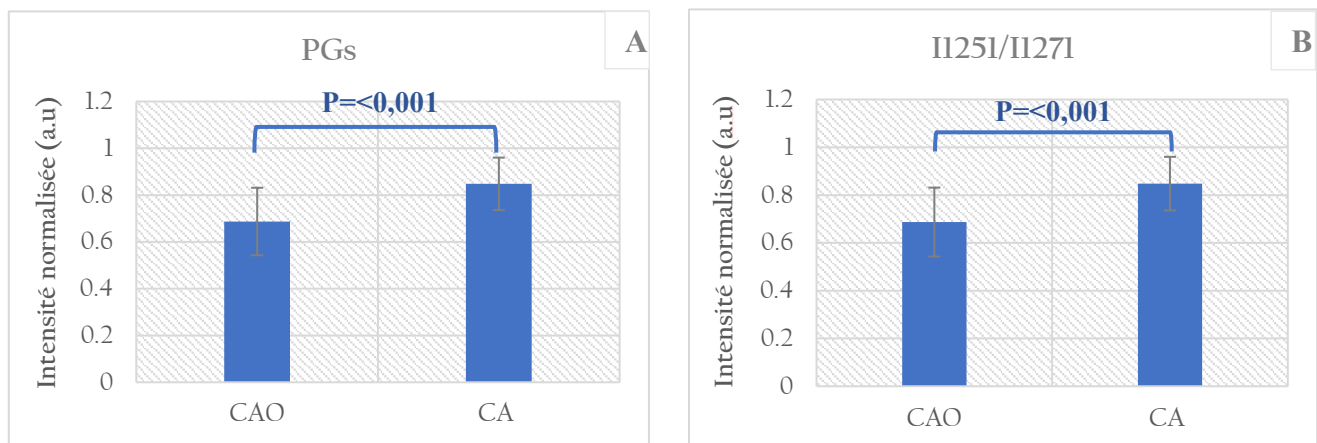
### 3.3.4 Résultats et Discussion

Les changements pathologiques du cartilage commencent à l'échelle moléculaire (au niveau nanométrique) d'où ils se propagent à des niveaux supérieurs de l'architecture hiérarchique du cartilage et causent des dommages structurels et fonctionnels de plus en plus irréversibles. Bien que l'étiologie de l'arthrose soit en grande partie inconnue, son apparition est caractérisée par le déséquilibre entre les processus cataboliques et anaboliques, favorisant la dégradation de la matrice du cartilage. Ce processus de dégradation débute par un épuisement des PG, suivi de la dégradation du collagène de type II. Ce qui entraîne une défaillance mécanique et finalement une érosion complète du cartilage articulaire. Par conséquent, toute méthode permettant de diagnostiquer l'apparition de l'arthrose doit détecter les modifications précoces du gel de PG du cartilage avant que des modifications significatives de sa matrice de collagène ne se produisent <sup>354,355</sup>.

Pour mettre en évidence la dégradation de la matrice du cartilage entre les deux échantillons, plusieurs spectres Raman ont été réalisés (50 spectres pour chaque échantillon). Pour analyser l'état de dégradation du cartilage, nous avons effectué plusieurs mesures Raman sur les différents échantillons ( $n=2$  échantillons de cartilage normal et dégradé). Les spectres ont été collectés à différents endroits du cartilage normal et du cartilage dégradé. Se basant sur certaines données de la littérature, nous avons déterminé la teneur en PGs et en collagène de

type II, deux composants principaux de la matrice, en réalisant respectivement le rapport d'intensité des régions glucidiques ( $985 - 1185 \text{ cm}^{-1}$ ) sur la région amide I ( $1601 - 1776 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>11,253,356</sup> et le rapport de l'intensité entre les pics localisés à  $1251$  et  $1271 \text{ cm}^{-1}$  (dont le pic  $1241 \text{ cm}^{-1} = \text{NH}_2$  bending: random coil Amide III et le pic à  $1269 \text{ cm}^{-1} = \text{NH}_2$  bending: alpha-helix Amide III)<sup>350,352,357</sup>.

Sur la base des rapports d'intensité, nous avons constaté une diminution significative des PGs dans le cartilage dégradé, contrairement au cartilage normal. Cette même observation a été faite en calculant le taux de collagène de type II dans le cartilage dégradé et le cartilage normal ( $p < 0,001$ ). Ces résultats démontrent les différences structurales et biochimiques entre le cartilage normal et le cartilage dégradé.

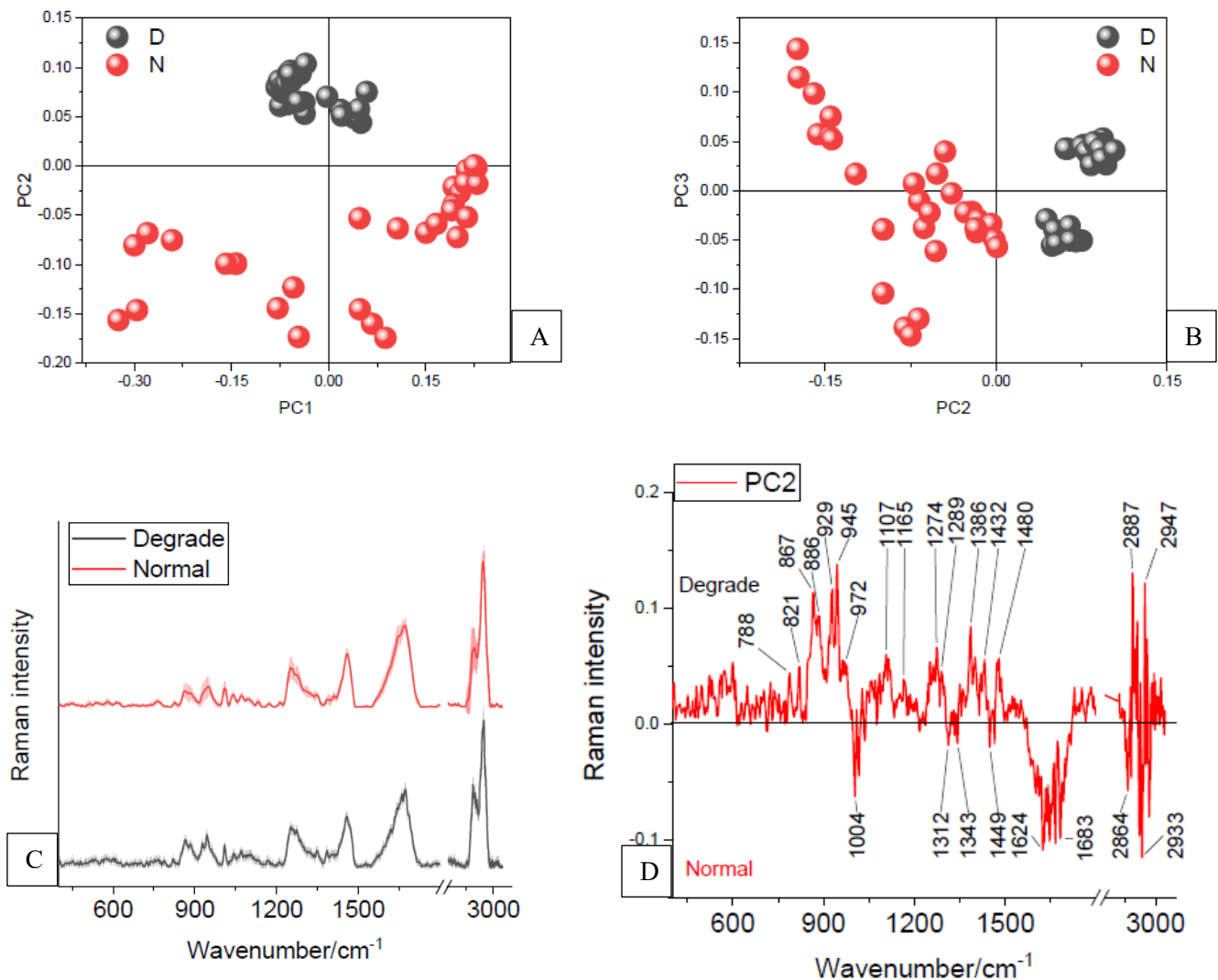


**Figure 42 :** caractérisation du cartilage dégradé : (A) Détermination de la teneur en PGs par le rapport de la surface de la région glucidique [985 – 1185]/la région amide I [1601 - 1760]. L'histogramme présente un rapport d'intensité plus élevé en faveur du cartilage non dégradé (CA). Ce qui traduit une diminution du taux de PGs dans le cartilage dégradé. (B) Rapport d'intensité I1251/I1271 du cartilage dégradé et du cartilage non dégradé (Bonifacio A et al, 2010 ; Yasuhito et al, 2014). La figure 2 présente un rapport d'intensité entre les pics à  $1251/1271 \text{ cm}^{-1}$  plus élevé en faveur du cartilage dégradé, caractérisant une structure désordonnée de la protéine.

Par ailleurs, l'application de l'ACP sur les spectres bruts des différents échantillons a permis de discriminer le cartilage dégradé du cartilage normal et d'identifier les pics Raman expliquant le mieux les changements biochimiques. La distribution des scores dans le plan montre que, contrairement à la composante principale (CP3), la CP2 explique le mieux les valeurs de chargements majeurs impliquées dans la distinction entre les deux échantillons.

L'ACP, au-delà de sa capacité à discriminer différents échantillons, elle peut identifier les groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présents dans les tissus biologiques et / ou les cellules, facilitant ainsi l'évaluation de la structure des protéines, des lipides, des glucides et des acides nucléiques présents dans une molécule biologique, mais aussi les modifications de leur structure chimique dues au processus pathologique. Tout ceci permettra de surveiller la progression du processus pathologique et de prédire la voie chimique de la progression. Les principales bandes Raman de différence ont été identifiées et caractérisées dans le tableau ci-dessous (Tableau XII). Les principales bandes Raman responsables des différences entre le cartilage dégradé et le cartilage normal sont localisées à  $788\text{ cm}^{-1}$  (-O-P-O-),  $821\text{ cm}^{-1}$  (-O-P-O-),  $867\text{ cm}^{-1}$  (ARN),  $886\text{ cm}^{-1}$  (collagen I),  $926\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  (C-C)),  $945\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  (C-C) backbone),  $972\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  (C-C) backbone in ARN),  $1107\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  (C-O)),  $1165\text{ cm}^{-1}$  (Tyrosine (collagen type I)),  $1274\text{ cm}^{-1}$  (Amide III),  $1289\text{ cm}^{-1}$  (-O-P-O-),  $1386\text{ cm}^{-1}$  (GAG),  $1432\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> scissoring),  $1480\text{ cm}^{-1}$  (CH deformation),  $2887\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> stretch) et  $2947\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>, lipids, fatty acids).

Les changements majeurs dans le cartilage dégradé sont caractérisés par des vibrations des paires de bases d'acide nucléique dans la région de longueur d'onde de  $700$  à  $900\text{ cm}^{-1}$  et des structures secondaires des protéines dans la région de longueur d'onde de  $1200$  à  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Différentes bandes Raman correspondant aux vibrations d'étirement du squelette du phosphate OPO des acides nucléiques peuvent être observées, notamment à  $788\text{ cm}^{-1}$  (ADN/ARN),  $821\text{ cm}^{-1}$  (ARN),  $867\text{ cm}^{-1}$  (ARN). Cette région a été par ailleurs caractérisée par comme les vibrations d'étirement C-N et C-C et du groupe phosphodiester (OPO) des groupes de têtes lipidiques<sup>358</sup>. Par exemple, la bande à  $788\text{ cm}^{-1}$  contient à la fois la signature spectrale de chevauchement de l'ADN et de l'ARN, contrairement à la bande à  $821\text{ cm}^{-1}$  qui est spécifiquement attribuée à l'ARN avec une intensité de signal Raman plus élevée, révèle une quantité élevée d'ARN. Cette activité est soutenue par la présence de la bande à ARN à  $867\text{ cm}^{-1}$  associée aux vibrations de ribose, l'un des distincts modes de vibrations des ARN avec les bandes à  $915$  et  $974\text{ cm}^{-1}$  caractérisées par Chan et al (2006)<sup>359</sup>. La présence des bandes Raman à  $921$  et  $972\text{ cm}^{-1}$  en complément des bandes sus-mentionnées, pourrait simplement traduire une grande production d'ARN, autrement une activité transcriptionnelle élevée à l'origine des perturbations des vibrations des cycles aromatiques C-C traduisant un changement phénotypique en faveur d'une production de collagène de type I ( $886$  et  $1165\text{ cm}^{-1}$  voir caractéristiques dans le tableau XII) comme constaté dans le cartilage dégradé.



**Figure 43 :** Analyse des composants principaux (ACP) et discrimination du cartilage dégradé du cartilage normal. (A) Tracé des scores ACP utilisant PC1 et PC2. Seule la composante principale (CP2) sépare les échantillons dégradé/normal ; (B) Graphique des scores ACP utilisant CP2 et CP3; (C) Spectres Raman moyens du cartilage dégradé et du cartilage normal (n=50 spectres); (D) Chargement CP2 des bandes Raman responsables de la séparation des échantillons de cartilage dégradé et normal.

**Tableau XII : Table des assignations des pics Raman majeurs impliqués dans la caractérisation du cartilage articulaire dégradé vs cartilage normal**

Cartilage dégradé		Cartilage sain	
Raman shift [1/cm]	Assignations et molécules associées	Raman shift [1/cm]	Assignations et molécules associées
788	$\nu_s(-O-P-O-)$ (DNA)	1004	Phe of collagen
821	$\nu_s(-O-P-O-)$ (RNA)	1312	Amide III band (proteins)
867	$\nu$ (Ribose), one of the distinct RNA modes (with 915 and 974 $\text{cm}^{-1}$ )	1343	Cytoplasmic biomolecules
886	$\nu$ (C-C) (Proteins, collagen I)	1449	C-H vibration (proteins/lipids)
926	$\nu$ (C-C) (Proteins, collagen)	1624	Tryptophan
945	$\nu$ (C-C) backbone (protein)	1683	$\nu$ (C=O) (Amide I)
972	$\nu$ (C-C) backbone in RNA	2864	C=O
1107	$\nu$ (C-O), $\nu$ (CC), ring (polysaccharides)	2933	$\nu$ (CH <sub>3</sub> ) (protein)
1165	C, G ; Tyrosine (collagen type I)		
1274	T, A, Amide III ; =CH bend		
1289	Phosphodiester group in nucleic acid		
1386	CH <sub>3</sub> band (GAG)		
1432	CH <sub>2</sub> deformation		
1480	CH <sub>3</sub> deformation; DNA		
2887	$\nu_{as}$ (CH <sub>3</sub> ) (lipids, fatty acids)		
2947	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub> , lipides, acides gras		

D'autres changements ont été observés dans la région d'onde de 1200 à 1500  $\text{cm}^{-1}$ , contenant les caractéristiques spectrales correspondant principalement aux caractéristiques structurales secondaires des protéines. Les changements de la CP2 montrent des variations structurales des protéines secondaires qui sont plus importantes dans le cartilage dégradé et

intéressent à la fois les structures des protéoglycanes (bande à  $1386\text{ cm}^{-1}$ , correspondant aux vibrations de la N-acetyl-glucosamine, une des unités disaccharidiques des GAGs) et du collagène de type II ( $1274$  et  $1289\text{ cm}^{-1}$ ). La présence de la bande à  $1386\text{ cm}^{-1}$ , correspondant à l'acide hyaluronique, squelette principal des GAGs. Pour un aggrécane, le core protéine se lie à l'acide hyaluronique qui peut recevoir de nombreux aggrécans et former des super-agrégats responsables de l'hydratation du tissu, permettant au cartilage de répondre aux sollicitations mécaniques. De sorte qu'il aide à organiser et stabiliser la relation entre les PG et le maillage du collagène. Les modifications au sein de cette glycoprotéine ont été qualifiées comme l'une des premiers changements associées à l'ostéoarthrose et à l'immobilisation de l'articulation <sup>360</sup>.

Un autre changement observé dans cette région spectrale, intéresse la bande Raman CH à  $1449\text{ cm}^{-1}$  qui, généralement renseigne aussi bien sur la concentration totale des protéines et lipides, mais également permet d'apprécier la contribution du cytoplasme environnant. En général, la vibration de déformation  $\text{CH}_2$  est relativement insensible à la conformation et a été proposée comme norme d'intensité <sup>342</sup>. Dans le cartilage dégradé, cette bande Raman présente des fortes modifications avec notamment la présence des bandes d'épaulements à  $1432$  et  $1480\text{ cm}^{-1}$ . Cette situation pourrait traduire les éventuelles modifications au sein du squelette cytoplasmique et ou de l'ADN. Il est connu qu'au cours de l'arthrose, un nombre croissant de chondrocytes articulaires subit une modulation phénotypique <sup>361</sup> soit vers des cellules aux caractéristiques hypertrophiques <sup>362,363</sup>, soit vers des cellules pouvant être considérées comme des chondrocytes «dégradants» <sup>364</sup>. Ces dernières cellules peuvent synthétiser toutes les protéases connues dégradant le cartilage et donc jouer probablement un rôle décisif dans la progression de la maladie. Par exemple, certains auteurs ont montré que l'exposition à des cytokines inflammatoires, telles que les cytokines inflammatoires (notamment l'interleukines-1 (IL-1) b et le facteur de nécrose tumorale (TNF)), entraînerait des changements dans la structure de l'ADN, comme la méthylation, en la rendant plus ou moins compacte, facilitant ou non l'accessibilité à la molécule de l'ADN et à sa transcription <sup>365,366</sup>. Car, dans l'arthrose, les cytokines régulent à la fois à la baisse l'expression des gènes chondrocytaires, et induisent l'expression de plusieurs protéases dégradant la matrice. Dans la présente étude, la présence des deux bandes à  $1432\text{ cm}^{-1}$  (déformation  $\text{CH}_2$ ) et la bande à  $1480\text{ cm}^{-1}$  (déformation  $\text{CH}_3$ , correspondant également à l'ADN) pourrait expliquer aisément les changements non seulement dans le squelette cytoplasmique, mais également dans la structure de l'ADN.

En s'intéressant par ailleurs à la région de hautes fréquences vibratoires CH ( $2800$  et  $3000\text{ cm}^{-1}$ ), très caractéristique dans les études spectroscopiques, nous pouvons observer des

changements caractéristiques dans la concentration des biomolécules. Comme la région CH à  $1449\text{ cm}^{-1}$ , cette région fournit également des informations sur la composition chimique des échantillons en raison des différences dans l'environnement des liaisons C-H<sup>13</sup>. Il est donc possible d'apprécier la concentration (totale relative) des protéines et des lipides, mais aussi sur les changements des liaisons chimiques. Dans cette région, les protéines ont été caractérisées par les pics à  $2930\text{ cm}^{-1}$  et un épaulement à  $2870\text{ cm}^{-1}$ <sup>367,368</sup>, qui pourraient être assimilés ici par les bandes à  $2933$  et  $2864\text{ cm}^{-1}$ , contrairement aux bandes à  $2887$  et  $2947\text{ cm}^{-1}$  qui sont plutôt caractéristiques des lipides, démontrant ainsi l'augmentation du taux de lipides dans le tissu dégradé. De nombreuses études ont rapporté des dépôts lipidiques dans l'arthrose<sup>369-372</sup>, avec des perturbations dans la composition des acides gras et acide arachidonique au sein des chondrocytes issus de cartilage arthrosique, dont les quantités augmentent avec la sévérité des lésions cartilagineuses<sup>373</sup>. Cette augmentation du taux de lipides a été associée à la réponse des chondrocytes face à la dégradation du cartilage en vue de faire face aux changements physiochimiques intervenues dans la matrice cartilagineuse<sup>359,374</sup>. Pour rappel les lipides sont des nutriments importants dans le métabolisme des chondrocytes et sont disponibles pour ces cellules par synthèse de novo, mais également par diffusion à partir des tissus environnants. En présence de lésions du cartilage articulaire, les lipides sont anormalement produits. Dans une étude réalisée par Amanda et ses collaborateurs en 2013<sup>372</sup>, en définissant le statut du cartilage, ils ont pu mettre en lien le développement de l'arthrose avec la disponibilité des lipides. Dans plusieurs modèles d'arthrite dégénérative, l'accumulation de lipides précède généralement la dégénérescence tissulaire locale<sup>375,376</sup>. Par exemple, Lippiello et ses coll.<sup>373</sup> avaient montré des niveaux d'accumulation d'acide lipidique et arachidonique avec un degré croissant de lésion et de sévérité histologique dans l'arthrose.

Nos résultats suggèrent que la dégradation de la matrice cartilagineuse entraîne aussi bien des modifications dans le squelette cytoplasmique de la cellule associée à une synthèse d'ADN et sa transcription. Toutes ces modifications pourraient être à l'origine du changement précoce du phénotype chondrocytaire, ainsi que des perturbations dans les structures secondaires des protéines. Le phénotype des chondrocytes normaux, comme celui de toutes les cellules somatiques adultes, est stabilisé par le statut épigénétique de la cellule. Nos résultats pourraient ainsi démontrer le lien entre le changement phénotypique des chondrocytes et les changements dans la structure de l'ADN par méthylation.

### 3.3.5 Conclusion partielle 3

La dégradation de la matrice cartilagineuse est le point de départ de l'arthrose. En clinique, l'arthrose n'est diagnostiquée qu'aux stades avancés de la maladie. Ce qui rend la prise en charge plus difficile eu égard à la capacité limitée du cartilage articulaire à se régénérer ou à cicatriser spontanément. Par conséquent, caractériser de façon précoce les changements biochimiques, précurseurs des modifications morphologiques de l'articulation, constituerait une étape essentielle pour développer des stratégies thérapeutiques. Dans cette étude, la microscopie confocale Raman a pu caractériser les changements dans la structure de l'ADN associée au changement phénotypique des chondrocytes dans l'arthrose. Ces résultats montrent la robustesse de la MCR à fournir des informations biochimiques nécessaires pour caractériser le cartilage arthrosique et identifier les différents facteurs précoces ou tardifs impliqués dans la pathogénie de l'arthrose.



## 4 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'arthrose est l'une des maladies les plus débilantes et est associée à une charge personnelle et socio-économique élevée. La nature asymptomatique de l'arthrose est un obstacle au diagnostic, et l'absence d'un outil de diagnostic précoce empêche le traitement. Les diagnostics actuels de l'arthrose reposent sur l'évaluation des modifications morphologiques de l'articulation qui, généralement ne sont constatées que dans les stades avancés de la maladie. Or, les propriétés chimiques, biologiques et mécaniques des articulations peuvent être modifiées avant même que les changements morphologiques ne se produisent, ce qui exige un diagnostic plus précoce de la maladie.

La demande clinique toujours croissante de tissus et de cellules de remplacement a conduit à une expansion rapide des capacités de recherche dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative. Les approches d'ingénierie tissulaire pour le cartilage visent à réparer un tissu intrinsèquement hétérogène et à préserver l'intégrité mécanique. L'évaluation des variations microscopiques dans la composition et la distribution des biomolécules au sein de la matrice cartilagineuse et des constructions issues de l'ingénierie tissulaire, mais également de la dégradation de ladite matrice sont primordiales pour assurer un succès clinique. Au cours du développement cellulaire, de petits changements dans le niveau de transcription génique entraînent des changements subtils dans la présence et la distribution des espèces moléculaires. Ces changements induisent un modèle de changements dans les spectres Raman, qui, s'ils sont correctement caractérisés, peuvent être utilisés comme «marqueurs moléculaires» pour les changements d'état des cellules.

La surveillance de la croissance des tissus et des cellules en culture cellulaire reste un défi majeur, malgré les techniques analytiques actuelles, y compris le dosage immuno-enzymatique (ELISA), la réaction en chaîne polymérase et le transfert western, qui permettent de sonder de nombreux facteurs tels que l'expression de l'ARN, l'expression des protéines intracellulaires/extracellulaire et les composants exogènes, sont considérées lentes, lourdes et invasives. Dans cette thèse, l'objectif était de suivre la maturation du cartilage génétique sous charge mécanique avec des méthodes innovantes de microscopie, telles que la microscopie confocale Raman, les microscopies à force atomique et multiphotonique. A partir de la microscopie confocale Raman, nous avons successivement évalué la structure de la matrice du cartilage et, effectuer la surveillance de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) vers les chondrocytes, et à l'inverse la de

dédiérenciation des chondrocytes. En outre, nous avons différencié le cartilage dégradé d'un cartilage normal.

### **(1) La caractérisation de la matrice du cartilage**

La capacité à caractériser la composition et la distribution de la matrice du cartilage et les marqueurs spécifiques à chaque région matricielle est essentielle pour comprendre le processus par lequel le cartilage articulaire subit une dégénérescence liée à la maladie, mais aussi pour développer de nouvelles stratégies de réparation tissulaire, afin de restaurer la fonctionnalité des tissus <sup>334</sup>. L'imagerie Raman a permis de mettre en évidence la régionalisation de la matrice cartilagineuse et caractériser les variations significatives dans la morphologie, la taille et l'orientation des chondrons sur toute la profondeur de la matrice. Cette complexité de la matrice est également caractérisée par une distribution spatiale des composants principaux de la matrice, avec une MEC plus riche en collagènes, notamment le collagène de type II, contrairement à la matrice péricellulaire et le chondrocyte qui sont plutôt riches en protéoglycanes, et cela indépendamment des différentes zones de la matrice. En outre, l'identification des trois pics Raman distincts de la MPC dans les différentes zones ont été définis comme des indicateurs pour le suivi de la progression de la dégradation de la matrice dans l'arthrose. Aussi, la caractérisation des propriétés biomécaniques ont mis en œuvre une variation décroissante du module d'élasticité de la MEC au chondrocyte ( $E_0 = 94,87 \pm 44,07$  pour la matrice extracellulaire,  $E_0 = 44,83 \pm 20,91$  pour matrice péricellulaire  $E_0 = 15,30 \pm 7,65$  pour et le chondrocyte), ainsi qu'une épaisseur de la matrice péricellulaire dépendante de la profondeur (zone superficielle est  $= 2,7 \pm 0,8$ , zone intermédiaire  $= 3,6 \pm 1,1$  et la zone profonde  $= 4,9 \pm 1,8$ ). La conception d'un néocartilage artificiel devrait récapituler l'architecture des zones distinctes, ainsi que les régions matricielles afin de recréer la relation structure-fonction du cartilage natif. Dans ce travail, plusieurs remarques peuvent être faites :

- La MCR fournit une panoplie d'informations biochimiques qui, si elles sont toutes bien comprises, peuvent faciliter une meilleure compréhension des relations structure-fonction du cartilage natif,
- Le manque de recul sur les données spectrales du cartilage articulaire, laisse parfois entrevoir des hypothèses sur la caractérisation et l'interprétation de certaines bandes Raman, notamment les bandes Raman à  $1590 \text{ cm}^{-1}$  et  $1130 \text{ cm}^{-1}$ , attribuées

au collagène de type VI et au perlécane, respectivement. Ces deux molécules sont connues pour leur rôle dans la régulation des interactions entre les différentes régions matricielles (la MEC, la MPC et le chondrocyte). Elles sont également impliquées dans la régulation de l'équilibre homéostatique de l'activité métabolique des chondrocytes et de sa réponse aux signaux environnementaux. La caractérisation individuelle de la signature spectrale de ces deux molécules pourrait contribuer à la surveillance du cartilage et identifier précocement les changements métaboliques de la matrice liés à l'arthrose.

## **(2) La différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM) vers les chondrocytes et la dédifférenciation des chondrocytes**

Les approches de l'ingénierie tissulaire du cartilage s'intéressent à deux sources de cellules, en particulier les chondrocytes, seules cellules résidentes et responsables du renouvellement de la MEC dégradée et, les cellules souches mésenchymateuses pour leur capacité à se différencier en chondrocytes<sup>151</sup>, pour récréer un néocartilage artificiel. En général, les cellules sontensemencées dans des cultures cellulaires *in vitro* pour accroître leur nombre et leur capacité de différenciation. Contrairement aux CSMs qui peuvent facilement se différencier quel que soit le type de culture, les chondrocytes, quant à elles perdent rapidement leurs caractéristiques morphologiques et synthétiques spécifiques, et se comportent comme des fibroblastes indifférenciés en culture monocouche. A partir de la MCR, il a été possible de suivre (en temps réel) les changements biochimiques associés à la dédifférenciation des chondrocytes. Les pics identifiés (1063, 1255, 1449 et 1659  $\text{cm}^{-1}$ ) peuvent être considérés comme des indicateurs pour surveiller les différentes modifications (morphologique et biochimique) au cours des différents passages. A ce titre, la MCR constitue un bon outil de surveillance pour caractériser les processus de dédifférenciation des chondrocytes et déterminer les niveaux de croissance des cellules nécessaires pour induire une redifférenciation des chondrocytes dans des milieux de suspension. A la différence des chondrocytes dédifférenciés qui peuvent être suivi en temps réel, cela n'a pas été le cas des hCSMs différenciées. Bien qu'elles présentent dans le motif spectral toutes les caractéristiques des chondrocytes, de grandes différences ont été observées d'une culture à une autre. Ce qui rend inévitablement la surveillance plutôt complexe et donc difficile de définir un modèle idéal. D'où l'intérêt de l'optimisation des conditions de culture, la précision dans le dosage des milieux. Ce qui

permettra de répondre à la question de la reproductibilité, condition essentielle à l'élaboration de stratégies de conception de néocartilage qui soit fonctionnel à long terme.

### **(3) Caractérisation du cartilage articulaire arthrosique**

L'arthrose est une maladie caractérisée par la perte progressive du cartilage articulaire. Cette modification structurelle modifie profondément sa capacité à amortir les contraintes mécaniques. La maladie n'est détectée en clinique qu'à des stades plus avancés. En raison de la capacité limitée du cartilage articulaire à se régénérer et ou à cicatriser spontanément, caractériser de façon plus précoce les modifications chimiques impliqués dans l'initiation de l'arthrose contribuerait à anticiper la prise en charge. Dans ce travail, la MCR a démontré sa capacité à caractériser le cartilage dégradé et mettre en évidence les changements dans la structure de l'ADN qui pourraient précéder aux changements dans le phénotype de la matrice.

En tout état de cause, la MCR s'est révélée comme technique optique très pertinente, sans contact, non invasive et non destructive, et sans aucune préparation de l'échantillon <sup>178</sup>, capable de fournir des informations quantitatives et qualitatives sur la distribution des composés et des processus chimiques dans les cellules ou les tissus. Aussi, pourrait-elle être utilisée comme un outil pour le diagnostic précoce de l'arthrose.

Enfin, dans ce travail de thèse, nous avons associée à la MCR, les techniques de microscopie multiphotonique et de microscopie à force atomique (AFM). Ces différentes techniques optiques se sont montrées complémentaires pour caractériser à la fois la structure et les propriétés chimiques et biomécaniques du tissu cartilagineux.

## 5 REFERENCES

- (1) Eyre, D. Collagen of Articular Cartilage. *Arthritis Res.* **2002**, *4* (1), 30–35. <https://doi.org/10.1186/ar380>.
- (2) Hunziker, E. B.; Quinn, T. M.; Häuselmann, H.-J. Quantitative Structural Organization of Normal Adult Human Articular Cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **2002**, *10* (7), 564–572. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0814>.
- (3) Hayes, A. J.; Hall, A.; Brown, L.; Tubo, R.; Caterson, B. Macromolecular Organization and In Vitro Growth Characteristics of Scaffold-Free Neocartilage Grafts. *J. Histochem. Cytochem.* **2007**, *55* (8), 853–866. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7210.2007>.
- (4) Klein, T. J.; Malda, J.; Sah, R. L.; Huttmacher, D. W. Tissue Engineering of Articular Cartilage with Biomimetic Zones. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2009**, *15* (2), 143–157. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0563>.
- (5) Hunter, D. J.; Altman, R. D.; Cicuttini, F.; Crema, M. D.; Duryea, J.; Eckstein, F.; Guermazi, A.; Kijowski, R.; Link, T. M.; Martel-Pelletier, J.; Miller, C. G.; Mosher, T. J.; Ochoa-Albíztegui, R. E.; Pelletier, J.-P.; Peterfy, C.; Raynauld, J.-P.; Roemer, F. W.; Totterman, S. M.; Gold, G. E. OARSI Clinical Trials Recommendations: Knee Imaging in Clinical Trials in Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**, *23* (5), 698–715. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.012>.
- (6) Grebenyuk, S.; Ranga, A. Engineering Organoid Vascularization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7* (MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00039>.
- (7) Camplejohn, K. L.; Allard, S. A. Limitations of Safranin “O” Staining in Proteoglycan-Depleted Cartilage Demonstrated with Monoclonal Antibodies. *Histochemistry* **1988**, *89* (2), 185–188. <https://doi.org/10.1007/BF00489922>.
- (8) Hillman, H. Limitations of Clinical and Biological Histology. *Med. Hypotheses* **2000**, *54* (4), 553–564. <https://doi.org/10.1054/mehy.1999.0894>.
- (9) Boppart, S. A.; Herrmann, J.; Pitris, C.; Stamper, D. L.; Brezinski, M. E.; Fujimoto, J. G. High-Resolution Optical Coherence Tomography-Guided Laser Ablation of Surgical Tissue. *J. Surg. Res.* **1999**, *82* (2), 275–284. <https://doi.org/10.1006/jsre.1998.5555>.
- (10) Xia, Y. Magic-Angle Effect in Magnetic Resonance Imaging of Articular Cartilage: A Review. *Invest. Radiol.* **2000**, *35* (10), 602–621. <https://doi.org/10.1097/00004424-200010000-00007>.
- (11) Camacho, N. P.; West, P.; Torzilli, P. A.; Mendelsohn, R. FTIR Microscopic Imaging of Collagen and Proteoglycan in Bovine Cartilage. *Biopolym. Biospectroscopy* **2001**, *62*, 1–8. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)62:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)62:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-O).
- (12) Mansfield, J.; Yu, J.; Attenburrow, D.; Moger, J.; Tirlapur, U.; Urban, J.; Cui, Z.; Winlove, P. The Elastin Network: Its Relationship with Collagen and Cells in Articular Cartilage as Visualized by Multiphoton Microscopy. *J. Anat.* **2009**, *215* (6), 682–691. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01149.x>.
- (13) Mansfield, J.; Moger, J.; Green, E.; Moger, C.; Winlove, C. P. Chemically Specific Imaging and In-Situ Chemical Analysis of Articular Cartilage with Stimulated Raman Scattering. *J. Biophotonics* **2013**, *6* (10), 803–814. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200213>.
- (14) Kunstar, A. Confocal Raman Microspectroscopy : Applications in Cartilage Tissue Engineering. PhD, University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2012. <https://doi.org/10.3990/1.9789036533638>.
- (15) Tsuboi, M.; Benevides, J. M.; George J. THOMAS, Jr. Raman Tensors and Their Application in Structural Studies of Biological Systems. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2009**, *85* (3), 83–97. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.83>.

- (16) Schrader, B. *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*; John Wiley & Sons, 2008.
- (17) Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *J Bone Jt. Surg Am* **1997**, *79* (4), 600–611.
- (18) Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. Articular Cartilage: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *Instr. Course Lect.* **1998**, *47*, 487–504.
- (19) Sucheston, M. E. (Welch); Cannon, M. S. Variations in the Appearance of Human Elastic Cartilage. *OHIO J. Sci.* **1969**, *69* (6), 366–371.
- (20) Makris, E. A.; Hadidi, P.; Athanasiou, K. A. The Knee Meniscus: Structure–Function, Pathophysiology, Current Repair Techniques, and Prospects for Regeneration. *Biomaterials* **2011**, *32* (30), 7411–7431. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.037>.
- (21) Detamore, M. S.; Athanasiou, K. A. Structure and Function of the Temporomandibular Joint Disc: Implications for Tissue Engineering. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2003**, *61* (4), 494–506. <https://doi.org/10.1053/joms.2003.50096>.
- (22) Mitrovic, D.; Quintero, M.; Stankovic, A.; Ryckewaert, A. Cell Density of Adult Human Femoral Condylar Articular Cartilage. Joints with Normal and Fibrillated Surfaces. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **1983**, *49* (3), 309–316.
- (23) Athanasiou, K. A.; Darling, E. M.; DuRaine, G. D.; Hu, J. C.; Reddi, A. H. *Articular Cartilage*, Second edition. Biomedical engineering; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton London New York, 2017.
- (24) Poole, A. R.; Kojima, T.; Yasuda, T.; Mwale, F.; Kobayashi, M.; Laverty, S. Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clin. Orthop.* **2001**, No. 391 SUPPL. <https://doi.org/10.1097/00003086-200110001-00004>.
- (25) Kheir, E.; Shaw, D. Hyaline Articular Cartilage. *Orthop. Trauma* **2009**, *23* (6), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2009.01.003>.
- (26) Horvai, A. Anatomy and Histology of Cartilage. In *Cartilage Imaging: Significance, Techniques, and New Developments*; Link, T. M., Ed.; Springer: New York, NY, 2011; pp 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8438-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8438-8_1).
- (27) *Collagen: Structure and Mechanics*; Fratzl, P., Ed.; Springer: New York, NY, 2008.
- (28) Izquierdo, E. Caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal et développement d'une stratégie de restauration par voie enzymatique, Université de Cergy-Pontoise, 2015.
- (29) Strupler, M. Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique. phdthesis, Ecole Polytechnique X, 2008.
- (30) Sandell, L. J.; Morris, N. Alternatively Spliced Type 11 Procollagen MRNAs Define Distinct Populations of Cells during Vertebral Development : Differential Expression of the Amino-Propeptide. *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 13.
- (31) Andriamanalijaona, R. 11 - Cell Therapies for Articular Cartilage Repair: Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. In *Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues*; Archer, C., Ralphs, J., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2010; pp 266–300. <https://doi.org/10.1533/9781845697792.1.266>.
- (32) Clark, J. M. The Organisation of Collagen Fibrils in the Superficial Zones of Articular Cartilage. *J. Anat.* **1990**, *171*, 117–130.
- (33) Leitinger, B.; Hohenester, E. Mammalian Collagen Receptors. *Matrix Biol.* **2007**, *26* (3), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007>.

- (34) Leikin, S.; Parsegian, V. A.; Yang, W.-H.; Walrafen, G. E. Raman Spectral Evidence for Hydration Forces between Collagen Triple Helices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (21), 11312–11317. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11312>.
- (35) Van der Rest, M. Biologie Du Collagène et Maladies Hérititaires de La Matrice Extracellulaire. **1987**.
- (36) Wu, J. J.; Woods, P. E.; Eyre, D. R. Identification of Cross-Linking Sites in Bovine Cartilage Type IX Collagen Reveals an Antiparallel Type II-Type IX Molecular Relationship and Type IX to Type IX Bonding. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (32), 23007–23014.
- (37) Eyre, D. R.; Weis, M. A.; Wu, J.-J. Articular Cartilage Collagen: An Irreplaceable Framework. *Eur Cell Mater* **2006**, *12* (1), 57–63.
- (38) Monfort, J.; Pelletier, J.-P.; Garcia-Giralt, N.; Martel-Pelletier, J. Biochemical Basis of the Effect of Chondroitin Sulphate on Osteoarthritis Articular Tissues. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67* (6), 735–740. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.068882>.
- (39) Roughley, P. J.; Lee, E. R. Cartilage Proteoglycans: Structure and Potential Functions. *Microsc. Res. Tech.* **1994**, *28* (5), 385–397. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070280505>.
- (40) Watanabe, H.; Yamada, Y.; Kimata, K. Roles of Aggrecan, a Large Chondroitin Sulfate Proteoglycan, in Cartilage Structure and Function. *J. Biochem. (Tokyo)* **1998**, *124* (4), 687–693.
- (41) Dudhia, J. Aggrecan, Aging and Assembly in Articular Cartilage. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2005**, *62* (19), 2241–2256. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5217-x>.
- (42) Te, H.; Aj, F.; J, D. The Structure, Function and Turnover of Aggrecan, the Large Aggregating Proteoglycan from Cartilage. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. J. Forum Eur. Clin. Chem. Soc.* **1994**, *32* (4), 249–257.
- (43) Grover, J.; Roughley, P. J. Expression of Cell-Surface Proteoglycan mRNA by Human Articular Chondrocytes. *Biochem. J.* **1995**, *309* (3), 963–968. <https://doi.org/10.1042/bj3090963>.
- (44) Hildebrand, A.; Romarís, M.; Rasmussen, L. M.; Heinegård, D.; Twardzik, D. R.; Border, W. A.; Ruoslahti, E. Interaction of the Small Interstitial Proteoglycans Biglycan, Decorin and Fibromodulin with Transforming Growth Factor  $\beta$ . *Biochem. J.* **1994**, *302* (2), 527–534. <https://doi.org/10.1042/bj3020527>.
- (45) Hardingham, T. E.; Beardmore-Gray, M.; Dunham, D. G.; Ratcliffe, A. Cartilage Proteoglycans. In *Ciba Foundation Symposium 124 - Functions of the Proteoglycans*; John Wiley & Sons, Ltd; pp 30–46. <https://doi.org/10.1002/9780470513385.ch3>.
- (46) Mow, V. C.; Ratcliffe, A.; Robin Poole, A. Cartilage and Diarthrodial Joints as Paradigms for Hierarchical Materials and Structures. *Biomaterials* **1992**, *13* (2), 67–97. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90001-5).
- (47) Donnan, F. G. The Theory of Membrane Equilibria. *Chem. Rev.* **1924**, *1* (1), 73–90. <https://doi.org/10.1021/cr60001a003>.
- (48) Poole, C. A.; Flint, M. H.; Beaumont, B. W. Chondrons Extracted from Canine Tibial Cartilage: Preliminary Report on Their Isolation and Structure. *J. Orthop. Res.* **1988b**, *6* (3), 408–419. <https://doi.org/10.1002/jor.1100060312>.
- (49) Poole, C. A. Articular Cartilage Chondrons: Form, Function and Failure. *J. Anat.* **1997**, *191* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0021878297002185>.
- (50) Youn, I.; Choi, J. B.; Cao, L.; Setton, L. A.; Guilak, F. Zonal Variations in the Three-Dimensional Morphology of the Chondron Measured in Situ Using Confocal Microscopy. *Osteoarthritis Cartilage* **2006**, *14* (9), 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.02.017>.
- (51) Zhang, Z. Chondrons and the Pericellular Matrix of Chondrocytes. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **2015**, *21* (3), 267–277. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0286>.

- (52) Poole, C. A.; Ayad, S.; Schofield, J. R. Chondrons from Articular Cartilage: I. Immunolocalization of Type VI Collagen in the Pericellular Capsule of Isolated Canine Tibial Chondrons. *J. Cell Sci.* **1988**, *90* (Pt 4), 635–643.
- (53) Darling, E. M.; Wilusz, R. E.; Bolognesi, M. P.; Zauscher, S.; Guilak, F. Spatial Mapping of the Biomechanical Properties of the Pericellular Matrix of Articular Cartilage Measured In Situ via Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **2010**, *98* (12), 2848–2856. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.037>.
- (54) Glant, T. T.; Hadhâzy, Cs.; Mikecz, K.; Sipos, A. Appearance and Persistence of Fibronectin in Cartilage: Specific Interaction of Fibronectin with Collagen Type II. *Histochemistry* **1985**, *82* (2), 149–158. <https://doi.org/10.1007/BF00708199>.
- (55) Dürr, J.; Lammi, P.; Goodman, S. L.; Aigner, T.; von der Mark, K. Identification and Immunolocalization of Laminin in Cartilage. *Exp. Cell Res.* **1996**, *222* (1), 225–233. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0028>.
- (56) Poole, C. A.; Wotton, S. F.; Duance, V. C. Localization of Type IX Collagen in Chondrons Isolated from Porcine Articular Cartilage and Rat Chondrosarcoma. *Histochem. J.* **10/1988c**, *20* (10), 567–574. <https://doi.org/10.1007/BF01002611>.
- (57) Poole, C. A.; Flint, M. H.; Beaumont, B. W. Chondrons in Cartilage: Ultrastructural Analysis of the Pericellular Microenvironment in Adult Human Articular Cartilages. *J. Orthop. Res.* **1987**, *5* (4), 509–522. <https://doi.org/10.1002/jor.1100050406>.
- (58) Corvol, M.-T. The Chondrocyte: From Cell Aging to Osteoarthritis. *Joint Bone Spine* **2000**, *67* (6), 557–560. [https://doi.org/10.1016/S1297-319X\(00\)00211-6](https://doi.org/10.1016/S1297-319X(00)00211-6).
- (59) E, V.; J, B.; Dj, H.; G, V.; B, V.; P, M. [Quantitative Study of Experimental Osteoarthritic Lesions in the Rabbit. Value for the Study of Anti-Osteoarthritis Drugs]. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* **1986**, *53* (11), 649–652.
- (60) Armstrong, S. J.; Read, R. A.; Price, R. Topographical Variation within the Articular Cartilage and Subchondral Bone of the Normal Ovine Knee Joint: A Histological Approach. *Osteoarthritis Cartilage* **1995**, *3* (1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(05\)80035-4](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(05)80035-4).
- (61) Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. Articular Cartilage: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *Instr. Course Lect.* **1998**, *47*, 477–486.
- (62) Wira, P.; Urban, J. P. A New Adaptive Kalman Filter Applied to Visual Servoing Tasks. In *KES'2000. Fourth International Conference on Knowledge-Based Intelligent Engineering Systems and Allied Technologies. Proceedings (Cat. No.00TH8516)*; IEEE, 2000; Vol. 1, pp 267–270. <https://doi.org/10.1109/KES.2000.885808>.
- (63) Bottini, M.; Bhattacharya, K.; Fadeel, B.; Magrini, A.; Bottini, N.; Rosato, N. Nanodrugs to Target Articular Cartilage: An Emerging Platform for Osteoarthritis Therapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12* (2), 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.013>.
- (64) Hoemann, C.; Kandel, R.; Roberts, S.; Saris, D. B. F.; Creemers, L.; Mainil-Varlet, P.; Méthot, S.; Hollander, A. P.; Buschmann, M. D. International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *CARTILAGE* **2011**, *2* (2), 153–172. <https://doi.org/10.1177/1947603510397535>.
- (65) Muir, H.; Bullough, P.; Maroudas, A. The Distribution of Collagen in Human Articular Cartilage with Some of Its Physiological Implications. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1970**, *52-B* (3), 554–563. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.52B3.554>.
- (66) Ghadially, F. N.; Lalonde, J. M.; Wedge, J. H. Ultrastructure of Normal and Torn Menisci of the Human Knee Joint. *J. Anat.* **1983**, *136* (Pt 4), 773–791.
- (67) Roy, S.; Meachim, G. Chondrocyte Ultrastructure In Adult Human Articular Cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **1968**, *27* (6), 544–558. <https://doi.org/10.1136/ard.27.6.544>.



- (68) Stockwell, R. A. Distribution of Crystals in the Superficial Zone of Elderly Human Articular Cartilage of the Femoral Head in Subcapital Fracture. *Ann. Rheum. Dis.* **1990**, 49 (4), 231–235. <https://doi.org/10.1136/ard.49.4.231>.
- (69) Flannery, C. R.; Hughes, C. E.; Schumacher, B. L.; Tudor, D.; Aydelotte, M. B.; Kuettner, K. E.; Caterson, B. Articular Cartilage Superficial Zone Protein (SZP) Is Homologous to Megakaryocyte Stimulating Factor Precursor and Is a Multifunctional Proteoglycan with Potential Growth-Promoting, Cytoprotective, and Lubricating Properties in Cartilage Metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 254 (3), 535–541. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.0104>.
- (70) Buckwalter, J. A.; Rosenberg, L. Structural Changes during Development in Bovine Fetal Epiphyseal Cartilage. *Top. Catal.* **1983**, 3 (6), 489–504. [https://doi.org/10.1016/S0174-173X\(83\)80028-4](https://doi.org/10.1016/S0174-173X(83)80028-4).
- (71) Hunziker, E. B.; Michel, M.; Studer, D. Ultrastructure of Adult Human Articular Cartilage Matrix after Cryotechnical Processing. **1997**, 37, 271–284.
- (72) Venn, M.; Maroudas, A. Chemical Composition and Swelling of Normal and Osteoarthrotic Femoral Head Cartilage. I. Chemical Composition. *Ann. Rheum. Dis.* **1977**, 36 (2), 121–129. <https://doi.org/10.1136/ard.36.2.121>.
- (73) Stockwell, R. A. The Interrelationship of Cell Density and Cartilage Thickness in Mammalian Articular Cartilage. *J. Anat.* **1971**, 109 (Pt 3), 411–421.
- (74) Gilmore, R. S.; Palfrey, A. J. A Histological Study of Human Femoral Condylar Articular Cartilage. *J. Anat.* **1987**, 155, 77–85.
- (75) Roughley, P. J. Articular Cartilage and Changes in Arthritis: Noncollagenous Proteins and Proteoglycans in the Extracellular Matrix of Cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **2001**, 3 (6), 342. <https://doi.org/10.1186/ar326>.
- (76) Cohen, N. P.; Foster, R. J.; Mow, V. C. Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure, Function, and Maintaining Healthy State. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* **1998**, 28 (4), 203–215. <https://doi.org/10.2519/jospt.1998.28.4.203>.
- (77) Oseni, A. O.; Crowley, C.; Boland, M. Z.; Butler, P. E.; Seifalian, A. M. *Cartilage Tissue Engineering: The Application of Nanomaterials and Stem Cell Technology*, Prof. Daniel Eberli.; BoD – Books on Demand, 2011.
- (78) Reddi, A. H. Cartilage Morphogenetic Proteins: Role in Joint Development, Homeostasis, and Regeneration. *Ann. Rheum. Dis.* **2003**, 62 (90002), 73ii–7378. [https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl\\_2.ii73](https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl_2.ii73).
- (79) Vinatier, C.; Mrugala, D.; Jorgensen, C.; Guicheux, J.; Noël, D. Cartilage Engineering: A Crucial Combination of Cells, Biomaterials and Biofactors. *Trends Biotechnol.* **2009**, 27 (5), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.005>.
- (80) Kronenberg, H. M. Developmental Regulation of the Growth Plate. *Nature* **2003**, 423 (6937), 332–336. <https://doi.org/10.1038/nature01657>.
- (81) Bonaventure, J.; Silve, C. Dysplasies osseuses héréditaires et voies de signalisation associées aux récepteurs FGFR3 et PTHR1. *médecine/sciences* **2005**, 21 (11), 954–961. <https://doi.org/10.1051/medsci/20052111954>.
- (82) Radin, E. L.; Burr, D. B.; Caterson, B.; Fyhrie, D.; Brown, T. D.; Boyd, R. D. Mechanical Determinants of Osteoarthrosis. *Semin. Arthritis Rheum.* **1991**, 21 (3, Supplement 2), 12–21. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(91\)90036-Y](https://doi.org/10.1016/0049-0172(91)90036-Y).
- (83) Rhouma, M. Effet d'une supplémentation en vitamine E alimentaire sur l'inflammation et la douleur chez le chien avec arthrose. Mémoire, Université de Montréal, Montréal, 2012.
- (84) Hashimoto, S.; Ochs, R. L.; Komiya, S.; Lotz, M. Linkage of Chondrocyte Apoptosis and Cartilage Degradation in Human Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **1998**, 41 (9),

- 1632–1638. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199809\)41:9<1632::AID-ART14>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199809)41:9<1632::AID-ART14>3.0.CO;2-A).
- (85) Vignon, E.; Balblanc, J. C.; Mathieu, P.; Louisot, P.; Richard, M. Metalloprotease Activity, Phospholipase A2 Activity and Cytokine Concentration in Osteoarthritis Synovial Fluids. *Osteoarthritis Cartilage* **1993**, *1* (2), 115–120. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(05\)80026-3](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(05)80026-3).
- (86) Cawston, T. Matrix Metalloproteinases and TIMPs: Properties and Implications for the Rheumatic Diseases. *Mol. Med. Today* **1998**, *4* (3), 130–137. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(97\)01192-1](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(97)01192-1).
- (87) Abbaszade, I.; Liu, R.-Q.; Yang, F.; Rosenfeld, S. A.; Ross, O. H.; Ellis, D. M.; Burn, T. C. et al. Cloning and Characterization of ADAMTS11, an Aggrecanase from the ADAMTS Family\*. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (33), 23443–23450. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23443>.
- (88) Tortorella, M. D.; Burn, T. C.; Pratta, M. A.; Abbaszade, I.; Hollis, J. M.; Liu, R.; Rosenfeld, S. A.; Copeland, R. A.; Decicco, C. P.; Wynn, R.; Rockwell, A.; Yang, F.; Duke, J. L.; Solomon, K.; George, H.; Bruckner, R.; Nagase, H.; Itoh, Y.; Ellis, D. M.; Ross, H.; Wiswall, B. H.; Murphy, K.; Hillman, M. C.; Hollis, G. F.; Newton, R. C.; Magolda, R. L.; Trzaskos, J. M.; Arner, E. C. Purification and Cloning of Aggrecanase-1: A Member of the ADAMTS Family of Proteins. *Science* **1999**, *284* (5420), 1664–1666. <https://doi.org/10.1126/science.284.5420.1664>.
- (89) Goldring, M. B.; Birkhead, J.; Sandell, L. J.; Kimura, T.; Krane, S. M. Interleukin 1 Suppresses Expression of Cartilage-Specific Types II and IX Collagens and Increases Types I and III Collagens in Human Chondrocytes. *J. Clin. Invest.* **1988**, *82* (6), 2026–2037. <https://doi.org/10.1172/JCI113823>.
- (90) Taskiran, D.; Stefanovicracic, M.; Georgescu, H.; Evans, C. Nitric-Oxide Mediates Suppression of Cartilage Proteoglycan Synthesis by Interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200* (1), 142–148. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1426>.
- (91) Petersson, I. F.; Jacobsson, L. T. H. Osteoarthritis of the Peripheral Joints. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2002**, *16* (5), 741–760. <https://doi.org/10.1053/berh.2002.0266>.
- (92) Karpie, J. C.; Chu, C. R. Imaging of Articular Cartilage. *Oper. Tech. Orthop.* **2006**, *16* (4), 279–285. <https://doi.org/10.1053/j.oto.2006.09.005>.
- (93) Le Pen, C.; Reygrobelle, C.; Gérentes, I. Les conséquences socioéconomiques de l'arthrose en France. Étude COART 11 Etude sur les COûts de l'ARThrose en France, rapport réalisé sur l'initiative des laboratoires NEGMA-LERADS. France. *Rev. Rhum.* **2005**, *72* (12), 1326–1330. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2005.01.016>.
- (94) Brooks, P. M. The Burden of Musculoskeletal Disease—a Global Perspective. *Clin. Rheumatol.* **2006**, *25* (6), 778–781.
- (95) Chaganti, R. K.; Lane, N. E. Risk Factors for Incident Osteoarthritis of the Hip and Knee. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* **2011**, *4* (3), 99. <https://doi.org/10.1007/s12178-011-9088-5>.
- (96) Hunziker, E. B.; Lippuner, K.; Keel, M. J. B.; Shintani, N. An Educational Review of Cartilage Repair: Precepts & Practice – Myths & Misconceptions – Progress & Prospects. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**, *23* (3), 334–350. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.12.011>.
- (97) Mobasheri, A.; Richardson, S.; Mobasheri, R.; Shakibaei, M.; Hoyland, J. A. Hypoxia Inducible Factor-1 and Facilitative Glucose Transporters GLUT1 and GLUT3: Putative Molecular Components of the Oxygen and Glucose Sensing Apparatus in Articular Chondrocytes. *Histol. Histopathol.* **2005**, *20* (4), 12.

- (98) Hembry, R. M.; Dyce, J.; Driesang, I.; Hunziker, E. B.; Fosang, A. J.; Tyler, J. A.; Murphy, G. Immunolocalization of Matrix Metalloproteinases in Partial-Thickness Defects in Pig Articular Cartilage : A Preliminary Report. *JBJS* **2001**, *83* (6), 826–838.
- (99) Sanchez, C.; Deberg, M. A.; Piccardi, N.; Msika, P.; Reginster, J.-Y. L.; Henrotin, Y. E. Subchondral Bone Osteoblasts Induce Phenotypic Changes in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **2005**, *13* (11), 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.012>.
- (100) Mobasheri, A.; Bondy, C. A.; Moley, K.; Mendes, A. F.; Rosa, S. C.; Richardson, S.; Hoyland, J. A.; Barrett-Jolley, R.; Shakibaei, M. *Facilitative Glucose Transporters in Articular Chondrocytes: Expression, Distribution and Functional Regulation of GLUT Isoforms by Hypoxia, Hypoxia Mimetics, Growth Factors and Pro-Inflammatory Cytokines*; Springer Science & Business Media, 2008.
- (101) Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation\*†. *JBJS* **1997**, *79* (4), 612–632.
- (102) Je, G. Current Treatment Options for the Restoration of Articular Cartilage. *Am. J. Knee Surg.* **1998**, *11* (1), 42–46.
- (103) Messner, K.; Gillquist, J. Cartilage Repair: A Critical Review. *Acta Orthop. Scand.* **1996**, *67* (5), 523–529. <https://doi.org/10.3109/17453679608996682>.
- (104) Buckwalter, J. A.; Lohmander, S. Operative Treatment of Osteoarthritis. Current Practice and Future Development. *JBJS* **1994**, *76* (9), 1405–1418.
- (105) Abramson, S. B.; Attur, M.; Yazici, Y. Prospects for Disease Modification in Osteoarthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2006**, *2* (6), 304–312. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0193>.
- (106) Livesley, P.; Doherty, M.; Needoff, M.; Moulton, A. Arthroscopic Lavage of Osteoarthritic Knees. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1991**, *73-B* (6), 922–926. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.73B6.1720118>.
- (107) Chang, R. W.; Falconer, J.; Stulberg, S. D.; Arnold, W. J.; Manheim, L. M.; Dyer, A. R. A Randomized, Controlled Trial of Arthroscopic Surgery versus Closed-Needle Joint Lavage for Patients with Osteoarthritis of the Knee. *Arthritis Rheum.* **1993**, *36* (3), 289–296. <https://doi.org/10.1002/art.1780360302>.
- (108) Jackson, R. W.; Dieterichs, C. The Results of Arthroscopic Lavage and Debridement of Osteoarthritic Knees Based on the Severity of Degeneration. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **2003**, *19* (1), 13–20. <https://doi.org/10.1053/jars.2003.50022>.
- (109) Shannon, F.; Devitt, A.; Poynton, A.; Fitzpatrick, P.; Walsh, M. Short-Term Benefit of Arthroscopic Washout in Degenerative Arthritis of the Knee. *Int. Orthop.* **2001**, *25* (4), 242–245. <https://doi.org/10.1007/s002640000212>.
- (110) Cheung, S.; Ma, C. B. Clinical Aspects: An Orthopedic Surgeon’s Perspective. In *Cartilage Imaging: Significance, Techniques, and New Developments*; Link, T. M., Ed.; Springer: New York, NY, 2011; pp 19–26. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8438-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8438-8_3).
- (111) Moseley, J. B.; O’Malley, K.; Petersen, N. J.; Menke, T. J.; Brody, B. A.; Kuykendall, D. H. et al. A Controlled Trial of Arthroscopic Surgery for Osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347* (2), 81–88. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013259>.
- (112) Kirkley, A.; Birmingham, T. B.; Litchfield, R. B.; Giffin, J. R.; Willits, K. R.; Wong, C. J. et al. A Randomized Trial of Arthroscopic Surgery for Osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359* (11), 1097–1107. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708333>.
- (113) Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; Rodrigo, J. J. Microfracture: Surgical Technique and Rehabilitation to Treat Chondral Defects. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2001**, *391*, S362.

- (114) Hunt, S. A.; Jazrawi, L. M.; Sherman, O. H. Arthroscopic Management of Osteoarthritis of the Knee. *JAAOS - J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2002**, *10* (5), 356–363.
- (115) Johnson, L. L. Arthroscopic Abrasion Arthroplasty: A Review. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2001**, *391*, S306–S317.
- (116) Steadman, J. R.; Briggs, K. K.; Rodrigo, J. J.; Kocher, M. S.; Gill, T. J.; Rodkey, W. G. Outcomes of Microfracture for Traumatic Chondral Defects of the Knee: Average 11-Year Follow-Up. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **2003**, *19* (5), 477–484. <https://doi.org/10.1053/jars.2003.50112>.
- (117) Williams, S. K.; Amiel, D.; Ball, S. T.; Allen, R. T.; Wong, V. W.; Chen, A. C.; Sah, R. L.; Bugbee, W. D. Prolonged Storage Effects on the Articular Cartilage of Fresh Human Osteochondral Allografts. *JBJS* **2003**, *85* (11), 2111–2120.
- (118) Furukawa, T.; Eyre, D.; Koide, S.; Glimcher, M. Biochemical Studies on Repair Cartilage Resurfacing Experimental Defects in the Rabbit Knee. *J. Bone Joint Surg. Am.* **1980**, *62* (1), 79–89.
- (119) Shapiro, F.; Koide, S.; Glimcher, M. J. Cell Origin and Differentiation in the Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage.: *J. Bone Jt. Surg.* **1993**, *75* (4), 532–553. <https://doi.org/10.2106/00004623-199304000-00009>.
- (120) Jackson, D. W.; Lalor, P. A.; Aberman, H. M.; Simon, T. M. Spontaneous Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage in a Goat Model : A Preliminary Study. *JBJS* **2001**, *83* (1), 53.
- (121) Temenoff, J. S.; Mikos, A. G. Review: Tissue Engineering for Regeneration of Articular Cartilage. *Biomaterials* **2000**, *21* (5), 431–440. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00213-6).
- (122) Kreuz, P. C.; Steinwachs, M. R.; Erggelet, C.; Krause, S. J.; Konrad, G.; Uhl, M.; Südkamp, N. Results after Microfracture of Full-Thickness Chondral Defects in Different Compartments in the Knee. *Osteoarthritis Cartilage* **2006**, *14* (11), 1119–1125. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.05.003>.
- (123) Danišovič, L.; Boháč, M.; Zamborský, R.; Oravcová, L.; Provazníková, Z.; Csöbönyeiová, M.; Varga, I. Comparative Analysis of Mesenchymal Stromal Cells from Different Tissue Sources in Respect to Articular Cartilage Tissue Engineering. *Gen Physiol Biophys* **2016**, *35* (2), 207–214. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2015044](https://doi.org/10.4149/gpb_2015044).
- (124) Caminal, M.; Peris, D.; Fonseca, C.; Barrachina, J.; Codina, D.; Rabanal, R. M.; García, F. et al. Cartilage Resurfacing Potential of PLGA Scaffolds Loaded with Autologous Cells from Cartilage, Fat, and Bone Marrow in an Ovine Model of Osteochondral Focal Defect. *Cytotechnology* **2016**, *68* (4), 907–919. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9842-4>.
- (125) Lietman, S. A. Induced Pluripotent Stem Cells in Cartilage Repair. *World J. Orthop.* **2016**, *7* (3), 149–155. <https://doi.org/10.5312/wjo.v7.i3.149>.
- (126) Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331* (14), 889–895. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>.
- (127) Vasiliadis, H. S.; Wasiak, J. Autologous Chondrocyte Implantation for Full Thickness Articular Cartilage Defects of the Knee. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2010**, No. 10. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003323.pub3>.
- (128) Bentley, G.; Biant, L. C.; Carrington, R. W. J.; Akmal, M.; Goldberg, A.; Williams, A. M.; Skinner, J. A.; Pringle, J. A Prospective, Randomised Comparison of Autologous Chondrocyte Implantation *versus* Mosaicplasty for Osteochondral Defects in the Knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* **2003**, *85-B* (2), 223–230. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.85B2.13543>.

- (129) Marlovits, S.; Zeller, P.; Singer, P.; Resinger, C.; Vécsei, V. Cartilage Repair: Generations of Autologous Chondrocyte Transplantation. *Eur. J. Radiol.* **2006**, *57* (1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2005.08.009>.
- (130) Minas, T.; Gomoll, A. H.; Solhpour, S.; Rosenberger, R.; Probst, C.; Bryant, T. Autologous Chondrocyte Implantation for Joint Preservation in Patients with Early Osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2010**, *468* (1), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s11999-009-0998-0>.
- (131) Vasiliadis, H. S.; Lindahl, A.; Georgoulis, A. D.; Peterson, L. Malalignment and Cartilage Lesions in the Patellofemoral Joint Treated with Autologous Chondrocyte Implantation. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2011**, *19* (3), 452–457. <https://doi.org/10.1007/s00167-010-1267-1>.
- (132) Micheli, L. J.; Browne, J. E.; Erggelet, C.; Fu, F.; Mandelbaum, B.; Moseley, J. B.; Zurakowski, D. Autologous Chondrocyte Implantation of the Knee: Multicenter Experience and Minimum 3-Year Follow-Up. *Clin. J. Sport Med.* **2001**, *11* (4), 223–228.
- (133) Peterson, L.; Brittberg, M.; Kiviranta, I.; Åkerlund, E. L.; Lindahl, A. Autologous Chondrocyte Transplantation: Biomechanics and Long-Term Durability. *Am. J. Sports Med.* **2002**, *30* (1), 2–12. <https://doi.org/10.1177/03635465020300011601>.
- (134) Peterson, L.; Vasiliadis, H. S.; Brittberg, M.; Lindahl, A. Autologous Chondrocyte Implantation: A Long-Term Follow-Up. *Am. J. Sports Med.* **2010**, *38* (6), 1117–1124. <https://doi.org/10.1177/0363546509357915>.
- (135) Nestic, D.; Whiteside, R.; Brittberg, M.; Wendt, D.; Martin, I.; Mainil-Varlet, P. Cartilage Tissue Engineering for Degenerative Joint Disease B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 300–322. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.012>.
- (136) Horas, U.; Pelinkovic, D.; Herr, G.; Aigner, T.; Schnettler, R. Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in Cartilage Repair of the Knee Joint : A Prospective, Comparative Trial. *JBJS* **2003**, *85* (2), 185–192.
- (137) Mainil-Varlet, P.; Aigner, T.; Brittberg, M.; Bullough, P.; Hollander, A.; Hunziker, E.; Kandel, R.; Nehrer, S.; Pritzker, K.; Roberts, S.; Stauffer, E. Histological Assessment of Cartilage Repair: A Report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *JBJS* **2003**, *85* (suppl\_2), 45–57.
- (138) Millward-Sadler, S. J.; Salter, D. M. Integrin-Dependent Signal Cascades in Chondrocyte Mechanotransduction. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32* (3), 435–446. <https://doi.org/10.1023/B:ABME.0000017538.72511.48>.
- (139) Marlovits S; Aldrian, S.; Resinger, C.; Singer, P.; Zeller, P.; Vécsei, V.; Kutscha-Lissberg, F. [Autologous Chondrocyte Transplantation for the Treatment of Articular Cartilage Defects Inf the Knee Joint. Techniques and Results]. *Radiol.* **2004**, *44* (8), 763–772. <https://doi.org/10.1007/s00117-004-1082-0>.
- (140) von der Mark, K. Chapter 9 Immunological Studies on Collagen Type Transition in Chondrogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*; Moscona, A. A., Monroy, A., Eds.; Immunological Approaches to Embryonic Development and Differentiation Part II; Academic Press, 1980; Vol. 14, pp 199–225. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60195-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60195-7).
- (141) Driesang, I. M. K.; Hunziker, E. B. Delamination Rates of Tissue Flaps Used in Articular Cartilage Repair. *J. Orthop. Res.* **2000**, *18* (6), 909–911. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180609>.
- (142) Loeser, R. F. Aging and Osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2011**, *23* (5), 492–496. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283494005>.
- (143) Loeser, R. F. Aging Processes and the Development of Osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2013**, *25* (1), 108–113. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835a9428>.

- (144) Archer, C. W.; Dowthwaite, G. P.; Francis-West, P. Development of Synovial Joints. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **2003**, *69* (2), 144–155. <https://doi.org/10.1002/bdrc.10015>.
- (145) Jones, C. W.; Willers, C.; Keogh, A.; Smolinski, D.; Fick, D.; Yates, P. J.; Kirk, T. B.; Zheng, M. H. Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation in Sheep: Objective Assessments Including Confocal Arthroscopy. *J. Orthop. Res.* **2008**, *26* (3), 292–303. <https://doi.org/10.1002/jor.20502>.
- (146) Wan, C.; He, Q.; Li, G. Allogenic Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Enhance Bone Regeneration in Rabbit Ulna Critical-sized Bone Defect Model. *J. Orthop. Res.* **2006**, *24* (4), 610–618. <https://doi.org/10.1002/jor.20119>.
- (147) Becker, A. J.; McCulloch, E. A.; Till, J. E. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* **1963**, *197* (4866), 452–454.
- (148) Siminovitch, L.; McCulloch, E. A.; Till, J. E. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1963**, *62* (3), 327–336.
- (149) Friedenstein, A. J.; Chailakhyan, R. K.; Latsinik, N. V.; Panasyuk, A. F.; Keiliss-Borok, I. V. Stromal Cells Responsible For Transferring The Microenvironment Of The Hemopoietic Tissues: Cloning In Vitro and Replantation In Vivo. *Transplantation* **1974**, *17* (4), 331–340.
- (150) Friedenstein, A.; Gorskaja, J.; Kulagina, N. Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs. *Exp. Hematol.* **1976**, *4* (5), 267–274.
- (151) Caplan, A. I. Mesenchymal Stem Cells. *J. Orthop. Res.* **1991**, *9* (5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
- (152) Caplan, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering versus Regenerative Medicine. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213* (2), 341–347. <https://doi.org/10.1002/jcp.21200>.
- (153) Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **1999**, *284* (5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- (154) Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V. Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8* (9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>.
- (155) Noël, D.; Djouad, F.; Mrugala, D.; Bouffi, C.; Jorgensen, C. Cellules Souches Mésoenchymateuses et Immunotolérance : Vers Quelles Applications Cliniques ? *Hématologie* **2007**, *13* (4), 235–242. <https://doi.org/10.1684/hma.2007.0161>.
- (156) Uccelli, A.; Pistoia, V.; Moretta, L. Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy for Immunosuppression? *Trends Immunol.* **2007**, *28* (5), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.03.001>.
- (157) Parekkadan, B.; Milwid, J. M. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2010**, *12* (1), 87–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-070909-105309>.
- (158) Yu, D.-A.; Han, J.; Kim, B.-S. Stimulation of Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Stem Cells* **2012**, *5* (1), 16–22. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2012.5.1.16>.
- (159) Assoian, R. K.; Komoriya, A.; Chester, A. M.; Dorothea, M. M.; Sporn, B. M. Transforming Growth Factor-Beta in Human Platelets. Identification of a Major Storage Site, Purification, and Characterization. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (11), 7155–7160. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32345-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32345-7).

- (160) Roberts, A. B.; Heine, U. I.; Flanders, K. C.; Sporn, M. B. Transforming Growth Factor: Major Role in Regulation of Extracellular Matrix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *580* (1 Structure, Mo), 225–232. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb17931.x>.
- (161) Canalis, E.; Economides, A. N.; Gaggero, E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocr. Rev.* **2003**, *24* (2), 218–235. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0023>.
- (162) van der Kraan, P. M.; Blaney Davidson, E. N.; Blom, A.; van den Berg, W. B. TGF-Beta Signaling in Chondrocyte Terminal Differentiation and Osteoarthritis: Modulation and Integration of Signaling Pathways through Receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage* **2009**, *17* (12), 1539–1545. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.06.008>.
- (163) Fortier, L. A.; Barker, J. U.; Strauss, E. J.; McCarrel, T. M.; Cole, B. J. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2011**, *469* (10), 2706–2715. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-1857-3>.
- (164) Thorpe, S. D.; Buckley, C. T.; Vinardell, T.; O'Brien, F. J.; Campbell, V. A.; Kelly, D. J. The Response of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Dynamic Compression Following TGF-B3 Induced Chondrogenic Differentiation. *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38* (9), 2896–2909. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-0059-6>.
- (165) Mueller, M. B.; Fischer, M.; Zellner, J.; Berner, A.; Dienstknecht, T.; Prantl, L.; Kujat, R.; Nerlich, M.; Tuan, R. S.; Angele, P. Hypertrophy in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis: Effect of TGF- $\beta$  Isoforms and Chondrogenic Conditioning. *Cells Tissues Organs* **2010**, *192* (3), 158–166. <https://doi.org/10.1159/000313399>.
- (166) Solursh, M. Formation of Cartilage Tissue in Vitro. *J. Cell. Biochem.* **1991**, *45* (3), 258–260. <https://doi.org/10.1002/jcb.240450306>.
- (167) Perlaki, C. M.; Liu, Q.; Lim, M. Raman Spectroscopy Based Techniques in Tissue Engineering—An Overview. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2014**, *49* (7), 513–532. <https://doi.org/10.1080/05704928.2013.863205>.
- (168) Caspers, P. J.; Lucassen, G. W.; Wolthuis, R.; Bruining, H. A.; Puppels, G. J. In Vitro and in Vivo Raman Spectroscopy of Human Skin. *Biospectroscopy* **1998**, *4* (S5), S31–S39. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1998\)4:5+<S31::AID-BSPY4>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:5+<S31::AID-BSPY4>3.0.CO;2-M).
- (169) Wohlrab, J.; Vollmann, A.; Wartewig, S.; Marsch, W. C.; Neubert, R. Noninvasive Characterization of Human Stratum Corneum of Undiseased Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis as Studied by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Biopolymers* **2001**, *62* (3), 141–146. <https://doi.org/10.1002/bip.1006>.
- (170) Ikoma, T.; Kobayashi, H.; Tanaka, J.; Walsh, D.; Mann, S. Physical Properties of Type I Collagen Extracted from Fish Scales of Pagrus Major and Oreochromis Niloticas. *Int. J. Biol. Macromol.* **2003**, *32* (3), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00054-0).
- (171) Stone, N.; Kendall, C.; Smith, J.; Crow, P.; Barr, H. Raman Spectroscopy for Identification of Epithelial Cancers. *Faraday Discuss.* **2004**, *126* (1), 141–157. <https://doi.org/10.1039/b304992b>.
- (172) Bergholt, M. S.; St-Pierre, J.-P.; Offeddu, G. S.; Parmar, P. A.; Albro, M. B.; Puetzer, J. L.; Oyen, M. L.; Stevens, M. M. Raman Spectroscopy Reveals New Insights into the Zonal Organization of Native and Tissue-Engineered Articular Cartilage. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2* (12), 885–895. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00222>.
- (173) Lim, M.; Ye, H.; Panoskaltsis, N.; Drakakis, E. M.; Yue, X.; Cass, A. E. G.; Radomska, A.; Mantalaris, A. Intelligent Bioprocessing for Haemotopoietic Cell Cultures Using Monitoring and Design of Experiments. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25* (4), 353–368. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.002>.

- (174) Das, K.; Stone, N.; Kendall, C.; Fowler, C.; Christie-Brown, J. Raman Spectroscopy of Parathyroid Tissue Pathology. *Lasers Med. Sci.* **2006**, *21* (4), 192–197. <https://doi.org/10.1007/s10103-006-0397-7>.
- (175) Stone, N.; Matousek, P. Advanced Transmission Raman Spectroscopy: A Promising Tool for Breast Disease Diagnosis. *Cancer Res.* **2008**, *68* (11), 4424–4430. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6557>.
- (176) Mahadevan-Jansen, A.; Richards-Kortum, R. Raman Spectroscopy for Cancer Detection: A Review. In *Proceedings of the 19th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. “Magnificent Milestones and Emerging Opportunities in Medical Engineering”* (Cat. No.97CH36136); IEEE: Chicago, IL, USA, 1997; Vol. 6, pp 2722–2728. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.1997.756895>.
- (177) Hanlon, E. B.; Manoharan, R.; Koo, T.-W.; Shafer, K. E.; Motz, J. T.; Fitzmaurice, M.; Kramer, J. R.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Prospects for *in Vivo* Raman Spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* **2000**, *45* (2), R1–R59. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/45/2/201>.
- (178) Colomban, P. Imagerie Raman de matériaux et dispositifs nano/microhétérogènes. *RECHERCHE* **2013**, 26.
- (179) *Confocal Raman Microscopy*, 2nd ed; Toporski, J., Dieing, T., Hollricher, O., Eds.; Springer Series in Surface Sciences; Springer International Publishing: New York, NY, 2018; Vol. 66. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75380-5>.
- (180) Heraud, P.; Marzec, K. M.; Zhang, Q.-H.; Yuen, W. S.; Carroll, J.; Wood, B. R. Label-Free *in Vivo* Raman Microspectroscopic Imaging of the Macromolecular Architecture of Oocytes. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 8945. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08973-0>.
- (181) Priemel, T.; Degtyar, E.; Dean, M. N.; Harrington, M. J. Rapid Self-Assembly of Complex Biomolecular Architectures during Mussel Byssus Biofabrication. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14539. <https://doi.org/10.1038/ncomms14539>.
- (182) Abramczyk, H.; Brozek-Pluska, B. Raman Imaging in Biochemical and Biomedical Applications. Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 5766–5781. <https://doi.org/10.1021/cr300147r>.
- (183) Sijtsma, N. M.; Wouters, S. D.; Grauw, C. J. D.; Otto, C.; Greve, J. Confocal Direct Imaging Raman Microscope: Design and Applications in Biology. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52* (3), 348–355.
- (184) Puppels, G. J.; Putman, C. A.; de Grooth, B. G.; Greve, J. Raman Microspectroscopy and Atomic Force Microscopy of Chromosomal Banding Patterns; Korppi-Tommola, J. E., Ed.; Jyvaskyla, Finland, 1993; p 145. <https://doi.org/10.1117/12.146192>.
- (185) Puppels, G. J.; Garritsen, H. S.; Segers-Nolten, G. M.; de Mul, F. F.; Greve, J. Raman Microspectroscopic Approach to the Study of Human Granulocytes. *Biophys. J.* **1991**, *60* (5), 1046–1056. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82142-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82142-7).
- (186) Puppels, G. J.; Garritsen, H. S. P.; Kummer, J. A.; Greve, J. Carotenoids Located in Human Lymphocyte Subpopulations and Natural Killer Cells by Raman Microspectroscopy. *Cytometry* **1993**, *14* (3), 251–256. <https://doi.org/10.1002/cyto.990140303>.
- (187) Manoharan, R.; Wang, Y.; Feld, M. S. Histochemical Analysis of Biological Tissues Using Raman Spectroscopy. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **1996**, *52* (2), 215–249. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01573-6](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01573-6).
- (188) Sijtsma, N. M.; Duindam, J. J.; Puppels, G. J.; Otto, C.; Greve, J. Imaging with Extrinsic Raman Labels. *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50* (5), 545–551. <https://doi.org/10.1366/0003702963905989>.



- (189) Schaeberle, M. D.; Kalasinsky, V. F.; Luke, J. L.; Lewis, E. N.; Levin, I. W.; Treado, P. J. Raman Chemical Imaging: Histopathology of Inclusions in Human Breast Tissue. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (11), 1829–1833. <https://doi.org/10.1021/ac951245a>.
- (190) Kunstar, A.; Leijten, J.; van Leuveren, S.; Hilderink, J.; Otto, C.; van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; van Apeldoorn, A. A. Recognizing Different Tissues in Human Fetal Femur Cartilage by Label-Free Raman Microspectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **2012**, *17* (11), 116012. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.11.116012>.
- (191) Choo-Smith, L.-P.; Edwards, H. G. M.; Endtz, H. P.; Kros, J. M.; Heule, F.; Barr, H.; Robinson, J. S.; Bruining, H. A.; Puppels, G. J. Medical Applications of Raman Spectroscopy: From Proof of Principle to Clinical Implementation. *Biopolymers* **2002**, *67* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/bip.10064>.
- (192) Huang, Z.; McWilliams, A.; Lui, H.; McLean, D. I.; Lam, S.; Zeng, H. Near-Infrared Raman Spectroscopy for Optical Diagnosis of Lung Cancer. *Int. J. Cancer* **2003**, *107* (6), 1047–1052. <https://doi.org/10.1002/ijc.11500>.
- (193) Shafer-Peltier, K. E.; Haka, A. S.; Motz, J. T.; Fitzmaurice, M.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Model-Based Biological Raman Spectral Imaging. *J. Cell. Biochem.* **2002**, *87* (S39), 125–137. <https://doi.org/10.1002/jcb.10418>.
- (194) Gazi, E.; Dwyer, J.; Gardner, P.; Ghanbari-Siahkali, A.; Wade, A. P.; Miyan, J.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C.; Clarke, N. W.; Shanks, J. H.; Scott, L. J.; Hart, C. A.; Brown, M. Applications of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy in Studies of Benign Prostate and Prostate Cancer. A Pilot Study. *J. Pathol.* **2003**, *201* (1), 99–108. <https://doi.org/10.1002/path.1421>.
- (195) Puppels, G. J.; de Mul, F. F. M.; Otto, C.; Greve, J.; Robert-Nicoud, M.; Arndt-Jovin, D. J.; Jovin, T. M. Studying Single Living Cells and Chromosomes by Confocal Raman Microspectroscopy. *Nature* **1990**, *347* (6290), 301–303. <https://doi.org/10.1038/347301a0>.
- (196) Mankin, H. J. The Reaction of Articular Cartilage to Injury and Osteoarthritis. *N. Engl. J. Med.* **1974**, *291* (24), 1285–1292. <https://doi.org/10.1056/NEJM197412122912406>.
- (197) Draper, E. R.; Morris, M. D.; Camacho, N. P.; Matousek, P.; Towrie, M.; Parker, A. W.; Goodship, A. E. Novel Assessment of Bone Using Time-Resolved Transcutaneous Raman Spectroscopy. *J. Bone Miner. Res.* **2005**, *20* (11), 1968–1972. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050710>.
- (198) Bonifacio, A.; Beleites, C.; Vittur, F.; Marsich, E.; Semeraro, S.; Paoletti, S.; Sergo, V. Chemical Imaging of Articular Cartilage Sections with Raman Mapping, Employing Uni- and Multi-Variate Methods for Data Analysis. *The Analyst* **2010**, *135* (12), 3193. <https://doi.org/10.1039/c0an00459f>.
- (199) Barhoumi, A.; Zhang, D.; Tam, F.; Halas, N. J. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (16), 5523–5529. <https://doi.org/10.1021/ja800023j>.
- (200) De Beer, T.; Burggraeve, A.; Fonteyne, M.; Saelens, L.; Remon, J. P.; Vervaet, C. Near Infrared and Raman Spectroscopy for the In-Process Monitoring of Pharmaceutical Production Processes. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417* (1–2), 32–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.012>.
- (201) Strachan, C. J.; Rades, T.; Gordon, K. C.; Rantanen, J. Raman Spectroscopy for Quantitative Analysis of Pharmaceutical Solids. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 179–192. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.2.0005>.
- (202) Barbillat, J.; Roussel, B.; Silva, E. D. Use of Multi-Notch Filter for Simultaneous Recording of Stokes and Anti-Stokes Raman Signals Close to the Exciting Line. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30* (9), 745–755. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4555\(199909\)30:9<745::AID-JRS422>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4555(199909)30:9<745::AID-JRS422>3.0.CO;2-7).

- (203) Harris, A. T.; Lungari, A.; Needham, C. J.; Smith, S. L.; Lones, M. A.; Fisher, S. E.; Yang, X. B.; Cooper, N.; Kirkham, J.; Smith, D. A.; Martin-Hirsch, D. P.; High, A. S. Potential for Raman Spectroscopy to Provide Cancer Screening Using a Peripheral Blood Sample. *Head Neck Oncol.* **2009**, *1* (1), 34. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-1-34>.
- (204) Frushour, B. G.; Koenig, J. L. Raman Scattering of Collagen, Gelatin, and Elastin. *Biopolymers* **1975**, *14* (2), 379–391. <https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140211>.
- (205) Hebling, J.-M.; Ferrand, G. *Kinésithérapie de la face, du crâne et du cou*; Elsevier Masson SAS., 2015.
- (206) Allen, K. D.; Athanasiou, K. A. Tissue Engineering of the TMJ Disc: A Review. *Tissue Eng.* **2006**, *12* (5), 1183–1196. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1183>.
- (207) Bonnefoy, C.; Chikhani, L.; Dichamp, J. Anatomie descriptive et fonctionnelle de l'articulation temporo-mandibulaire. *Actual. Odonto-Stomatol.* **2013**, No. 265, 4–18. <https://doi.org/10.1051/aos/2013502>.
- (208) Almarza, A. J.; Athanasiou, K. A. Design Characteristics for the Tissue Engineering of Cartilaginous Tissues. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32* (1), 2–17. <https://doi.org/10.1023/B:ABME.0000007786.37957.65>.
- (209) Dargaud, J.; Vinkka-Puhakka, H.; Cotton, F.; Corso, M. D.; Bruy, J.; Vialle, B.; Kahl, P. Rapports de dissection sur la connaissance de l'articulation temporo-mandibulaire /paper/Rapports-de-dissection-sur-la-connaissance-de-Dargaud-Vinkka-Puhakka/c48a4fbfd70375facf293ab6694cfdb38cd5241e (accessed Feb 6, 2021).
- (210) McNeill, C. Management of Temporomandibular Disorders: Concepts and Controversies. *J. Prosthet. Dent.* **1997**, *77* (5), 510–522. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(97\)70145-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(97)70145-8).
- (211) Okeson, J. P.; de Kanter, R. J. Temporomandibular Disorders in the Medical Practice. *J. Fam. Pract.* **1996**, *43* (4), 347–356.
- (212) Okeson, J. P. *TMJ Disorders and Occlusion*. Mosby Ed. **2003**.
- (213) Solberg, W. K.; Woo, M. W.; Houston, J. B. Prevalence of Mandibular Dysfunction in Young Adults. *J. Am. Dent. Assoc.* **1979**, *98* (1), 25–34. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1979.0008>.
- (214) Al-Jundi, M. A.; John, M. T.; Setz, J. M.; Szentpétery, A.; Kuss, O. Meta-Analysis of Treatment Need for Temporomandibular Disorders in Adult Nonpatients. *J. Orofac. Pain* **2008**, *22* (2), 97–107.
- (215) Rauhala, K.; Oikarinen, K. S.; Raustia, A. M. Role of Temporomandibular Disorders (TMD) in Facial Pain: Occlusion, Muscle and TMJ Pain. *CRANIO®* **1999**, *17* (4), 254–261. <https://doi.org/10.1080/08869634.1999.11746102>.
- (216) Svedström-Oristo, A.-L.; Pietilä, T.; Pietilä, I.; Alanen, P.; Varrela, J. Morphological, Functional and Aesthetic Criteria of Acceptable Mature Occlusion. *Eur. J. Orthod.* **2001**, *23* (4), 373–381. <https://doi.org/10.1093/ejo/23.4.373>.
- (217) Blum, C. L.; DC, C. The Relationship between the Pelvis and Stomatognathic System: A Position Statement. *Sacro Occipital Tech. Organ.-USA* **2008**, 40–43.
- (218) Saccucci, M.; Tettamanti, L.; Mummolo, S.; Polimeni, A.; Festa, F.; Salini, V.; Tecco, S. Scoliosis and Dental Occlusion: A Review of the Literature. *Scoliosis* **2011**, *6* (1), 15. <https://doi.org/10.1186/1748-7161-6-15>.
- (219) Clauzade, M.; Marty, J.-P. *Ortho posturodentie*; Seo Editions, 1998.
- (220) Kirveskari, P.; Alanen, P.; Ja"msa", T. Association between Craniomandibular Disorders and Occlusal Interferences. *J. Prosthet. Dent.* **1989**, *62* (1), 66–69. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(89\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0022-3913(89)90052-8).

- (221) Dolwick, M. F.; Dimitroulis, G. Is There a Role for Temporomandibular Joint Surgery? *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **1994**, *32* (5), 307–313. [https://doi.org/10.1016/0266-4356\(94\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0266-4356(94)90052-3).
- (222) Trumpy, I. G.; Lyberg, T. Surgical Treatment of Internal Derangement of the Temporomandibular Joint: Long-Term Evaluation of Three Techniques. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1995**, *53* (7), 740–746. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(95\)90321-6](https://doi.org/10.1016/0278-2391(95)90321-6).
- (223) Liu, Y.; Zhou, G.; Cao, Y. Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions. *Engineering* **2017**, *3* (1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.010>.
- (224) Ó Faoláin, E.; Hunter, M. B.; Byrne, J. M.; Kelehan, P.; McNamara, M.; Byrne, H. J.; Lyng, F. M. A Study Examining the Effects of Tissue Processing on Human Tissue Sections Using Vibrational Spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2005**, *38* (1–2), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.013>.
- (225) Kawamoto, T.; Shimizu, M. A Method for Preparing 2- to 50-Micron-Thick Fresh-Frozen Sections of Large Samples and Undecalcified Hard Tissues. *Histochem. Cell Biol.* **2000**, *113* (5), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s004180000149>.
- (226) Sahai, S.; Wilkerson, M.; Zasko, A. M.; Olson, S. D.; Cox, C. S.; Triolo, F. A Cost-Effective Method to Immobilize Hydrated Soft-Tissue Samples for Atomic Force Microscopy. *BioTechniques* **2016**, *61* (4), 206–208. <https://doi.org/10.2144/000114461>.
- (227) Tripathy, S.; Berger, E. J. Quasi-Linear Viscoelastic Properties of Costal Cartilage Using Atomic Force Microscopy. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **2012**, *15* (5), 475–486. <https://doi.org/10.1080/10255842.2010.545820>.
- (228) Neuman, K. C.; Nagy, A. Single-Molecule Force Spectroscopy: Optical Tweezers, Magnetic Tweezers and Atomic Force Microscopy. *Nat. Methods* **2008**, *5* (6), 491–505. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1218>.
- (229) Prass, M.; Jacobson, K.; Mogilner, A.; Radmacher, M. Direct Measurement of the Lamellipodial Protrusive Force in a Migrating Cell. *J. Cell Biol.* **2006**, *174* (6), 767–772. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601159>.
- (230) Hertz, H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *J. Issue* **1882**, *1882* (92), 156–171. <https://doi.org/10.1515/crll.1882.92.156>.
- (231) Sneddon, I. N. The Relation between Load and Penetration in the Axisymmetric Boussinesq Problem for a Punch of Arbitrary Profile. *Int. J. Eng. Sci.* **1965**, *3* (1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/0020-7225\(65\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0020-7225(65)90019-4).
- (232) Weisenhornt, A. L.; Khorsandit, M.; Kasast, S.; Gotzost, V.; Butt, H.-J. I I Deformation and Height Anomaly of Soft Surfaces Studied with an AFM. *Nanotechnology* **1993**, *4*, 106–113.
- (233) Vinckier, A.; Semenza, G. Measuring Elasticity of Biological Materials by Atomic Force Microscopy. *FEBS Lett.* **1998**, *430* (1–2), 12–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00592-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00592-4).
- (234) Butt, H.-J.; Cappella, B.; Kappl, M. Force Measurements with the Atomic Force Microscope: Technique, Interpretation and Applications. *Surf. Sci. Rep.* **2005**, *59* (1–6), 1–152. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
- (235) Boudou, T.; Ohayon, J.; Picart, C.; Tracqui, P. An Extended Relationship for the Characterization of Young's Modulus and Poisson's Ratio of Tunable Polyacrylamide Gels. *Biorheology* **2006**, *43* (6), 721–728.
- (236) Willard, H. H.; Merritt, L. L. J.; Dean, J. A.; Settle, F. A. J. *Instrumental Methods of Analysis, 7th Edition*; United States, 1988; Vol. 61.

- (237) Savitzky, Abraham.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* **1964**, *36* (8), 1627–1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>.
- (238) Esmonde-White, K. A. Raman Spectroscopy Detection Of Molecular Changes Associated With Osteoarthritis. Biomedical Engineering, The University of Michigan, 2009.
- (239) Kumar, R.; Singh, G. P.; Grønhaug, K. M.; Afseth, N. K.; De Lange Davies, C.; Drogset, J. O.; Lilledahl, M. B. Single Cell Confocal Raman Spectroscopy of Human Osteoarthritic Chondrocytes: A Preliminary Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (5), 9341–9353. <https://doi.org/10.3390/ijms16059341>.
- (240) Fields, M. Characterisation of Articular Cartilage by Micro-Beam Raman Spectroscopy. Doctoral, UCL (University College London), London, 2016.
- (241) Carvalho, C. S.; Martin, A. A.; Santo, A. M. E.; Andrade, L. E. C.; Pinheiro, M. M.; Cardoso, M. A. G.; Raniero, L. A Rheumatoid Arthritis Study Using Raman Spectroscopy. *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *130* (4–6), 1211–1220. <https://doi.org/10.1007/s00214-011-0905-0>.
- (242) Power, L.; Wixmerten, A.; Wendt, D.; Barbero, A.; Martin, I. Raman Spectroscopy Quality Controls for GMP Compliant Manufacturing of Tissue Engineered Cartilage. **2019**, No. March, 14. <https://doi.org/10.1117/12.2507951>.
- (243) Notingher, I.; Jell, G.; Notingher, P. L.; Bisson, I.; Tsigkou, O.; Polak, J. M.; Stevens, M. M.; Hench, L. L. Multivariate Analysis of Raman Spectra for in Vitro Non-Invasive Studies of Living Cells. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744–747*, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.12.046>.
- (244) Adams, M. J. *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, 2nd ed.; RSC analytical spectroscopy monographs; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2004.
- (245) Blanchet, L.; Ruckebusch, C.; Huvenne, J.-P.; Juan, A. de. Focus on the Potential of Hybrid Hard- and Soft-MCR–ALS in Time Resolved Spectroscopy. *J. Chemom.* **2008**, *22* (11–12), 666–673. <https://doi.org/10.1002/cem.1144>.
- (246) Martens, H.; Naes, T. *Multivariate Calibration*; John Wiley & Sons Ltd; John Wiley & Sons: New York, NY, 1992.
- (247) De Juan, A.; Piqueras, S.; Maeder, M.; Hancewicz, T.; Duponchel, L.; Tauler, R. *Chemometric Tools for Image Analysis*; 2014; Vol. 9783527336. <https://doi.org/10.1002/9783527678136.ch2>.
- (248) Stanimirova, I.; Daszykowski, M.; Walczak, B. Robust Methods in Analysis of Multivariate Food Chemistry Data. In *Data Handling in Science and Technology*; Elsevier, 2013; Vol. 28, pp 315–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59528-7.00008-9>.
- (249) Galpin, J. S.; Hawkins, D. M. Methods of L1 Estimation of a Covariance Matrix. *Comput. Stat. Data Anal.* **1987**, *5* (4), 305–319. [https://doi.org/10.1016/0167-9473\(87\)90054-5](https://doi.org/10.1016/0167-9473(87)90054-5).
- (250) MacQueen, J. Some Methods for Classification and Analysis of Multivariate Observations. In *Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability*; Oakland, CA, USA, 1967; Vol. 1, pp 281–297.
- (251) Oinas, J.; Rieppo, L.; Finnilä, M. A. J.; Valkealahti, M.; Lehenkari, P.; Saarakkala, S. Imaging of Osteoarthritic Human Articular Cartilage Using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Combined with Multivariate and Univariate Analysis. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 30008. <https://doi.org/10.1038/srep30008>.
- (252) Hedegaard, M.; Matthaus, C.; Hassing, S.; Krafft, C.; Diem, M. Spectral Unmixing and Clustering Algorithms for Assessment of Single Cells by Raman Microscopic Imaging. *Theor Chem Acc* **2011**, *130*, 1249–1260. <https://doi.org/10.1007/s00214-011-0957-1>.

- (253) Rieppo, L.; Saarakkala, S.; Närhi, T.; Helminen, H. J.; Jurvelin, J. S.; Rieppo, J. Application of Second Derivative Spectroscopy for Increasing Molecular Specificity of Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging of Articular Cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **2012**, *20* (5), 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.01.010>.
- (254) Hunziker, E. B.; Quinn, T. M.; Häuselmann, H. J. Quantitative Structural Organization of Normal Adult Human Articular Cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **2002**, *10* (7), 564–572. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0814>.
- (255) Eyre, D. Collagen of Articular Cartilage. - PubMed - NCBI. *Arthritis Res. Ther.* **2002**, *4* (1), 30–35.
- (256) Masuda, K.; Sah, R. L. Tissue Engineering of Articular Cartilage. *Cult. Cells Tissue Eng.* **2006**, *15* (2), 157–189. <https://doi.org/10.1002/0471741817.ch7>.
- (257) A.R. Poole, I. Pidoux, A. Reiner, And Rosenberg, L.; Joznt. An Immunohistochemical. *J. Histochem. Cytochem.* **1980**, *28* (7), 621–635.
- (258) Athanasiou, K. A.; Darling, E. M.; Hu, J. C. *Articular Cartilage Tissue Engineering*; Morgan & Laypool publishers, 2010.
- (259) Quinn, T. M.; Häuselmann, H. J.; Shintani, N.; Hunziker, E. B. Cell and Matrix Morphology in Articular Cartilage from Adult Human Knee and Ankle Joints Suggests Depth-Associated Adaptations to Biomechanical and Anatomical Roles. *Osteoarthritis Cartilage* **2013**, *21* (12), 1904–1912. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.09.011>.
- (260) O'Connell, G. D.; Lima, E. G.; Bian, L.; Chahine, N. O.; Albro, M. B.; Cook, J. L.; Ateshian, G. A.; Hung, C. T. Toward Engineering a Biological Joint Replacement. *J. Knee Surg.* **2012**, *25* (3), 187–196. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1319783>.
- (261) Kock, L.; Van Donkelaar, C. C.; Ito, K. Tissue Engineering of Functional Articular Cartilage: The Current Status. *Cell Tissue Res.* **2012**, *347* (3), 613–627. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1243-1>.
- (262) Johnstone, B.; Alini, M.; Cucchiari, M.; Dodge, G.; Eglin, D.; Guilak, F.; Madry, H.; Mata, A.; Mauck, R.; Semino, C.; Stoddart, M. Tissue Engineering for Articular Cartilage Repair – the State of the Art. *Eur. Cell. Mater.* **2013**, *25* (May), 248–267. <https://doi.org/10.22203/ecm.v025a18>.
- (263) Hertz, V. H. H. Lieber Die Berührung Fester Elastischer Körper. 156–171.
- (264) Sneddon, I. A. N. N. The Total Depth of Penetration of the Tip of the Punch, and For. **1965**, *3* (638), 47–57.
- (265) Albrecht L Weisenhorn, Mitra Khorsandi, Sandor Kasas, V. G. and H.-J. B. Deformation and Height Anomaly of Soft Surfaces Studied with an AFM. *Nanotechnol.* **1993**, *106* (4), 106113.
- (266) Anja Vinckier Y, G. S. Measuring Elasticity of Biological Materials by Atomic Force Microscopy. *Letters* **1998**, *430*, 12–16.
- (267) Cappella, B.; Kappl, M. Force Measurements with the Atomic Force Microscope : Technique, Interpretation and Applications. *Elsevier* **2005**, *59*, 1–152. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
- (268) Boudou, T.; Ohayon, J.; Picart, C.; Tracqui, P. An Extended Relationship for the Characterization of Young ' s Modulus and Poisson ' s Ratio of Tunable Polyacrylamide Gels. *Biorheology* **2006**, *43*, 721–728.
- (269) Bonnier, F.; Bertrand, D.; Rubin, S.; Vent, L.; Pluot, M.; Baehrel, B.; Manfait, M.; Sockalingum, G. D. Detection of Pathological Aortic Tissues by Infrared Multispectral Imaging and Chemometrics. **2008**, 784–790. <https://doi.org/10.1039/b717164a>.
- (270) Oshima, Y.; Shinzawa, H.; Takenaka, T.; Furihata, C. Discrimination Analysis of Human Lung Cancer Cells Associated with Histological Type and Malignancy Using

- Raman Spectroscopy. **2020**, *15* (February 2010), 1–8. <https://doi.org/10.1117/1.3316296>.
- (271) Stone, N.; Ly, E. Themed Issue on Optical Diagnosis. **2009**. <https://doi.org/10.1039/b820998g>.
- (272) Macqueen, J. SOME METHODS FOR CLASSIFICATION AND ANALYSIS OF MULTIVARIATE OBSERVATIONS. *233* (233), 281–297.
- (273) Oinas, J.; Rieppo, L.; Finnilä, M. A. J.; Valkealahti, M.; Lehenkari, P. Imaging of Osteoarthritic Human Articular Cartilage Using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Combined with Multivariate and Univariate Analysis. *Nat. Publ. Group* **2016**, No. June, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep30008>.
- (274) Hedegaard, M.; Mattha, C.; Krafft, C.; Diem, M. Spectral Unmixing and Clustering Algorithms for Assessment of Single Cells by Raman Microscopic Imaging. **2011**, 1249–1260. <https://doi.org/10.1007/s00214-011-0957-1>.
- (275) Martinez, A. M.; Kak, A. C. PCA versus LDA. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **2001**, *23* (2), 228–233. <https://doi.org/10.1109/34.908974>.
- (276) Camacho, N. P.; West, P.; Torzilli, P. A.; Mendelsohn, R. FTIR Microscopic Imaging of Collagen and Proteoglycan in Bovine Cartilage. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **2001**, *62* (1), 1–8. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)62:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)62:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-O).
- (277) Kim, M.; Bi, X.; Horton, W. E.; Spencer, R. G.; Camacho, N. P. Fourier Transform Infrared Imaging Spectroscopic Analysis of Tissue Engineered Cartilage: Histologic and Biochemical Correlations. *J. Biomed. Opt.* **2005**, *10* (3), 031105. <https://doi.org/10.1117/1.1922329>.
- (278) Boskey, A.; Pleshko Camacho, N. FT-IR Imaging of Native and Tissue-Engineered Bone and Cartilage. *Biomaterials* **2007**, *28* (15), 2465–2478. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.043>.
- (279) Carvalho, C. S.; Martin, A. A.; Santo, A. M. E.; Andrade, L. E. C.; Pinheiro, M. M.; Cardoso, M. A. G.; Raniero, L. A Rheumatoid Arthritis Study Using Raman Spectroscopy. *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *130* (4–6), 1211–1220. <https://doi.org/10.1007/s00214-011-0905-0>.
- (280) Finn, P.; Müller, C.; Khabut, A.; Dudhia, J.; Reinholt, F. P.; Aspberg, A. Quantitative Proteomics at Different Depths in Human Articular Cartilage Reveals Unique Patterns of Protein Distribution. Quantitative Proteomics at Different Depths in Human Articular Cartilage Reveals Unique Patterns of Protein Distribution. *Matrix Biol.* **2014**, *40*, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.013>.
- (281) Oswald, E. S.; Chao, P.-H. G.; Bulinski, J. C.; Ateshian, G. A.; Hung, C. T. Dependence of Zonal Chondrocyte Water Transport Properties on Osmotic Environment. *Cell. Mol. Bioeng.* **2008**, *1* (4), 339–348. <https://doi.org/10.1007/s12195-008-0026-6>.
- (282) Chan, J. W.; Taylor, D. S.; Zwerdling, T.; Lane, S. M.; Ihara, K.; Huser, T. Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells. *Biophys. J.* **2006**, *90* (2), 648–656. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066761>.
- (283) Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews.* **2007**, pp 493–541. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>.
- (284) Makowski, A. J.; Patil, C. A.; Mahadevan-Jansen, A.; Nyman, J. S. Polarization Control of Raman Spectroscopy Optimizes the Assessment of Bone Tissue. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18* (5), 055005. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.18.5.055005>.
- (285) Gamsjaeger, S.; Klaushofer, K.; Paschalis, E. P. Raman Analysis of Proteoglycans Simultaneously in Bone and Cartilage. *J. Raman Spectrosc.* **2014**, *45* (9), 794–800. <https://doi.org/10.1002/jrs.4552>.

- (286) Kheir, E.; Shaw, D. Hyaline Articular Cartilage. *Orthop. Trauma* **2009**, *23* (6), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2009.01.003>.
- (287) Bansil, R.; Yannas, I.; Stanley, H. Scancopy Raman Spectroscopy: A Structural Probe of Glycosaminoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *541* (scancopy), 535–542.
- (288) Mason, R. M. Recent Advances in the Biochemistry of Hyaluronic Acid in Cartilage. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1981**, *54*, 87–112.
- (289) Poole, C. A.; Glant, T. T.; Schofield, J. R. Chondrons from Articular Cartilage. (IV) Immunolocalization of Proteoglycan Epitopes in Isolated Canine Tibial Chondrons. *J. Histochem. Cytochem.* **1991**, *39* (9), 1175–1187. <https://doi.org/10.1177/39.9.1717545>.
- (290) Melrose, J.; Roughley, P.; Knox, S.; Smith, S.; Lord, M.; Whitelock, J. The Structure, Location, and Function of Perlecan, a Prominent Pericellular Proteoglycan of Fetal, Postnatal, and Mature Hyaline Cartilages. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (48), 36905–36914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608462200>.
- (291) Wilusz, R. E.; Sanchez-Adams, J.; Guilak, F. The Structure and Function of the Pericellular Matrix of Articular Cartilage. *Matrix Biology*. American College of Foot and Ankle Surgeons 2014, pp 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>.
- (292) Choi, J. B.; Youn, I.; Cao, L.; Leddy, H. A.; Gilchrist, C. L.; Setton, L. A.; Guilak, F. Zonal Changes in the Three-Dimensional Morphology of the Chondron under Compression: The Relationship among Cellular, Pericellular, and Extracellular Deformation in Articular Cartilage. *J. Biomech.* **2007**, *40* (12), 2596–2603. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.01.009>.
- (293) Poole, C. A.; Flint, M. H.; Beaumont, B. W. Morphological and Functional Interrelationships of Articular Cartilage Matrices. *J. Anat.* **1984**, *138* (Pt 1), 113–138.
- (294) Cheng, W. T.; Liu, M. T.; Liu, H. N.; Lin, S. Y. Micro-Raman Spectroscopy Used to Identify and Grade Human Skin Pilomatrixoma. *Microsc. Res. Tech.* **2005**, *68* (2), 75–79. <https://doi.org/10.1002/jemt.20229>.
- (295) Votteler, M.; Carvajal Berrio, D. A.; Pudlas, M.; Walles, H.; Stock, U. A.; Schenke-Layland, K. Raman Spectroscopy for the Non-Contact and Non-Destructive Monitoring of Collagen Damage within Tissues. *J. Biophotonics* **2012**, *5* (1), 47–56. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100068>.
- (296) Brinckmann, J. Collagens at a Glance. **2005**, 1–6. <https://doi.org/10.1007/b103817>.
- (297) Lee, B. Y. G. M.; Pooled, C. A.; Kelley, S. S.; Chang, J.; Caterson, B. OSTEOARTHRITIS CARTILAGE m e t a b o l i s m i n v i t r o. **1997**, 261–274.
- (298) Wilusz, R. E.; Sanchez-Adams, J.; Guilak, F. The Structure and Function of the Pericellular Matrix of Articular Cartilage. *Matrix Biol.* **2014**, *39*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>.
- (299) SundarRaj, N.; Fite, D.; Ledbetter, S.; Chakravarti, S.; Hassell, J. R. Perlecan Is a Component of Cartilage Matrix and Promotes Chondrocyte Attachment. *J. Cell Sci.* **1995**, *108* (7), 2663–2672.
- (300) Morrison, E. H.; Ferguson, M. W.; Bayliss, M. T.; Archer, C. W. The Development of Articular Cartilage: I. The Spatial and Temporal Patterns of Collagen Types. *J. Anat.* **1996**, *189* (Pt 1), 9–22.
- (301) Sherwin, A. F.; Carter, D. H.; Poole, C. A.; Hoyland, J. A.; Ayad, S. The Distribution of Type VI Collagen in the Developing Tissues of the Bovine Femoral Head. *Histochem. J.* **1999**, *31* (9), 623–632. <https://doi.org/10.1023/A:1003811310619>.
- (302) Alexopoulos, L. G.; Youn, I.; Bonaldo, P.; Guilak, F. Developmental and Osteoarthritic Changes in Col6a1-Knockout Mice: Biomechanics of Type VI Collagen in the Cartilage Pericellular Matrix. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60* (3), 771–779. <https://doi.org/10.1002/art.24293>.

- (303) Vincent, T. L.; McLean, C. J.; Full, L. E.; Peston, D.; Saklatvala, J. FGF-2 Is Bound to Perlecan in the Pericellular Matrix of Articular Cartilage, Where It Acts as a Chondrocyte Mechanotransducer. *Osteoarthritis Cartilage* **2007**, *15* (7), 752–763. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.01.021>.
- (304) TILLET, E.; WIEDEMANN, H.; GOLBIK, R.; PAN, T. -C; ZHANG, R. -Z; MANN, K.; CHU, M. -L; TIMPL, R. Recombinant Expression and Structural and Binding Properties of A1(VI) and A2(VI) Chains of Human Collagen Type VI. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221* (1), 177–187. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18727.x>.
- (305) Hopf, M.; Göhring, W.; Kohfeldt, E.; Yamada, Y.; Timpl, R. Recombinant Domain IV of Perlecan Binds to Nidogens, Laminin-Nidogen Complex, Fibronectin, Fibulin-2 and Heparin. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259* (3), 917–926. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00127.x>.
- (306) Hopf, M.; Göhring, W.; Mann, K.; Timpl, R. Mapping of Binding Sites for Nidogens, Fibulin-2, Fibronectin and Heparin to Different IG Modules of Perlecan. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311* (3), 529–541. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4878>.
- (307) Keene, D. R.; Engvall, E.; Glanville, R. W. Ultrastructure of Type VI Collagen in Human Skin and Cartilage Suggests an Anchoring Function for This Filamentous Network. *J. Cell Biol.* **1988**, *107* (5), 1995–2006. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.5.1995>.
- (308) Bonaldo, P.; Russo, V.; Bucciotti, F.; Doliana, R.; Colombatti, A. Structural and Functional Features of the A3 Chain Indicate a Bridging Role for Chicken Collagen VI in Connective Tissues. *Biochemistry* **1990**, *29* (5), 1245–1254. <https://doi.org/10.1021/bi00457a021>.
- (309) Rühl, M.; Johannsen, M.; Atkinson, J.; Manski, D.; Sahin, E.; Somasundaram, R.; Riecken, E. O.; Schuppan, D. Soluble Collagen VI Induces Tyrosine Phosphorylation of Paxillin and Focal Adhesion Kinase and Activates the MAP Kinase Erk2 in Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **1999**, *250* (2), 548–557. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4540>.
- (310) Rühl, M.; Sahin, E.; Johannsen, M.; Somasundaram, R.; Manski, D.; Riecken, E. O.; Schuppan, D. Soluble Collagen VI Drives Serum-Starved Fibroblasts through S Phase and Prevents Apoptosis via down-Regulation of Bax. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (48), 34361–34368. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34361>.
- (311) Kheir, E.; Shaw, D. Hyaline Articular Cartilage. *Orthop. Trauma* **2009**, *23* (6), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2009.01.003>.
- (312) Petrich, W. Mid-Infrared and Raman Spectroscopy for Medical Diagnostics. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2001**, *36* (2–3), 181–237. <https://doi.org/10.1081/ASR-100106156>.
- (313) Huang, Z.; McWilliams, A.; Lui, H.; McLean, D. I.; Lam, S.; Zeng, H. Near-Infrared Raman Spectroscopy for Optical Diagnosis of Lung Cancer. *Int. J. Cancer* **2003**, *107* (6), 1047–1052. <https://doi.org/10.1002/ijc.11500>.
- (314) Stone, N.; Kendall, C.; Shepherd, N.; Crow, P.; Barr, H. Near-Infrared Raman Spectroscopy for the Classification of Epithelial Pre-Cancers and Cancers. *J. Raman Spectrosc.* **2002**, *33* (7), 564–573. <https://doi.org/10.1002/jrs.882>.
- (315) Cheng, W. T.; Liu, M. T.; Liu, H. N.; Lin, S. Y. Micro-Raman Spectroscopy Used to Identify and Grade Human Skin Pilomatrixoma. *Microsc. Res. Tech.* **2005**, *68* (2), 75–79. <https://doi.org/10.1002/jemt.20229>.
- (316) Pudlas, M.; Koch, S.; Bolwien, C.; Walles, H. Raman Spectroscopy as a Tool for Quality and Sterility Analysis for Tissue Engineering Applications like Cartilage Transplants. *Int. J. Artif. Organs* **2010**, *33* (4), 228–237. <https://doi.org/10.1177/039139881003300407>.



- (317) Bonifacio, A.; Beleites, C.; Vittur, F.; Marsich, E.; Semeraro, S.; Paoletti, S.; Sergo, V. Chemical Imaging of Articular Cartilage Sections with Raman Mapping, Employing Uni- and Multi-Variate Methods for Data Analysis. *The Analyst* **2010**, *135* (12), 3193. <https://doi.org/10.1039/c0an00459f>.
- (318) Naumann, D. Infrared and NIR Raman Spectroscopy in Medical Microbiology. *Spie* **1998**, *3257* (i), 1–13. <https://doi.org/10.1117/12.306089>.
- (319) Shetty, G.; Kendall, C.; Shepherd, N.; Stone, N.; Barr, H. Raman Spectroscopy: Elucidation of Biochemical Changes in Carcinogenesis of Oesophagus. *Br. J. Cancer* **2006**, *94* (10), 1460–1464. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603102>.
- (320) Kahl, G. T. Infrared Raman Spectroscopy (TERS). *Dict. Genomics Transcr. Proteomics* **2015**, *1* (1), 1–1. <https://doi.org/10.1002/9783527678679.dg13293>.
- (321) E. B. Hanlon, R. Manoharan, T.-Wk. et al. Contact Us My IOPscience Prospects for in Vivo Raman Spectroscopy Prospects for in Vivo Raman Spectroscopy. *Phys Med Biol* **2000**, *45*, R1–R59.
- (322) J. Sebag MD, S. Nie, K. Reiser MD, N. Y. Raman Spectroscopy Characterization Of Diabetes Effects On Human Vitreous In Diabetic Retinopathy. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *53* (9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (323) Notingher, I.; Green, C.; Dyer, C.; Perkins, E.; Hopkins, N.; Lindsay, C.; Hench, L. L. Discrimination between Ricin and Sulphur Mustard Toxicity in Vitro Using Raman Spectroscopy. *J. R. Soc. Interface* **2004**, *1* (1), 79–90. <https://doi.org/10.1098/rsif.2004.0008>.
- (324) Ruiz-Chica, A. J.; Medina, M. A.; Sánchez-Jiménez, F.; Ramírez, F. J. Characterization by Raman Spectroscopy of Conformational Changes on Guanine-Cytosine and Adenine-Thymine Oligonucleotides Induced by Aminoxy Analogues of Spermidine. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35* (2), 93–100. <https://doi.org/10.1002/jrs.1107>.
- (325) Dukor, R. K. Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer. *Handb. Vib. Spectrosc.* **2006**. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s8107>.
- (326) Frank, C. J.; McCreery, R. L.; Redd, D. C. B. Raman Spectroscopy of Normal and Diseased Human Breast Tissues. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (5), 777–783. <https://doi.org/10.1021/ac00101a001>.
- (327) Plodinec, M.; Loparic, M.; Aebi, U.; Müller, M. E. *Chapter 2 Atomic Force Microscopy (AFM) for Biological Imaging and Mechanical Testing across Length Scales*.
- (328) R. Calheiros, N. F. L. Machado, S. M. Fiuza, A. Gaspar, J. Garrido, N. Milhazes, F. Borges, and M. P. M. M. Recent Advances in Linear and Nonlinear Raman Spectroscopy I. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38* (April), 1538–1553. <https://doi.org/10.1002/jrs>.
- (329) Malini et al, 2006. Biopolymers Volume 85 / Number 4 295. *Biopolymers* **2007**, *85* (4), 392–406. <https://doi.org/10.1002/bip>.
- (330) Lau, D. P.; Huang, Z.; Lui, H.; Man, C. S.; Berean, K.; Morrison, M. D.; Zeng, H. Raman Spectroscopy for Optical Diagnosis in Normal and Cancerous Tissue of the Nasopharynx - Preliminary Findings. *Lasers Surg. Med.* **2003**, *32* (3), 210–214. <https://doi.org/10.1002/lsm.10084>.
- (331) Lakshmi, R. J.; Kartha, V. B.; Murali Krishna, C.; R. Solomon, J. G.; Ullas, G.; Uma Devi, P. Tissue Raman Spectroscopy for the Study of Radiation Damage: Brain Irradiation of Mice. *Radiat. Res.* **2002**, *157* (2), 175–182. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)157\[0175:trsfts\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)157[0175:trsfts]2.0.co;2).
- (332) Shaw, R. A.; Mantsch, H. H. Vibrational Biospectroscopy: From Plants to Animals to Humans. A Historical Perspective. *J. Mol. Struct.* **1999**, *480–481*, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(98\)00648-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(98)00648-6).

- (333) Min, Y. K.; Yamamoto, T.; Kohda, E.; Ito, T.; Hamaguchi, H. O. 1064 Nm Near-Infrared Multichannel Raman Spectroscopy of Fresh Human Lung Tissues. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36* (1), 73–76. <https://doi.org/10.1002/jrs.1280>.
- (334) Albro, M. B.; Bergholt, M. S.; St-Pierre, J. P.; Vinals Guitart, A.; Zlotnick, H. M.; Evita, E. G.; Stevens, M. M. Raman Spectroscopic Imaging for Quantification of Depth-Dependent and Local Heterogeneities in Native and Engineered Cartilage. *Npj Regen. Med.* **2018**, *3* (1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41536-018-0042-7>.
- (335) Notingher, I.; Verrier, S.; Romanska, H.; Bishop, A. E.; Polak, J. M.; Hench, L. L. *In Situ* Characterisation of Living Cells by Raman Spectroscopy. *Spectroscopy* **2002**, *16* (2), 43–51. <https://doi.org/10.1155/2002/408381>.
- (336) Bergholt, M. S.; Albro, M. B.; Stevens, M. M. Online Quantitative Monitoring of Live Cell Engineered Cartilage Growth Using Diffuse Fiber-Optic Raman Spectroscopy. *Biomaterials* **2017**, *140*, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.015>.
- (337) Notingher, I.; Jones, J. R.; Verrier, S.; Bisson, I.; Embanga, P.; Edwards, P.; Polak, J. M.; Hench, L. L. Application of FTIR and Raman Spectroscopy to Characterisation of Bioactive Materials and Living Cells. *Spectroscopy* **2003**, *17* (2–3), 275–288. <https://doi.org/10.1155/2003/893584>.
- (338) Notingher, I.; Verrier, S.; Haque, S.; Polak, J. M.; Hench, L. L. Spectroscopic Study of Human Lung Epithelial Cells (A549) in Culture: Living Cells versus Dead Cells. *Biopolym. Biospectroscopy* **2003**, *72*, 230–240.
- (339) van Manen, H.-J.; Kraan, Y. M.; Roos, D.; Otto, C. Intracellular Chemical Imaging of Heme-Containing Enzymes Involved in Innate Immunity Using Resonance Raman Microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (48), 18762–18771. <https://doi.org/10.1021/jp046955b>.
- (340) Jin, M.; Pully, V.; Otto, C.; van den Berg, A.; Carlen, E. T. High-Density Periodic Arrays of Self-Aligned Subwavelength Nanopyramids for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (50), 21953–21959. <https://doi.org/10.1021/jp106245a>.
- (341) Kunstar, A.; Leferink, A. M.; Okagbare, P. I.; Morris, M. D.; Roessler, B. J.; Otto, C.; Karperien, M.; van Blitterswijk, C. A.; Moroni, L.; van Apeldoorn, A. A. Label-Free Raman Monitoring of Extracellular Matrix Formation in Three-Dimensional Polymeric Scaffolds. *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10* (86), 20130464. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0464>.
- (342) Mahadevan-Jansen, A. Raman Spectroscopy for the Detection of Cancers and Precancers. *J. Biomed. Opt.* **1996**, *1* (1), 31. <https://doi.org/10.1117/12.227815>.
- (343) Schuh, E.; Kramer, J.; Rohwedel, J.; Notbohm, H.; Müller, R.; Gutschmann, T.; Rotter, N. Effect of Matrix Elasticity on the Maintenance of the Chondrogenic Phenotype. *Tissue Eng. Part A* **2009**, *16* (4), 1281–1290. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0614>.
- (344) Schulze-Tanzil, G. Activation and Dedifferentiation of Chondrocytes: Implications in Cartilage Injury and Repair. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* **2009**, *191* (4), 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2009.05.003>.
- (345) Demoor, M. Cartilage Tissue Engineering: Molecular Control of Chondrocyte Differentiation for Proper Cartilage Matrix Reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2414–2440. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>.
- (346) Dell'Accio, F.; Bari, C. D.; Luyten, F. P. Molecular Markers Predictive of the Capacity of Expanded Human Articular Chondrocytes to Form Stable Cartilage in Vivo. *Arthritis Rheum.* **2001**, *44* (7), 1608–1619. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200107\)44:7<1608::AID-ART284>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200107)44:7<1608::AID-ART284>3.0.CO;2-T).
- (347) Lin, Y. M.; Lim, J. F. Y.; Lee, J.; Choolani, M.; Chan, J. K. Y.; Reuveny, S.; Oh, S. K. W. Expansion in Microcarrier-Spinner Cultures Improves the Chondrogenic Potential

- of Human Early Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* **2016**, *18* (6), 740–753. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.03.293>.
- (348) Tuma, R. Raman Spectroscopy of Proteins: From Peptides to Large Assemblies. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36* (4), 307–319. <https://doi.org/10.1002/jrs.1323>.
- (349) Kellgren, J. H.; Lawrence, J. S. Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* **1957**, *16* (4), 494–502.
- (350) Bonifacio, A.; Beleites, C.; Vittur, F.; Marsich, E.; Semeraro, S.; Paoletti, S.; Sergo, V. Chemical Imaging of Articular Cartilage Sections with Raman Mapping, Employing Uni- and Multi-Variate Methods for Data Analysis. *The Analyst* **2010**, *135* (12), 3193–3204. <https://doi.org/10.1039/c0an00459f>.
- (351) Pudlas, M.; Brauchle, E.; Klein, T. J.; Hutmacher, D. W.; Schenke-Layland, K. Noninvasive Identification of Proteoglycans and Chondrocyte Differentiation State by Raman Microspectroscopy. *J Biophotonics* **2012**, No. 2, 8.
- (352) Takahashi, Y. Raman Spectroscopy Investigation of Load-Assisted Microstructural Alterations in Human Knee Cartilage\_ Preliminary Study into Diagnostic Potential for Osteoarthritis. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2014**, *3*, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.02.014>.
- (353) Diem, M.; Matthäus, C.; Chernenko, T.; Romeo, M. J.; Miljković, M.; Bird, B.; Schubert, J.; Papamarkakis, K.; Laver, N. Infrared and Raman Spectroscopy and Spectral Imaging of Individual Cells. In *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, 2009; pp 173–201. <https://doi.org/10.1002/9783527628230.ch5>.
- (354) MANKIN, H. Form and Function of Articular Cartilage. *Orthop. Basic Sci.* **1994**, 12–13.
- (355) Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J.; Grodzinsky, A. J. Articular Cartilage and Osteoarthritis. *Instr. Course Lect.-Am. Acad. Orthop. Surg.* **2005**, *54*, 465–480.
- (356) Boskey, A.; Pleshkocamacho, N. FT-IR Imaging of Native and Tissue-Engineered Bone and Cartilage. *Biomaterials* **2007**, *28* (15), 2465–2478. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.043>.
- (357) Kumar, R.; Grønhaug, K. M.; Afseth, N. K.; Isaksen, V.; de Lange Davies, C.; Drogset, J. O.; Lilledahl, M. B. Optical Investigation of Osteoarthritic Human Cartilage (ICRS Grade) by Confocal Raman Spectroscopy: A Pilot Study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (26), 8067–8077. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8979-5>.
- (358) Levin, J. I.; Turos, E.; Weinreb, S. M. An Alternative Procedure for the Aluminum-Mediated Conversion of Esters to Amides. *Synth. Commun.* **1982**, *12* (13), 989–993. <https://doi.org/10.1080/00397918208061938>.
- (359) Chan, J. W.; Taylor, D. S.; Zwerdling, T.; Lane, S. M.; Ihara, K.; Huser, T. Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells. *Biophys. J.* **2006**, *90* (2), 648–656. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066761>.
- (360) Buckwalter, J. A.; Lane, N. E. Athletics and Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* **1997**, *25* (6), 873–881. <https://doi.org/10.1177/036354659702500624>.
- (361) Aigner, T.; Dudhia, J. Phenotypic Modulation of Chondrocytes as a Potential Therapeutic Target in Osteoarthritis: A Hypothesis. *Ann. Rheum. Dis.* **1997**, *56* (5), 287–291. <https://doi.org/10.1136/ard.56.5.287>.
- (362) Aigner, T.; Reichenberger, E.; Bertling, W.; Kirsch, T.; Stöß, H.; von der Mark, K. Type X Collagen Expression in Osteoarthritic and Rheumatoid Articular Cartilage. *Virchows Arch. B* **1993**, *63* (1), 205. <https://doi.org/10.1007/BF02899263>.
- (363) Walker, G. D.; Fischer, M.; Gannon, J.; Thompson, R. C.; Oegema, T. R. Expression of Type-X Collagen in Osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* **1995**, *13* (1), 4–12. <https://doi.org/10.1002/jor.1100130104>.

- (364) Roach, H. I.; Yamada, N.; Cheung, K. S. C.; Tilley, S.; Clarke, N. M. P.; Oreffo, R. O. C.; Kokubun, S.; Bronner, F. Association between the Abnormal Expression of Matrix-Degrading Enzymes by Human Osteoarthritic Chondrocytes and Demethylation of Specific CpG Sites in the Promoter Regions. *Arthritis Rheum.* **2005**, *52* (10), 3110–3124. <https://doi.org/10.1002/art.21300>.
- (365) Sellam, J.; Berenbaum, F. Génétique des maladies du cartilage (arthrose, chondrodysplasies). *Rev. Rhum. Monogr.* **2010**, *77* (4), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2010.07.001>.
- (366) Cheung, K. S. C.; Hashimoto, K.; Yamada, N.; Roach, H. I. Expression of ADAMTS-4 by Chondrocytes in the Surface Zone of Human Osteoarthritic Cartilage Is Regulated by Epigenetic DNA de-Methylation. *Rheumatol. Int.* **2009**, *29* (5), 525–534. <https://doi.org/10.1007/s00296-008-0744-z>.
- (367) Wang, H.-W.; Le, T. T.; Cheng, J.-X. Label-Free Imaging of Arterial Cells and Extracellular Matrix Using a Multimodal CARS Microscope. *Opt. Commun.* **2008**, *281* (7), 1813–1822. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2007.07.067>.
- (368) Pliss, A.; Kuzmin, A. N.; Kachynski, A. V.; Prasad, P. N. Biophotonic Probing of Macromolecular Transformations during Apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (29), 12771–12776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006374107>.
- (369) Tikou, M. L.; Shah, R.; Allison, G. T. Evidence Linking Chondrocyte Lipid Peroxidation to Cartilage Matrix Protein Degradation: Possible Role In Cartilage Aging And The Pathogenesis Of Osteoarthritis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (26), 20069–20076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M907604199>.
- (370) Gkretsi, V.; Simopoulou, T.; Tsezou, A. Lipid Metabolism and Osteoarthritis: Lessons from Atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50* (2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.11.001>.
- (371) Zhuo, Q.; Yang, W.; Chen, J.; Wang, Y. Metabolic Syndrome Meets Osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8* (12), 729–737. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.135>.
- (372) Villalvilla, A.; Gómez, R.; Largo, R.; Herrero-Beaumont, G. Lipid Transport and Metabolism in Healthy and Osteoarthritic Cartilage. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (10), 20793–20808. <https://doi.org/10.3390/ijms141020793>.
- (373) Lippiello, L.; Walsh, T.; Fienhold, M. The Association of Lipid Abnormalities with Tissue Pathology in Human Osteoarthritic Articular Cartilage. *Metabolism* **1991**, *40* (6), 571–576. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(91\)90046-Y](https://doi.org/10.1016/0026-0495(91)90046-Y).
- (374) van der Kraan, P. M.; van den Berg, W. B. Chondrocyte Hypertrophy and Osteoarthritis: Role in Initiation and Progression of Cartilage Degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* **2012**, *20* (3), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.003>.
- (375) Stockwell, R. A.; Billingham, M. E.; Muir, H. Ultrastructural Changes in Articular Cartilage after Experimental Section of the Anterior Cruciate Ligament of the Dog Knee. *J. Anat.* **1983**, *136* (Pt 2), 425–439.
- (376) Lukoschek, M.; Schaffler, M. B.; Burr, D. B.; Boyd, R. D.; Radin, E. L. Synovial Membrane and Cartilage Changes in Experimental Osteoarthrosis. *J. Orthop. Res.* **1988**, *6* (4), 475–492. <https://doi.org/10.1002/jor.1100060403>.

## 6 LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

N°	FIGURES	Page
1	<i>Différentes localisations du cartilage dans le corps humain (source : Cartilage and Bones September 27, 2011 by <a href="http://antranik.org/cartilage-and-bones/">Antranik</a>/http://antranik.org/cartilage-and-bones/)</i>	20
2	<i>Cartilage élastique</i>	21
3	<i>Fibrocartilage</i>	22
4	<i>(A) Image macroscopique du cartilage articulaire des condyles fémoraux bovins juvéniles, démontrant la nature scintillante du cartilage hyalin. [Kyriacos AA et coll, 2016 (O)], (B) Image microscopique du cartilage montrant les chondrocytes dans leurs logettes</i>	23
5	<i>Structure triple hélicoïdale du collagène. (A) Vue de l'axe moléculaire (<math>\alpha</math>-carbones uniquement), montrant les chemins des chaînes polypeptidiques individuelles et les emplacements des résidus dans les triplets Gly-X-Y (G = Gly; de (Beck et Brodsky, 1998), avec permission). (B) Vue de côté (molécule inclinée vers le lecteur en haut; représentation remplissant l'espace), montrant la torsion hélicoïdale à droite (Stupler, 2008)</i>	26
6	<i>Les différents types de collagènes du cartilage</i>	27
7	<i>Structure d'un protéoglycane</i>	29
8	<i>Structure d'un glycosaminoglycane (GAG). Les GAG ont des charges négatives sur leurs sulfates carboxylés et peuvent ainsi capter les ions <math>Ca^{++}</math> et <math>Na^+</math> qui, eux-mêmes, attirent l'eau. Ces protéoglycanes constituent un véritable gel hydrophile qui occupe un volume considérable par rapport à son contenu glucidique et l'eau constitue ainsi 70-75 % du poids humide du cartilage articulaire adulte</i>	30
9	<i>Chondrocyte de cartilage articulaire en microscope électronique (ME)</i>	33
10	<i>Arrangement régional et zonal du cartilage articulaire. (A) Spécialisation régionale du cartilage articulaire (les matrices périceellulaires, territoriales et interterritoriales autour des chondrocytes), (B) Organisation zonale distincte du cartilage articulaire de la surface articulaire à la zone calcifiée). Abréviations ChS = sulfate de chondroïtine, Coll = collagène, COMP = protéine de matrice oligomère cartilagineuse, DS = sulfate de dermatane, FGF-2 = facteur de croissance des fibroblastes-2, FGFR = récepteur du FGF, HS = sulfate d'héparane, KS = sulfate de kératane. (Massimo Bottini et coll, 2016)</i>	35
11	<i>Cartilage articulaire avec son organisation interne : les cellules (à droite) et les fibres de collagène (au milieu) sont organisées dans le cartilage en zones superficielles, moyennes et profondes, constituées respectivement de 10 à 20%, 40 à 60% et 20 à 50% de la profondeur globale des tissus.</i>	37
12	<i>Formation et régulation par des facteurs transcriptionnels des lignées chondrocytaire et ostéoblastique<sup>81</sup></i>	40
13	<i>Représentation schématique des circonstances pathogéniques impliquées dans l'apparition de la maladie de l'arthrose. Image empruntée à Henrotin Y. dans « Approche expérimentale de la pathogénie et du traitement de l'arthrose. In: Faculté de Médecine. Liège: Université de Liège; 2003 ».</i>	43

14	<i>Représentation schématique de la technique de microfracturation. (A) Le plancher d'un défaut chondral est perforé à plusieurs endroits à l'aide d'un instrument pointu ou d'un foret à fibre étroite. Par cette action, l'espace médullaire de l'os sous-chondral est ouvert. Le sang s'infiltré dans le défaut portant des MSC locales dérivées de la moelle osseuse - et y forme un hématome (reproduit avec permission de Hunziker et al, 2015). (B) Situation clinique de lésion de grade 4 sur un condyle fémoral médial. À gauche: lésion avant la préparation. Droite: Lésion après débridement et microfracture avec des saignements à la surface de la moelle osseuse. (Cheung Sunny et Benjamin Ma C., 2011).</i>	46
15	<i>Représentation schématique du principe de la mosaïqueplastie. Des bouchons cylindriques de tissu ostéochondral sont percés à partir d'une zone non portante de l'articulation du genou (à l'aide d'un instrument chirurgical spécial), puis ajustés à la presse, côte à côte, dans la zone endommagée. Le nombre de bouchons retirés dépendra du diamètre de surface du site accepteur. Les sites donneurs dénudés sont soit remplis de tissu ostéochondral qui est retiré du site accepteur endommagé lors de sa préparation chirurgicale pour les bouchons, soit laissés vides. Vu de dessus, les bouchons ajustés forment une mosaïque de profils circulaires qui sont entrecoupés d'espaces vides; d'où le nom de "mosaïqueplastie". (Reproduit avec permission de Hunziker et al, 2015). (B) Mosaïque de bouchons obtenus à partir de la trochlée (Cheung S et Benjamin M.C., 2011).</i>	48
16	<i>Séquence sagittale (en haut à gauche) et coronale (en haut à droite) pondérée en T2 montrant un grand défaut chondral du condyle fémoral médial. Vues arthroscopiques de la lésion en flexion (milieu gauche) et en extension (milieu droit). Une arthrotomie montrant le site receveur préparé (en bas à gauche) et l'allogreffe ostéochondrale transférée (en bas à droite). Reproduit avec la permission de Cheung et al, 2011</i>	49
17	<i>Représentation schématique du développement de tissus cartilagineux par ingénierie tissulaire. La combinaison de cellules, d'échafaudages et de facteurs de croissance pourrait être soit directement injectée dans la lésion, soit davantage cultivée dans des bioréacteurs in vitro pour former un nouveau tissu. Le néocartilage serait finalement implanté dans la lésion <sup>135</sup>.</i>	51
18	<i>Représentation schématique du processus de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en trois lignées différentes : Myocytes, chondrocytes, ostéocytes, adipocytes et cellules neurales.</i>	54
19	<i>Structure zonale du cartilage articulaire. Histologie du cartilage articulaire de lapin adulte pleine épaisseur (~ 1 mm) du genou (10 ×), indiquant des changements dans la morphologie cellulaire avec la profondeur. La coupe histologique représente une tranche prise perpendiculairement à la surface du cartilage, avec des protéoglycanes de coloration au bleu de toluidine (violacé), des noyaux de coloration à l'hématoxyline (bleu) et des structures de protéines de coloration à l'éosine (rose / rouge) (Kyriacos et al, 2016).</i>	59
20	<i>Diagrammes de niveau d'énergie moléculaire illustrant l'interaction des molécules avec les photons, (a) diffusion élastique et inélastique par la molécule, (b) absorption infrarouge et émission de fluorescence, (c) diffusion Rayleigh, (d) diffusion Stokes Raman et (e) Diffusion Raman anti-Stokes. <sup>190</sup></i>	64
21	<i>Spectre Raman typique du cartilage articulaire et ses différentes régions vibratoires</i>	66

22	<i>Spectre Raman caractéristique du cartilage articulaire. Bandes Raman dans la région de 600 à 1800 cm<sup>-1</sup> et 2800 à 3670 cm<sup>-1</sup></i>	68
23	<i>Mise en évidence de l'ATM et son disque articulaire</i>	70
24	<i>Illustrations de la méthode Kawamoto: (A) Une souris enceinte, de 6 µm d'épaisseur; (B) Section de 2 µm d'épaisseur: un thighbone de rat adulte, lame: lame de laboratoire de section, Milieu d'enrobage : SCEM-L1; (C) Section congelée fraîche (Une incisive de rat adulte, 2 µm; (D) Section congelée fraîche (par Mme K. Izumi; Une truite arc-en-ciel de 5 µm d'épaisseur (Section Méthode Kawamoto-Lab Co. Ltd. Site: <a href="http://section-lab.jp/English/Gallery%20E.htm">http:// section-lab.jp/English/Gallery%20E.htm</a>)</i>	81
25	<i>Images en microscopie multiphotonique : (A) : autofluorescence de la matrice cartilagineuse (indication fléchée) dans la région immédiatement autour de la cellule, correspondant à la matrice péricellulaire, mettant ainsi en évidence la régionalisation de la matrice autour de la cellule ; (B) : amas de structure fibreuse de collagène de la région MT de la matrice cartilagineuse en mode de génération de seconde harmonique (SGH). Barre d'échelle = 10 µm. Abréviations : MT = matrice territoriale ; MIT = matrice interterritoriale ; MPC = matrice péricellulaire ; C = chondrocyte.</i>	83
26	<i>Procédures de mesures du cartilage articulaire à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) : (A) l'image optique de la matrice de cartilage lors des mesures d'un échantillon avec la pointe du cantilever et des chondrons alignés. (B) L'unique courbe force-distance (FD) enregistrée à chaque pixel de la carte de force (C). Les valeurs du module de Young (E) sont obtenues en ajustant les courbes FD avec une courbe modèle (ligne en pointillée noire) (C) Le code couleur représentant les valeurs du module de Young (YM) obtenues des pixels allant du violet foncé (régions de forces plus ou moins douces) à l'orange jusqu'au blanc (région de forces plus dure) (D) Représentation de la distribution de toutes les valeurs du module de Young (YM) de la carte de force. Tous les histogrammes montrent une forme normalement distribuée et équipés d'une fonction gaussienne obtenant une valeur moyenne (E<sub>0</sub>) qui caractérise l'élasticité du site spécifique</i>	85
27	<i>Microscope Raman LBN Montpellier (A) ; B : Différentes composantes schématisées de la microscopie Raman (<a href="http://www.witec.de">www.witec.de</a>)</i>	87
28	<i>Interface du logiciel de contrôle Witec</i>	88
29	<i>Interface de traitement des spectres du logiciel Spectragryph version 1.2.14</i>	89
30	<i>Les différentes étapes de prétraitement des spectres : (a) Spectres brutes, (b) Soustraction de la ligne de base suivant l'ordre polynomial, (c) Spectres brutes sans la ligne de base, (d) Spectres brutes sans ligne de base pris dans la région spectrale de 600-1800 cm<sup>-1</sup>, (e) Lissage avec le filtre Savitzky Galay et normalisation par rapport à l'aire de la région spectrale 600-1800 cm<sup>-1</sup>, (f) Curseur multilignage et détermination de l'intensité de signal</i>	94
31	<i>La réalisation de l'ACP-LDA à partir des spectres bruts (pris en différents points sur les chondrocytes, la MPC et la MT) permet une répartition des données distribuées sur le premier axe Dim 1 (96,72% de la variance totale), avec une classification en trois groupes montrant distinctement les différentes zones de la matrice du cartilage. Cette distinction est plus représentée avec la détermination la LDA avec calcul des pourcentages de biens classés.</i>	109

32	<i>Histogramme des différentes concentrations moléculaires par zone du cartilage articulaire. Calcul des intensités des 120 spectres collectés au niveau de chaque zone. Une augmentation relative de la concentration des différentes molécules (protéines, lipides et glucides etc.) selon qu'on s'éloigne de la surface du cartilage articulaire. Cette différence significative entre le taux de collagène et de protéoglycane dans les différentes zones superficielle et profonde (<math>p &lt; 0,05</math>)</i>	110
33	<i>Spectres moyens des clusters de la MEC (en bleu), la MPC (en rouge) et les chondrocytes (en vert) après prétraitement et normalisation par rapport à la région spectrale de 600 à 1800 <math>cm^{-1}</math></i>	115
34	<i>Histogramme des moyennes et écart-types calculés de l'épaisseur de la matrice péri-cellulaire (MPC). Données recueillies à 50 points sur 4 différentes images hyperspectrales mettant en évidence la MPC. Différence significative (<math>p &lt; 0,001</math>) entre les épaisseurs de la MPC dans les différentes zones</i>	118
35	<i>Images optiques Raman des cellules aux différents passages de P1 à P4</i>	132
36	<i>Caractérisation des principaux marqueurs du cartilage articulaire. (a, b, c) Caractérisation du rapport d'intensité de certaines bandes Raman choisies en raison de leurs spécificités moléculaires et leur capacité à fournir des informations biochimiques indispensables sur les changements conformationnels lors de la différenciation des chondrocytes. Variations significatives entre les différents échantillons. De façon particulière, les bandes localisées à 1063 <math>cm^{-1}</math> (attribution des GAG) et 1255 <math>cm^{-1}</math> (attribution du collagène de type II) présentent une intensité de signal Raman qui diminue progressivement pour les GAGs et le collagène de type II au fil des différents passages (P1, P2, P3 et P4), contrairement à celle de la bande à 1659 <math>cm^{-1}</math> (attribution du collagène de type I,) qui augmente plutôt avec les passages. (d) L'expression génique par qPCR des principaux gènes impliqués dans la chondrogenèse, notamment le collagène de type IIA et IIB, l'aggrécane (ACAN) et le collagène de type I (Col IA) et SOX9. Le test génique présente une régulation à la baisse des gènes du col IIA et IIB, ainsi que de l'ACAN, tandis les gènes du col IA et de SOX sont régulés à la hausse. Valeur de significativité a été déterminée pour <math>p &lt; 0,0</math></i>	135
37	<i>L'application de l'ACP-LDA. (a, b) vue de la représentation de l'ACP appliquée aux différents groupes A= P1, B= P2, C= P3 et D= P4. Les emplacements relatifs des signaux sur le tracé sont la résultante des concentrations relatives des biomolécules dans chaque échantillon. (a) application de l'ACP montrant la dispersion des différents spectres par passage, représentés par les points et constitués en grappes dans l'espace. Certains points se chevauchent démontrant les similitudes qui peuvent exister entre les différents passages. (b) Fusion des grappes P2 et P3 à cause des fortes similitudes entre ces milieux. (c, d) Application de la LDA par détermination des biens classés permet de mieux discriminer les différences entre les quatre (4) passages.</i>	136
38	<i>Différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) en chondrocytes. (A) rapport d'intensité des bandes Raman caractéristiques du cartilage articulaire, après 21 jours de culture. (B, C) expression génique (résultats des tests qPCR) des principaux marqueurs impliqués dans la chondrogenèse. Les gènes chondrogéniques</i>	137



	<i>sont fortement exprimés au décours de 21 jours de culture dans les hCSM supplémentées avec du TGF-<math>\beta</math>3, contrairement aux hCSM sans TGF-<math>\beta</math>3.</i>	
39	<i>Spectres moyens des différents des hCSM différenciées (en bleu) et non différenciées (en rouge) sans ou avec du TGF-<math>\beta</math>3.</i>	138
40	<i>Caractéristiques de la dérivée seconde des spectres moyens. (A) dérivée seconde dans la région de longueur d'onde de 600 – 1200 <math>cm^{-1}</math>; (B) dérivée seconde dans la région de longueur d'onde de 1200 – 1800 <math>cm^{-1}</math></i>	143
41	<i>Spectres moyens comparatifs entre les hCSM différenciées (en bleu) et le cartilage articulaire natif (en rouge)</i>	145
42	<i>Caractérisation du cartilage dégradé : (A) Détermination de la teneur en PGs par le rapport de la surface de la région glucidique [985 – 1185]/la région amide I [1601 - 1760]. L'histogramme présente un rapport d'intensité plus élevé en faveur du cartilage non dégradé (CA). Ce qui traduit une diminution du taux de PGs dans le cartilage dégradé. (B) Rapport d'intensité I1251/I1271 du cartilage dégradé et du cartilage non dégradé (Bonifacio A et al, 2010 ; Yasuhito et al, 2014). La figure 2 présente un rapport d'intensité entre les pics à 1251/1271 <math>cm^{-1}</math> plus élevé en faveur du cartilage dégradé, caractérisant une structure désordonnée de la protéine.</i>	154
43	<i>Analyse des composants principaux (ACP) et discrimination du cartilage dégradé du cartilage normal. (A) Tracé des scores ACP utilisant PC1 et PC2. Seule la composante principale (CP2) sépare les échantillons dégradé/normal ; (B) Graphique des scores ACP utilisant CP2 et CP3; (C) Spectres Raman moyens du cartilage dégradé et du cartilage normal (n=50 spectres); (D) Chargement CP2 des bandes Raman responsables de la séparation des échantillons de cartilage dégradé et normal.</i>	156
<b>N°</b>	<b>TABLEAUX</b>	<b>Page</b>
I	<i>Composition fractionnelle approximative du cartilage hyalin <sup>26</sup></i>	21
II	<i>Table des pics Raman du cartilage articulaire : Abréviations: (p) Protéine, (l) Lipide, (d) ADN / ARN, (A) Adénine, (T) Thymine, (G) Guanine, (C) Cytosine, (U) Uracile, (Phe) Phénylalanine, (Tyr) Tyrosine, (Trp) Tryptophane, (bk) Backbone, (Def) Deformation, (Tw) Twist, (Sym) Symmetric, (asym) Asymmetric et (Str) Stretching, (rand) Random (Bergholt et al, 2017 ; Matthiew et al,2010)</i>	69
III	<i>Table des assignations des pics et ou bandes Raman caractéristiques</i>	111
IV	<i>Tableau récapitulatif des pics caractéristiques des différents composants de la matrice cartilagineuse. En bleu, les pics essentiels de la MEC ; en rouge, ceux de la MPC et en vert, ceux des chondrocytes</i>	113
V	<i>Table des assignations des pics ou marqueurs caractéristiques identifiés au niveau de chaque région de la matrice du cartilage articulaire</i>	117
VI	<i>Images hyperspectrales reconstruites de la matrice de cartilage dans les zones superficielle (a), médiane (c) et profonde (e) après traitement k-means Clustering ; alignement des spectres Raman moyens isolés des clusters correspondant aux principaux composants de la matrice du cartilage (vert : chondrocyte, rouge : matrice péricellulaire et vert bleu : matrice territoriale (ou MEC) suivant les différentes zones superficielle (b),</i>	121

	<i>zone médiane (d), zone profonde (f). détermination de l'épaisseur de la matrice péri-cellulaire dépendante de la profondeur</i>	
VII	<i>Tableau récapitulatif des mesures AFM de la matrice du cartilage articulaire humain. (A, D, G) caractérisation des différentes régions de la matrice du cartilage lors des mesures AFM. (B, E, H) histogramme des valeurs du module de Young correspondant à chaque région, (C, F, I) Valeurs moyennes et les écart-types du module de Young</i>	124
VIII	<i>Détermination de la circularité des cellules suivant les passages (P1 à P4) à partir des images optiques collectées et traitées avec ImageJ®. Les changements peuvent être observés avec la diminution de la circularité (S) des cellules décroît au fil des passages. La circularité à P4 est plus faible par rapport aux autres passages (P1, P2 et P3). Les cellules à P4 présentent une morphologie plus grande avec un aspect plus allongé. Les cellules à P2 et P3 présentent sensiblement la même densité cellulaire, mais aussi la même morphologie et un aspect un peu moins allongé par rapport à P4. Abréviations : Count = Estimation nombre des cellules/boite ; Perim = Périmètre ; Cir = Circularité</i>	132
IX	<i>Table des assignations des pics et ou bandes Raman caractéristiques</i>	134
X	<i>Modes vibratoires et assignations des bandes Raman des spectres moyens transformés des hCSM supplémentées avec le TGFβ et les hCSM sans TGFβ</i>	144
XI	<i>Assignations et caractérisation biochimique des bandes Raman de différenciation entre les hCSM différenciées et le cartilage natif</i>	146
XII	<i>Table des assignations des pics ou bandes Raman majeur(e)s impliqué (e)s dans la caractérisation du cartilage articulaire dégradé vs cartilage non dégradé (normal)</i>	157