PolyPublie
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Modélisation du ligament croisé antérieur basée sur sa microstructure anatomique et les intéractions entre ses composantes biomacromoléculaires
Auteurs: Authors:	L'Hocine Yahia, Gilbert Drouin, & Pierre S. Thiry
Date:	1985
Type:	Rapport / Report
Référence: Citation:	Yahia, L., Drouin, G., & Thiry, P. S. (1985). Modélisation du ligament croisé antérieur basée sur sa microstructure anatomique et les intéractions entre ses composantes biomacromoléculaires. (Rapport technique n° EPM-RT-85-17). https://publications.polymtl.ca/9711/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/9711/
Version:	Version officielle de l'éditeur / Published version
Conditions d'utilisation: Terms of Use:	Tous droits réservés / All rights reserved

Document publié chez l'éditeur officiel
Document issued by the official publisher

Institution:	École Polytechnique de Montréal
Numéro de rapport: Report number:	EPM-RT-85-17
URL officiel: Official URL:	
Mention légale: Legal notice:	

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

BIBLIOTHÈQUE
DEC 3 1985
ÉCOLE POLYTECHNIQUE
MONTRÉAL

EMP/RT-85-17

MODELISATION DU LIGAMENT CROISE ANTERIEUR BASEE SUR SA MICROSTRUCTURE ANATOMIQUE ET LES INTERACTIONS ENTRE SES COMPOSANTES BIOMACROMOLECULAIRES

Hocine YAHIA, attaché de recherche
Gilbert DROUIN, professeur titulaire
Pierre S. THIRY, professeur agrégé

Groupe biomécanique/biomatériaux
Département de génie mécanique

Ecole Polytechnique de Montréal
Juin 1985

Ce rapport est une réimpression d'une thèse présentée à la Faculté des Etudes Supérieures de l'Université de Montréal, par Hocine YAHIA en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en décembre 1984, avec la permission de l'auteur.

Cette réimpression a été subventionnée par le programme d'aide aux publications scientifiques (FCAC) du Ministère de l'Education du Québec.

Dépôt légal, 2e trimestre 1985
Bibliothèque Nationale du Québec
Bibliothèque Nationale du Canada

Pour se procurer une copie de ce document, s'adresser au:

Service de l'édition
Ecole Polytechnique de Montréal
Case postale 6079, Succursale "A"
Montréal (Québec) H3C 3A7
(514) 340-4903

SOMMAIRE

Ce travail a été entrepris pour déterminer la microstructure des ligaments humains et canins du genou. C'est une première tentative visant à obtenir les propriétés morphologiques et architecturales nécessaires à une modélisation structurale de ces tissus.

Des techniques de préparation des tissus mous pour l'observation au microscope électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET) ont été mises au point. La méthode de séchage au point critique introduit un rétrécissement anisotrope du tissu et, par conséquent, une altération de sa morphologie. Il a donc fallu développer d'abord des procédures pour réduire ce phénomène de rétrécissement. Ensuite, une analyse morphométrique des unités structurales du collagène a été effectuée.

Des méthodes de digestion enzymatique furent également développées pour mettre en évidence l'arrangement et la micro-architecture du collagène.

Une technique d'injection-corrosion de polymère (méthode de Batson) a été utilisée pour étudier la micro-vascularisation des ligaments au MEB.

Enfin, une technique cytochimique utilisant des complexes enzyme-or a été développée pour localiser ultrastructuralement l'élastine.

Ces différentes techniques ont été mises au point en utilisant des ligaments canins, puis appliquées ensuite à l'étude des ligaments humains. Des ligaments croisés antérieurs (LCA) et des ligaments rotuliens (LR) provenant de vingt-sept chiens et de quinze cadavres humains ont été examinés.

Les résultats montrent que le collagène possède une organisation hiérarchique pour les deux types d'espèces et de ligaments étudiés.

Deux modèles structuraux (forme d'onde planaire et forme d'onde hélicoïdale) sont proposés pour décrire la morphologie et l'architecture des fibrilles de collagène. Ces modèles intègrent les principaux éléments des modèles existants, mais des détails nouveaux sont introduits pour tenir compte de la présente évidence microscopique. Ils contribuent à éclaircir certaines controverses signalées dans la littérature, notamment la forme de l'ondulation du collagène.

L'une des contributions originales de cette étude est la caractérisation quantitative de la microstructure des ligaments. Des paramètres morphométriques tels que le diamètre et l'aire de la section droite des unités de collagène, l'amplitude et la période d'ondulation, l'angle et le pas de l'hélice, ont été mesurés pour la première fois dans le cas des ligaments humains et canins du genou.

Les observations au MEB ont révélé l'existence de petits vaisseaux pénétrant transversalement dans le ligament. La méthode de Batson a permis de mettre en évidence des anastomoses entre ces vaisseaux transversaux et des vaisseaux endoligamentaires orientés dans l'axe longitudinal du LCA.

L'élastine est, pour la première fois à notre connaissance, localisée dans le LCA. Cette protéine est observée principalement dans la substance fondamentale située entre les fibres de collagène, et également autour des fibroblastes.

En se basant sur les résultats de cette étude et sur la relation structure-propriétés développée dans l'appendice A, une nouvelle approche, que l'on a appelé tissulographie, est proposée pour l'étude biomécanique des tissus conjonctifs mous. Certaines hypothèses utilisées dans la caractérisation des tissus mous sont discutées.

Enfin, des directions pour des recherches futures y sont également proposées.

Enzymatic digestion methods were developed to reveal the collagen arrangement and its micro-architecture. In order to study the ligamentous microvasculature, injection-corrosion casts were prepared using Batson's method, and observed with SEM. Finally, an enzyme-gold cytochemical technique was utilized in order to specifically localize the ligament elastin at the electron microscope level.

All these techniques were first developed in canine ligaments, and then applied to the study of human ligaments. Anterior cruciate ligaments (ACL) and patellar tendons (PT) dissected from twenty seven dogs and fifteen human cadavers were examined.

It was found that in both canine and human ligaments investigated, the collagen was arranged in a multistep structure.

On the basis of these observations, two structural models, a planar waveform model and a helical waveform model were suggested to describe the collagen fibril morphology and architecture. These models integrate the main elements of models previously suggested in the literature but new details were introduced in order to take into account the present microscopic evidence.

One of the original aspects of this work is the quantitative characterization of the ligament microstructure. Morphometric parameters, i.e. diameter and cross-sectional area of the collagenous entities, amplitude and period of the waviness, angle and pitch of the helix, were obtained for the first time, in both human and canine knee ligaments.

SEM observations showed small vessels penetrating the ligament transversally. Batson's method revealed that these small transverse vessels anastomose with a network

of endoligamentous vessels which are oriented in the longitudinal axis of the ACL.

Elastin was found to exist in localized regions of the ACL. This protein was found mainly in the ground substance lying between the collagen fibers, and in close relationship with the fibroblasts.

Based on the results of these studies, a new approach to the understanding of the structure - property relationships of soft connective tissues has evolved. This biomechanical approach has been termed "tissulography".

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude à la direction du département de génie mécanique et de l'Ecole Polytechnique pour m'avoir permis d'entreprendre ce travail. Plus particulièrement, j'adresse mes remerciements à mes deux directeurs de recherche, à savoir, le docteur G. Drouin, professeur titulaire, et le docteur P.S. Thiry, professeur agrégé, qui m'ont assuré un appui constant en plus de me faire profiter de leurs judicieux conseils. Je les remercie également pour m'avoir encouragé à participer à de nombreux congrès scientifiques qui ont beaucoup inspiré ce travail et complété ma formation.

Je désire aussi remercier les membres du groupe biomécanique-biomatériaux de l'Ecole Polytechnique qui, par leurs suggestions, encouragements et expertises ont rendu cette recherche possible.

Mes remerciements vont également vers les docteurs des sciences de la santé et de biologie, en l'occurence:

- Dr M. BENDAYAN, du département d'anatomie de l'Université de Montréal, pour m'avoir fourni les complexes enzyme-or,

- Dr S. GARZON et H. STRYKOWSKI, du département de microbiologie de l'Université de Montréal, pour m'avoir initié aux techniques de préparation des tissus biologiques pour la microscopie électronique,

- Dr G. DRAPEAU, du département de microbiologie de l'Université de Montréal, pour son aide pour la mise au point des techniques de digestion enzymatique,

- Dr L. THEOT, pour son aide lors de l'étude de la vascularisation,

- Dr P. Ranger, pour m'avoir fourni des spécimens cadavériques.

Je voudrais remercier les membres du département de métallurgie de l'Ecole Polytechnique pour m'avoir enseigné les techniques d'observation microscopique, en particulier:

- Mr J. Claudinon, pour la microscopie électronique à balayage,

- Mr G. Guérin, pour la microscopie électronique à transmission,

- Professeur J.M. Dorlot, pour ses judicieux conseils,

- Mr A. RIEL, pour son excellent travail de photographie et sa disponibilité.

Je tiens à remercier également les étudiants d'été qui ont contribué à cette recherche: A. Desjardins, C. Capistran et L. De Bargis.

Je remercie également Carole Meloche qui m'a initié à la dissection.

Que M. Duchesne et toute l'équipe du service pédagogique soient assurés de ma gratitude.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Linda Richard pour son excellent travail de dactylographie et ses suggestions.

TABLE DES MATIERES

	Page
Sommaire	iv
Summary	ix
Remerciements	xiii
Curriculum vitae	xx
Nomenclature	xxii
Liste des tableaux	xxv
Légende des figures	xxviii
Légendes et figures de l'appendice A	lii
CHAPITRE I - INTRODUCTION GENERALE	1
I.1 Généralités	1
I.2 Ligament croisé antérieur (LCA)	6
1.2.1 Fonction du LCA	6
1.2.2 Anatomie macroscopique du LCA - macrostructure	7
CHAPITRE II - REVUE DE LITTERATURE	15
II.1 Introduction	15
II.2 Composantes macromoléculaires des ligaments	16
II.2.1 Collagène	22
II.2.2 Elastine et protéine micro-fibrillaire	43
II.2.3 Les protéoglycannes et leurs constituants glycosaminoglycannes	68
II.2.4 Les autres constituants	79

II.3 Interactions des composantes structurales. 80

II.3.1 Liaisons du collagène 83
II.3.2 Interactions 89

CHAPITRE III - OBJECTIFS DE L'ETUDE 98

III.1 Définition de la problématique 98
III.2 Objectifs de l'étude 103

CHAPITRE IV - MATERIELS ET METHODES 106

IV.1 Structure du collagène 106

IV.1.1 Acquisition des spécimens 106
IV.1.2 Préparation des spécimens pour la microscopie électronique à balayage (MEB) 111
IV.1.3 Préparation des spécimens pour la microscopie électronique à transmission (MET) 131
IV.1.4 Méthodes d'observation et d'analyse 131

IV.2 Localisation de l'élastine pour la technique enzyme-or 133

IV.2.1 Description de la technique 133

CHAPITRE V - RESULTATS 149

V.1 Structure du collagène 149

V.1.1 Organisation hiérarchique 149
V.1.2 Morphologie des différentes unités structurales du collagène 156
V.1.3 Fibrilles transversales 201
V.1.4 Interprétation 206
V.1.5 Microscopie quantitative 214
V.1.6 Discussion 232

V.2 Localisation ultrastructurale de l'élastine 243

V.2.1 Ligament canin 243
V.2.2 Aorte canine (contrôle) 248
V.2.3 Ligament humain 254

V.2.4 Discussion 254

V.3 Vascularisation du LCA 262

V.3.1 Introduction 262
V.3.2 Résultats 264
V.3.3 Discussion 266

CHAPITRE VI - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ... 272

VI.1 Biomécanique des tissus mous 273
VI.2 Relation structure - propriétés: tissulographie 277
VI.3 Perspectives 284

CHAPITRE VII - CONCLUSIONS 292

BIBLIOGRAPHIE 294

APPENDICE A - RELATIONS STRUCTURE - PROPRIETES DES LIGAMENTS ET DES TENDONS 312

APPENDICE B - PREPARATION DES SOLUTIONS DE FIXATION . 393

APPENDICE C - PREPARATION DES COUPES MINCES POUR LA MET 395

CURRICULUM VITAE

Né le 6 juin 1952 à Tizi-Reniff, Grande Kabylie, Algérie.

1972-74: DUT génie mécanique - Montluçon - France
1974-77: Ingéniorat en véhicules terrestres - Orléans - France
1977-80: Doctorat de 3ième cycle en Biomécanique - Compiègne - France
1981-84: Ph.D. - Ecole Polytechnique de Montréal - Québec - Canada

YAHIA, H., DESJARDINS, A., THIRY, P.S., DROUIN, G., "Microstructural Investigation of the Canine Anterior Cruciate Ligament", 3rd Int., Conf., on Mechanics in Medicine and Biology, Compiègne, july 10-13, France, 1982.

YAHIA, H., THIRY, P.S., DROUIN, G., "The Collagen Fiber of the Anterior Cruciate Ligament: Influence of the Preparation Procedure on its Microstructure", 3rd Annual Meeting, the Canadian Biomaterials Society, Toronto, 1982.

YAHIA, H., THIRY, P.S., DROUIN, G., "Microstructure of Anterior Cruciate Ligament as a Biocomposite: Collagen-Elastin Arrangements", 170e European Mechanics Colloquium Caserta, 19-24 april, Italy, 1983.

YAHIA, H., THIRY, P.S., DROUIN, G., "Localization of Elastin in Canine Anterior Cruciate Ligament by Enzyme-Gold Complexes", 9th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, p. 57, Birmingham, Alabama, 1983.

YAHIA, H., THIRY, P.S., DROUIN, G., "Structure fine et arrangement du collagène dans les ligaments croisés antérieurs et rotuliens humains", 4th Annual Meeting Canadian Biomaterials Society, pp. 42.1-42.4, Québec, 1983.

YAHIA, H., DROUIN, G., BOBYN, D., "Microscopical Characterization of Knee Ligaments: Human and Canine Studies", Second World Congress on Biomaterials, vol. VII, p. 269, 1984.

YAHIA, H., LAMONTAGNE, M., DORE, R., RIVARD, C.H., "The Biological Effects of Strain Gage Implantation on Canine Tendons", 4th ICMB, pp. 13-16, Buffalo, 1984.

LAMONTAGNE, M., DORE, R., YAHIA, H., DORLOT, J.M., "Mechanical Properties (In Vitro) of Human Patellar and Quadriceps Tendons Measured by Mercury Strain Gages", 4th ICMB, Buffalo, pp. 17-20, 1984.

YAHIA, H., DROUIN, G., "Microscopical Characterization of Ligaments", 37th ACEMB, Los Angeles, 1984.

YAHIA, H., DROUIN, G., "Morphological Properties of Knee Ligament Collagen", Bioengineering Symposium, ASME Winter Annual Meeting, New Orleans, 1984.

YAHIA, H., THIRY, P.S., "Structure et propriétés des tendons et des ligaments", à paraître dans Matériaux-mécanique et chirurgie orthopédique, édité par Dorlot, J.M., Christel, P., Meunier, A.

NOMENCLATURE

a: Amplitude d'ondulation du collagène.

AH: Acide hyaluronique

CO_2: Dioxyde de carbone

CS-4: Chondroïtine 4-sulfate

CS-6: Chondroïtine 6-sulfate

Dc: Densité critique

DHLNL: Déhydro-hydroxylysinonorleucine

DES: Desmosines

DS: Dermatane sulfate

GA: Glutaraldéhyde

GAG-s: Glycosaminoglycannes

GLY: Glycine

h: Demi-pas apparent de l'hélice

H: Héparine

HHMD: Histidino-hydroxymérodesmosine

HLNL: Hydroxylysinonorleucine

HLONL: Hydroxylysino-5-kéto-norleucine

HS: Héparine sulfate

HYP: Hydroxyproline

ISOD: Isodesmosines

KOH: Hydroxyde de potassium

KS: Kératane sulfate

LCA: Ligament croisé antérieur

LCP: Ligament croisé postérieur

LR: Ligament rotulien

MEB: Microscopie électronique à balayage

MET: Microscopie électronique à transmission

MO: Microscopie optique

Pc: Pression critique

O_sO_4: Tétroxyde d'osmium

PBS: Phosphate buffer solution (tampon phosphate)

PEG: Polyéthylène glycol

PG-s: Protéoglycannes

PRO: Proline

PTA: Acide phosphotungstique

ra: Rétrécissement axial du tissu durant le séchage au point critique

rt: Rétrécissement transversal du tissu durant le séchage au point critique

SPC: Séchage au point critique

Tc: Température critique:

TQR: Tendon de la queue de rat

p: Période d'ondulation du collagène

α: Angle d'inclinaison de la dépression par rapport à l'axe longitudinal du fascicule

θ: Angle d'hélice

LISTE DES TABLEAUX

II.1: Composition biochimique des tissus biologiques mous.

II.2: Paramètres de l'ondulation du collagène des tendons et des ligaments.

II.3: Composition en acides aminés du collagène, de l'élastine, de la tropoélastine et de la protéine microfibrillaire [GAY et MILLER, 1978; UITTO, 1979; GUAY et LAMY, 1980].

II.4: Structure de l'élastine du ligamentum nuchae.

II.5: Structure de l'élastine aortique.

II.6: Diamètre des microfibrilles dans différentes espèces [CLEARY et coll., 1981].

II.7: Variation avec l'âge du diamètre des microfibrilles de l'aorte de mouton [CLEARY et coll., 1981].

IV.1: Caractéristiques des chiens utilisés.

IV.2: Caractéristiques des donneurs.

IV.3: Propriétés critiques du dioxyde de carbone et de l'eau.

IV.4: Identification des spécimens.

V.1: Rétrécissement linéaire des spécimens.

V.2: Diamètre des unités de collagène.

V.3: Aire de la section droite des unités supérieures de la hiérarchie du collagène.

V.4: Période de l'ondulation planaire de surface (p), et largeur des unités ondulées de collagène (l).

V.5: Paramètres de l'ondulation planaire des fibrilles internes, et largeur des unités ondulées.

V.6: Paramètres de l'ondulation hélicoïdale de surface.

V.7: Paramètres de l'ondulation des fibrilles centrales et périphériques.

LEGENDE DES FIGURES

Figure I.1: Surface médiale du condyle latéral droit montrant les dimensions moyennes de l'attache fémorale du LCA [GIRGIS et coll., 1975].

Figure I.2: Vue de la surface postérieure du tibia (A) et de la surface supérieure du plateau tibial [GIRGIS et coll., 1975].

Figure I.3: Représentation schématique des deux bandes du LCA [FARQUHARSON-ROBERT et coll., 1983].

Figure I.4: Schéma illustrant les changements de forme et de tension du LCA en extension et en flexion [GIRGIS et coll., 1975].

Figure II.1: Conformation des chaînes polypeptidiques dans la molécule à 3 brins de tropocollagène. Chaque chaîne est une hélice ayant des séquences Gly-X-Y répétées [LEHNINGER, 1981].

Figure II.2: Disposition des molécules de tropocollagène, responsables de la périodicité de 70 nm des fibrilles [LEHNINGER, 1981].

Figure II.3: Structure moléculaire de l'élastine:

(a) Modèle de chaîne aléatoire où les liaisons de l'élastomère sont irrégulières.

(b) Modèle dit "Oiled Coil" qui suppose l'existence de zones rigides (contenant des liaisons DES et ISOD) séparées par des zones flexibles.

(c) Modèle fibrillaire, constitué de segments d'hélice-α alternant avec des segments de spirale-β, donnant une apparence de tige torsadée.

(d) Modèle corpusculaire ou "de goutelette liquide", dans lequel les sous-unités de tropoélastine ont une configuration globulaire, et une région hydrophobe (à l'intérieur) et hydrophile (en surface) [SANDBERG, 1976].

Figure II.4: Histogramme montrant le pourcentage de distribution des diamètres de fibrilles de la lamelle élastique de l'aorte [CLIFF, 1971].

Figure II.5: Distribution des diamètres microfibrillaires de la lamelle élastique interne de l'aorte thoracique de 4 espèces [FANNING et coll., 1981].

Figure II.6: Motif disaccharidique de l'acide hyaluronique [LEHNINGER, 1981].

Figure II.7: Structure des protéoglycannes du cartilage [LAURENT, 1978].

Figure II.8: Diagramme à l'échelle illustrant les formes et les dimensions relatives du collagène et des PG-s [BUCKWALTER, 1983].

Figure II.9: Diagramme (non à l'échelle) montrant les principales caractéristiques de l'arrangement collagène-PG-s du tendon. D indique la période de striation de la fibrille de collagène. Les lignes discontinues représentent les chaînes GAG-s, et les fibres continues les noyaux de PG-s [SCOTT, 1980].

Figure II.10: Liaisons établies et probables dans la région des télopeptides [VIIDIK, 1979].

Figure II.11: Structures chimiques des liaisons réductibles [LIGHT et BAILEY, 1980].

Figure II.12: Liaisons trouvées en proportion diverses dans du collagène de différents tissus. Les acides aminés qui donnent naissance à ces liaisons, principalement la lysine et les aldéhydes dérivés de la lysine, et l'histidine sont encadrés sur la figure [NIMNI, 1980].

Figure IV.1: Diagramme de l'appareil de SPC [COLEMAN, 1975].

Figure IV.2: Diagramme de phase du dioxyde de carbone montrant le point critique [COLEMAN, 1975].

Figure IV.3: Photographie de l'appareil de séchage au point critique.

Figure IV.4: Mesure du rétrécissement axial et transversal.

Figure IV.5: Montage de mesure du rétrécissement.

Figure IV.6: Technique enzyme-or. Les molécules d'élastase entourant la particule d'or interagissent avec leur substrat correspondant présent à la surface de la section du tissu.

Figure V.1: Fibrilles de collagène Type I du LCA (MET). (A) Arrangement parallèle des fibrilles de LCA canin. (B) A plus fort grossissement, on distingue la striation caractéristique des fibrilles du LCA humain.

Figure V.2: Fibrilles de collagène Type I du LCA humain (MEB). (A) Au MEB, même à fort grossissement, la striation caractéristique n'est pas visible. (B) Fibrilles et sub-fibrilles du LCA.

Figure V.3: Fibres de collagène Type I du LCA canin. (A) Fibres parallèles à l'axe longitudinal du ligament. (B) et (C) Fibrilles disposées en parallèle pour former une fibre.

Figure V.4: Fibres de collagène Type I du LCA humain. (A) et (B) Fibres arrangées parallèlement à l'axe longitudinal du ligament. Les fibrilles constitutives présentent un arrangement tridimensionnel.

Figure V.5: Section longitudinale du ligament rotulien humain (77 ans). (A) On observe les différentes unités de l'organisation hiérarchique du collagène. La flèche indique

un fascicule. (B) et (C) A plus fort grossissement, on distingue les fibrilles du fascicule.

Figure V.6: Gaines de morphologie ondulée entourant le ligament. (A) Péritendineum du LR humain. (B) Péritendineum du LCA humain.

Figure V.7: Forme de la section droite des fibrilles du LCA humain. (A) Section droite circulaire. (B) A plus fort grossissement, les sub-fibrilles ont également une section droite circulaire.

Figure V.8: Section transversale du LCA humain. (A) Section au niveau médial montrant une hétérogenéité anatomo-topographique du ligament: une région riche en collagène (antérieure) et une autre en substance fondamentale (postérieure). (B) et (C) Section droite elliptique des fibres.

Figure V.9: Section transversale du LCA humain montrant la région antéro-médiale dense en collagène. Les fascicules ont une forme allongée dans la direction radiale.

Figure V.10: Section transversale des fascicules (A) et des sous-fascicules (B) du LCA humain. Ces unités ont une forme allongée, avec une longueur projetée, dans la direction radiale, de l'ordre de 1 400 µm.

Figure V.11: Forme de la section droite des fascicules et des sous-fascicules du LCA canin: triangulaire (A) et elliptique (B).

Figure V.12: Section droite des fascicules du LCA canin. (A) Forme régulière des sous-fascicules. (B) Epitendineum entourant un fascicule.

Figure V.13: Section transversale du LCA canin. Au niveau tibial, la section est homogène et contient moins de substance fondamentale. On observe le péritendineum entourant le ligament.

Figure V.14: Section transversale des fascicules et des sous-fascicules du LR humain. On remarque que l'épaisseur de l'épitendineum et de l'endotendineum est plus importante que celle des gaines du LCA.

Figure V.15: Fascicules du LR humain. (A) et (B) Forme des sous-fascicules est également allongée dans la direction radiale.

Figure V.17: Coupe transversale du LR humain. La section droite n'est pas homogène: une région dense en collagène A (antérieure) et une autre composée de substance fondamentale B (postérieure).

Figure V.18: Section droite du LR canin. On distingue clairement les fascicules, de forme à peu près circulaire, entourés d'un épais épitendineum.

Figure V.19: Fascicule du LR canin. Les sous-fascicules, de forme aléatoire, sont séparés par un endotendineum très mince.

Figure V.20: Ondulation sporadique des fibres de collagène du LCA canin. Dans certaines régions, l'onde se raidit; dans d'autres, elle s'aplatit.

Figure V.21: (A) et (B) Ondulation sporadique des fibres de collagène du LCA humain.

Figure V.22: Idem que la figure V.21. L'ondulation sporadique persiste à travers l'épaisseur entière des fibres.

Figure V.23: (A) Ondulation périodique à la surface des fascicules du LR humain. (B) A plus fort grossissement, le fascicule ondulé est formé de trois sous-fascicules qui ondulent en phase.

Figure V.24: (A) Ondulation périodique de plusieurs fascicules adjacents du LCA humain. (B) La morphologie ondulée semble être due à un affaissement périodique de la surface des fascicules.

Figure V.25: Ondulation périodique d'un fascicule du LR humain. L'ondulation est planaire, c'est-à-dire les maxima et minima des fibrilles adjacentes du fascicule sont alignés perpendiculairement à l'axe du fascicule.

Figure V.26: Ondulation planaire d'un fascicule du LCA canin. Les fibrilles constitutives ondulent dans un plan.

Figure V.27: (A) et (B) Sections longitudinales de fascicules ondulés du LR humain. L'amplitude d'ondulation décroît de la périphérie vers le centre du fascicule.

Figure V.28: Ondulation planaire de fascicules du LCA canin. (A) Fibrilles périphériques ondulées. (B) Fibrilles centrales droites.

Figure V.29: Ondulation des fibrilles périphériques du LCA canin. Après digestion enzymatique (élastase & hyaluronidase), l'ondulation planaire est mise en évidence sur les fibrilles périphériques.

Figure V.30: Ondulation hélicoïdale de fascicules du LR humain. (A) La morphologie du fascicule ressemble à celle d'un câble. (B) Un retrait enzymatique de l'épitendineum révèle la trajectoire en hélice ondulée des fibrilles périphériques.

Figure V.31: Sens de l'hélice dans le LCA humain. (A) Fibrilles en hélice à gauche. (B) Fibrilles en hélice à droite.

Figure V.32: Ondulation hélicoïdale de fascicules du LCA canin. (A) et (B) L'hélice peut être à gauche ou à droite.

Figure V.33: (A) et (B) Arrangement en hélice à gauche des fibrilles du LR canin. (C) Ou en hélice à droite.

Figure V.34: (A) et (B) Fibrilles centrales d'un fascicule du LR humain. Leur direction oblique par rapport à l'axe du fascicule suggère un arrangement en hélice.

Figure V.35: (A) Fascicule non ondulé du LR humain. (B) A plus fort grossissement, la surface du fascicule apparaît très lisse.

Figure V.36: Section longitudinale d'un LCA humain montrant des fascicules coupés suggérant un arrangement hélicoïdal.

Figure V.37: Fibrilles transversales du LCA humain. (A) Les fibres longitudinales de collagène Type I sont reliées par des fibrilles transversales. (B) Fort grossissement montrant le site d'ancrage de ces fibrilles de liaison.

Figure V.38: Fibrilles transversales du LCA humain. (A) et (B) Les sous-fascicules également sont reliés par des fibrilles transversales.

Figure V.39: A plus fort grossissement (X 40.000), ces fibrilles transversales ne présentent pas de striation au MEB.

Figure V.40: Digestion enzymatique des fibrilles de liaison du LCA humain. (A) et (B) montrent que ces fibrilles résistent à un traitement à l'élastase et à l'hyaluronidase.

Figure V.41: Idem que V.40. (A) Fibrilles de LCA canin. (B) Fibrilles de LR canin.

Figure V.42: Organisation hiérarchique du collagène des ligaments du niveau fibrillaire au niveau macroscopique.

Figure V.43: Modèle_I: Ondulation planaire. (A) Fibrilles parallèles à l'axe longitudinal du fascicule. (B) Coupe longitudinale montrant l'ondulation décroissante des fibrilles.

Figure V.44: Modèle_II: Ondulation hélicoïdale. (A) Fibrilles disposées en hélice ondulée. Les paramètres de l'ondulation hélicoïdale sont définis sur cette figure. (B) Fibrilles périphériques en hélice ondulée, et fibrilles centrales en hélice droite.

Figure V.45: Diamètre en fonction de l'âge des unités cylindriques du collagène de LCA humain.

Figure V.46: Diamètre en fonction de l'âge des unités structurales du collagène de LR humain.

Figure V.47: Localisation ultrastructurale de l'élastine du LCA canin. Après 5 minutes d'incubation dans le complexe élastase-or, un marquage intense de l'élastine apparait autour de la fibre de collagène de diamètre 2,8 µm. On n'observe que très peu de particules d'or (marqueurs) sur les fibrilles constitutives d'apparence striées et de diamètre d'environ 100 nm (X 20520).

Figure V.48: Après 5 minutes d'incubation dans le complexe, les fibrilles striées de collagène du LCA canin ne sont pas marquées (X 33000).

Figure V.49: LCA canin, 5 minutes d'incubation. On observe seulement quelques particules (un faible bruit de fond) sur le faisceau de fibrilles de collagène, alors que le matériel élastique est intensément marqué (X 33000).

Figure V.50: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Un marquage intense (E) apparait entre les fibres de collagène. Les flèches indiquent des microfibrilles de 12 nm de diamètre, et qui ne réagissent pas avec le complexe (X 26000).

Figure V.51: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Les marqueurs d'or, donc l'élastine amorphe (E), sont principalement localisés entre les fibres de collagène (X 26000).

Figure V.52: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Fibrilles de collagène en coupe transversale ne réagissant pas avec le complexe. Les microfibrilles (flèches) ne sont pas marquées (X 26000).

Figure V.53: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Le reticulum endoplasmique (ER) du fibroblaste "au repos" n'est pas marqué, de même que les microfibrilles (flèches) (X 16000).

Figure V.54: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Le fibroblaste n'est pas marqué alors que la substance fondamentale autour est intensément marquée (X 16000).

Figure V.55: LCA canin, 7 minutes d'incubation. Le fibroblaste actif (N), les fibrilles de collagène fraîchement synthétisées (flèches pleines), et les microfibrilles (flèches claires) ne réagissent pas au complexe (X 12540).

Figure V.56: Aorte canine (contrôle), 7 minutes d'incubation. La membrane élastique (EL) de la média est intensément marquée avec des particules d'or. Seul un faible bruit de

fond apparaît sur le noyau (N) des cellules du muscle lisse (X 3876).

Figure V.57: Aorte canine, 30 minutes d'incubation. Marquage intense et spécifique de l'élastica interna, et absence de particules sur l'endothelium (ED) et sur le muscle lisse (SM) (X 13000).

Figure V.58: Aorte canine, 5 minutes d'incubation. Idem que la figure V.57 (X 10000).

Figure V.59: LCA humain, 7 minutes d'incubation. Les particules d'or sont localisées spécifiquement dans des plages claires du tissu. Manque de contraste des structures environnantes.

Figure V.60: Aorte canine, 7 minutes d'incubation. Le tissu de contrôle montre le spécificité du complexe utilisé pour le marquage du LCA humain.

Figure V.61: LCA canin. Coupe longitudinale montrant l'arrangement des fibroblastes dans la portion centrale du ligament (méthode de coloration hemalum phoxin-safran et Van Gieson).

Figure V.62: LCA canin (idem que V.61). On remarque l'arrangement des fibroblastes dans l'espace inter-fasciculaire.

Figure V.63: Vascularisation du LCA canin.
(A) Ensemble de vaisseaux sanguins transversaux (région postérieure du LCA).
(B) Plus fort grossissement d'un vaisseau transversal de diamètre extérieure d'environ 30 µm.

Figure V.64: Méthode de Batson.

(A) Vaisseau endoligamentaire, de 80 µm de diamètre, orienté longitudinalement.

(B) Vaisseaux endoligamentaires, de 130 à 160 µm, disposés longitudinalement et s'anastomosant avec de petits vaisseaux transversaux d'environ 20 µm.

Figure V.65: Méthode de Batson.

(A) Arbre vasculaire endoligamentaire mettant en évidence les anastomoses entre les vaisseaux longitudinaux et transversaux.

(B) Anastomose de petits vaisseaux (Ø = 18 40 µm).

Figure V.66: Méthode de Batson.

(A) Artériole de 160 µm de diamètre présentant des dépressions de surface.

(B) Artère coupée de 80 µm avec également des dépressions à la surface latérale.

LEGENDES ET FIGURES DE L'APPENDICE A

Figure A-1: Courbe force-allongement du LCA canin. Les points clairs indiquent la force de rupture de spécimens testés à la rupture, et la zone grise représente le domaine élastique [DORLOT et coll., 1980].

Figure A-2: Courbe contrainte-déformation normalisée pour le collagène. Cette courbe fournit les paramètres mécaniques (du matériau) qui sont indépendants des dimensions du tissu [BUTLER et coll., 1978].

Figure A-3: Courbes de relaxation et de fluage.

(a) Expériences de relaxation de contrainte (à un niveau de déformation constant) où α = 100% est le niveau de contrainte au début de la relaxation, et qui est d'environ 1/3 de la contrainte maximale. Les cycles 1, 2, et n (= phase stationnaire) y sont représentés.

(b) Expériences de fluage (à un niveau de contrainte constant, et d'environ 1/3 de la contrainte maximale), où ϵ = 100% est le niveau de déformation au début du fluage. Les cycles 1, 2, et n (= phase stationnaire) y sont représentés [VIIDIK, 1980].

Figure A-4: Influence de la vitesse de déformation sur la courbe contrainte-déformation du tendon d'Achille humain [ABRAHAMS, 1967].

Figure A-5: Comparaison d'un essai quasi-statique et d'un essai d'impact sur la courbe force-allongement d'un ligament collatéral [YOTSUZUKA et coll., 1982].

Figure A-6: Enregistrement force-allongement d'un TQR montrant un allongement progressif (0.072 cycles/min) [ELLIS (1970), cité par GOLDSTEIN, 1981].

Figure A-7: Cycles successifs sur le même spécimen non préconditionné au préalable [VIIDIK, 1980].

Figure A-8: Courbes force-déformation de ligaments collatéraux de genous de lapin. La courbe en trait plein est celle du ligament de contrôle, l'autre est celle du ligament immobilisé [AMIEL et coll., 1982].

Figure A-9:

(a) Courbes contrainte-déformation des ligaments collatéraux de contrôle et immobilisés (genou de lapin).

(b) Courbes contrainte-déformation de tendons extenseurs de porc après un entraînement de 3 et 12 mois [WOO et coll., 1982].

Figure A-10: Comparaison des valeurs ultimes de la contrainte et de la déformation des tendons extenseurs de porc [WOO et coll., 1982].

Figure A-11: Courbe non-linéaire représentant les réponses homéostatiques des tissus biologiques mous, et qui dépend du mouvement et de la contrainte [WOO, 1982].

Figure A-12:

(a) Evolution avec l'âge des paramètres mécaniques des TQRs.

(b) Evolution avec l'âge des paramètres biochimiques des TQRs [VOGEL, 1978].

Figure A-13: Structure chimiques des liaisons stables du collagène:

(a) Hydroxy-aldol-histidine.

(b) Pyridinoline [LIGHT et BAILEY, 1980].

Figure A-14: Comportement contrainte-déformation du TQR comme une fonction de l'âge [BETSCH et coll., 1980].

Figure A-15:

(a) Courbes force-déformation du ligament croisé postérieur de rat. Le ligament de contrôle a subit une injection de solution de saline, et le ligament traité a subit une injection de 20 mg de cortisol/kg.

(b) Diagrammes "contrainte"-déformation des tendons du péroné de lapin. La "contrainte" est calculée comme une force par mg de collagène par mm de longueur du spécimen (UC) [OXLUND et coll., 1981].

Figure A-16:

(a) Courbe force-déformation

(b) Courbe "contrainte"-déformation du tendon du péroné. Les barres verticales indiquent l'écart-type [OXLUND et coll., 1982].

Figure A-17: Comportement contrainte-déformation du TQR en fonction de la teneur en eau du tissu [BETSCH et BAER, 1980].

Figure A-18:

(a) Comportement contrainte-déformation du ligament de la nuque bovin, avant et après élastase [GIBSON, 1973; cité par HOFFMAN, 1980].

(b) Courbe force-allongement avant et après élastase, du tendon de l'aile de volaille [OAKES et BIALKOWER, 1977].

(c) Courbe contrainte-rapport d'allongement avant et après élastase, du tendon de la patte arrière de chien [MISSIRILIS, 1977].

(d) Courbe "contrainte"-déformation du TQR après incubation dans un tampon (B); du hyaluronidase (H), Sigma, 100 U/ml, 6 heures, à pH.05.4 37°C; et du hyaluronidase suivi de chondroïtinase ABC. La "contrainte" est exprimée en Newton par mg de collagène par mm de longueur de spécimen [VIIDIK, 1982].

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

1.1 Généralités

Les ligaments articulaires ont pour fonction d'assurer la stabilité et de guider le mouvement des articulations. Ils jouent également un rôle essentiel dans le contrôle du mouvement et de la posture.

La stabilité fonctionnelle du genou, par exemple, est assurée par les contraintes passives des ligaments, la géométrie de l'articulation et les contraintes actives générées par les muscles [NOYES et coll., 1980].

La fonction du tendon est de relier le muscle à l'os ou au fascia et de permettre ainsi le transfert des forces musculaires vers la partie mobile de l'articulation. Les

tendons joueraient également un rôle d'amplificateur dynamique durant une contraction musculaire rapide, de réservoir d'énergie élastique et d'atténuateur de force (fonction protectrice) durant un mouvement rapide et brusque [EVANS et coll., 1975, CANOSO, 1981].

D'autres propriétés additionnelles proviennent des arrangements anatomiques spécifiques des tendons et des ligaments individuels. Par exemple, les ligaments croisés du genou sont importants aussi bien dans les mouvements antéro-postérieur, latéro-médial et de rotation, que lors d'une hyper-flexion ou une hyper-extension. Le glissement vers l'avant du tibia sur le fémur est contrôlé par le ligament croisé antérieur (LCA) et vers l'arrière par le ligament croisé postérieur (LCP) [PIZIALI et coll., 1980]. Le principal rôle du LCA est de résister au déplacement antérieur du tibia sur le fémur.

La tension générée dans plusieurs muscles peut être concentrée en une seule, au niveau de l'insertion osseuse, comme dans le tendon calcanéen. Inversement, l'action d'un

seul muscle peut être répartie sur un certain nombre d'os, comme dans le cas des insertions distales du jambier postérieur [CANOSO, 1981].

En dépit de nombreux travaux, la fonction biomécanique individuelle de différents ligaments et tendons, tels que le LCA, n'est pas encore déterminée. La compréhension de la fonction de ces tissus conjonctifs nécessite, au préalable, non seulement une connaissance détaillée de leur anatomie macroscopique mais aussi de leur micro-anatomie.

La relation entre la structure et la fonction d'un tissu biologique n'est rien d'autre qu'une question de relation entre la structure et les propriétés mécaniques.

Du point de vue structurale, les ligaments et les tendons sont constitués principalement de fibres de collagène. Ainsi, divers études utilisant une approche macroscopique, considèrent ces tissus collagéniques comme

étant des matériaux homogènes [BINGHAM et DEHOFF, 1979; DORLOT et coll., 1980].

Les propriétés biomécaniques d'un tissu sont connues si son équation constitutive est connue. De plus, la biorhéologie étant fondamentalement une science expérimentale [FUNG 1981], l'équation constitutive d'un matériau peut seulement être déterminée par des expériences. C'est ainsi que les propriétés des tendons et les ligaments ont été caractérisées par des essais de tension uniaxiale [ALM et coll. 1974 (b); NOYES et coll., 1974 (a) et(b), 1976; DORLOT et coll., 1980]. En dépit de nombreuses difficultés expérimentales, cette approche macroscopique a permis de caractériser in vitro les propriétés mécaniques de certains tissus. Toutefois, la relation propriétés mécaniques - structure reste obscure. La modélisation mathématique considérant les ligaments et les tendons comme des matériaux homogènes ne permettent pas d'éclaircir cette relation [HAUT et LITTLE, 1969, 1972; JENKINS et LITTLE, 1974; BINGHAM et DOHOFF, 1979]. Certains modèles rhéologiques, bien que décrivant assez bien les propriétés

observées in vitro, ne permettent pas de comprendre les mécanismes physiques et de relier les propriétés du tissu à sa structure [FRISEN et coll., 1969; VIIDIK, 1979 (b) et 1980 (b)].

Des modèles structuraux ont également été proposés [COMNINOU et YANNAS, 1976; LANIR, 1978 et 1980; THIRY et coll., 1981 (a) et (b); KASTELIC et coll., 1980; DEMIRAY, 1981]. Toutefois, faute d'une connaissance détaillée, la structure a souvent été "idéalisée".

Ces considérations montrent que tout progrès dans la caractérisation des ligaments et des tendons, ainsi que des autres tissus mous, passe par l'étude de leur structure du niveau microscopique au niveau macroscopique. C'est la raison pour laquelle, l'emphase mise dans la présente étude concerne l'élucidation de la morphologie, de la micro-architecture et des interactions entre les constituants biochimiques du tissu. Nous verrons que son

comportement biomécanique en dépend, et que l'approche macroscopique est insuffisante car elle est trop limitée.

1.2 Ligament croisé antérieur (LCA)

1.2.1 Fonction du LCA

La fonction du LCA n'est pas seulement de restreindre les mouvements antérieurs et les rotations du tibia sur le fémur. Son rôle est aussi de guider le genou lors de son mouvement héloicoïdal [LARSON, 1983]. En agissant ainsi, le LCA permet aux autres ligaments de l'articulation de s'étendre et de protéger ainsi le ménisque des contraintes excessives.

Le LCA est le stabilisateur principal d'un déplacement antérieur excessif du tibia et le principal rêne de guidage pour un mouvement propre du genou. Son absence est souvent associée à une instabilité antérolatérale produisant une incapacité fonctionnelle.

1.2.2 Anatomie macroscopique du LCA - macrostructure

La structure anatomique du LCA est relativement bien connue [KENNEDY et coll., 1974; GIRGIS et coll., 1975; ARNOCZKY et coll., 1977].

Le LCA est attaché au fémur sur la partie postérieure de la surface médiale du condyle latéral. L'attache fémorale à une forme en demi-lune, avec un côté antérieur droit et un côté postérieur convexe (figure I.1).

L'autre extrémité du LCA s'attache en face de l'éminence antérieure du plateau tibial (figure I.2). Près de cette attache tibiale, le LCA passe sous le ligament méniscal transversal, et certains fascicules rejoignent l'attache antérieure du ménisque latéral. Parfois, des fascicules de la partie postérieure de l'attache tibiale du LCA joignent l'attache postérieure du ménisque latéral [ARNOCZKY, 1983].

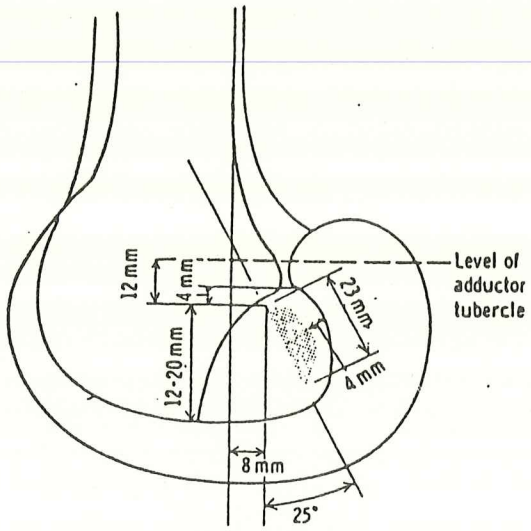


Figure I.1 Surface médiale du condyle latéral droit montrant les dimensions moyennes de l'attache fémorale du LCA. (GIRGIS et coll. 1975).

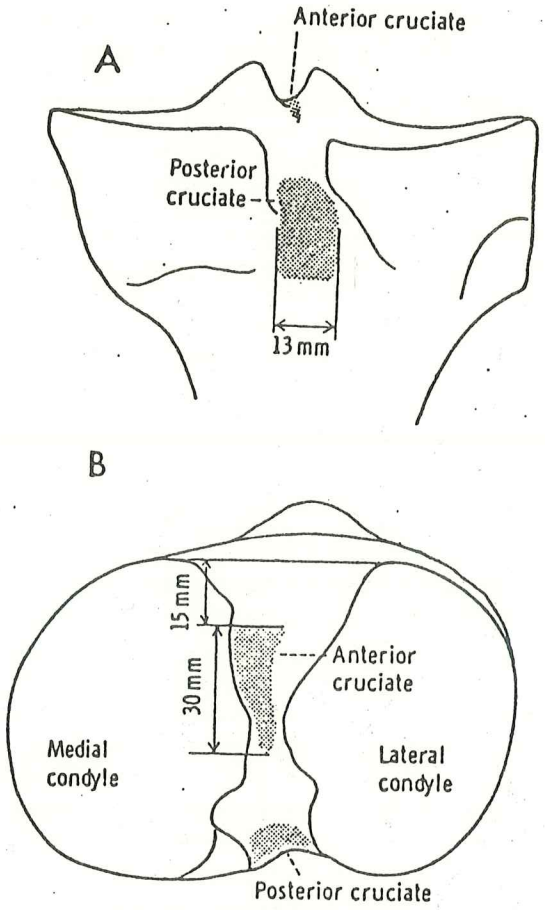


Figure I.2 Vue de la surface postérieure du tibia (A), et de la surface supérieure du plateau tibial. (GIRGIS et coll. 1975).

L'insertion tibiale, mesurant environ 30 mm de long, est plus grande que l'attache fémorale [GIRGIS et coll., 1975].

D'autre part, le LCA est attaché au fémur et au tibia, non pas comme une corde singulière mais plutôt comme un ensemble de fascicules individuels. Ces fascicules ont été divisés en deux groupes:

- la bande antéromédiale, dont les fascicules partent de la partie proximale de l'attache fémorale et s'insèrent à la partie antéromédiale de l'attache tibiale (figure 1.3)

- la bande postérolatérale, constituée des fascicules restants et qui s'insèrent à la partie postérolatérale de l'attache tibiale

Quand le genou est en extension, la bande postérolatérale serait tendue alors que la bande antéromédiale serait relâchée. Par contre, quand le genou

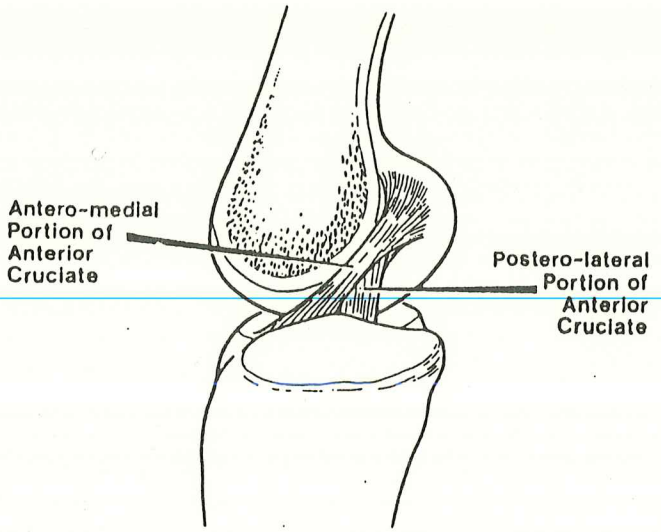


Figure I.3 Représentation schématique des 2 bandes du LCA.
(FARQUHARSON-ROBERT et coll. 1983).

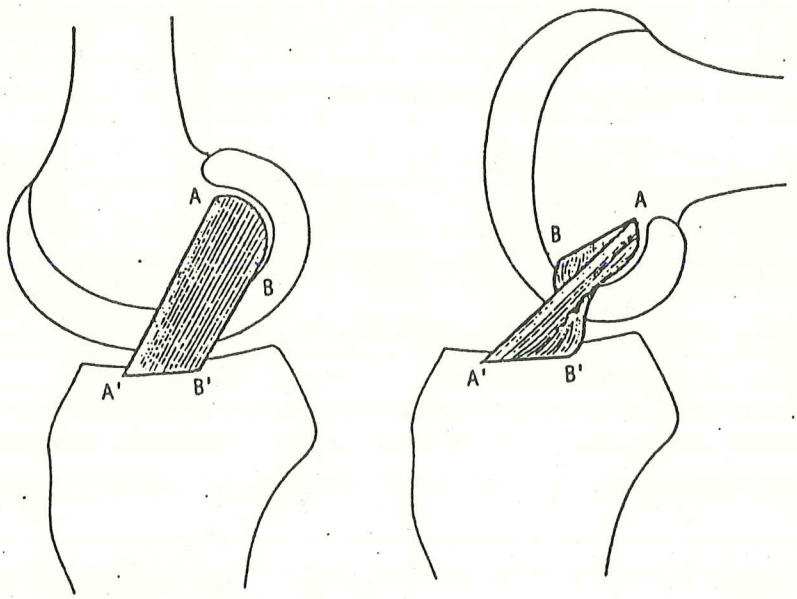


Figure I.4 Schéma illustrant les changements de forme et de tension du LCA en extension et en flexion.
(GIRGIS et coll. 1975).

est en flexion, l'attache fémorale du LCA présente une orientation plus horizontale et provoque ainsi une tension de la bande antéromédiale et un relâchement de la bande postérolatérale (figure 1.4).

Il semblerait que la portion antéromédiale est sous tension maximale pour des angles de flexion de 0 à 30 degrés, et selon certains auteurs, elle redeviendrait sous tension à 90 degrés de flexion [FARQUHARSON-ROBERTS et coll., 1983].

La portion postérolatérale est considérée comme étant relativement non contrainte en flexion, alors que le ligament entier se trouve sous une tension minimale pour un angle de flexion variant de 40 à 50 degrés.

ALM et coll. [1974 (a)] ont montré que la portion antéromédiale du LCA est relativement moins vascularisée. On peut se demander si la bande postérolatérale, d'apparence plus flasque et plus vascularisée, n'aurait pas pour rôle de nourrir le ligament et de permettre son métabolisme!

Toutefois, selon ARNOCZKY (1983), dans n'importe quelle position du genou, une portion du LCA reste sous-tension, et donc fonctionnelle.

Ces considérations montrent que le LCA présente une macrostructure assez complexe.

STOUFFER et coll. (1983) attribuent cette complexité à trois facteurs géométriques:

(1) Le LCA s'élargit en éventail du centre vers les extrémités, de sorte que les attaches fémorales et tibiales soient plus grandes que la section centrale.

(2) En extension complète, le site d'insertion fémoral a une orientation à peu près verticale, alors que l'insertion tibiale est presque horizontale (figure I.4). Les fascicules ne sont pas chargés uniformément.

(3) Les fascicules du LCA sont disposés en spirale de l'attache tibiale à l'attache fémorale [KENNEDY et coll., 1974]. La spirale est dans le sens des aiguilles d'une montre pour le genou droit et en sens contraire pour le genou gauche. Pour environ 70° de flexion du genou, les faisceaux tournent en spirale d'environ 170 à 200 degrés, de sorte que les faisceaux qui étaient médiaux à l'attache fémorale deviennent des faisceaux latéraux à l'attache tibiale.

La dissection du ligament montre que cette configuration en spirale est approximativement correcte pour tous les fascicules à cet angle de flexion.

Cette configuration d'enroulement en spirale du LCA servirait à limiter la rotation interne du ligament [ARNOCZKY et MARSHALL, 1977]. Selon HEFFRON et CAMPBELL (1978), seule la bande antéromédiale est en spirale. Lors d'une flexion du genou, la bande antéromédiale s'enroule autour de la partie postérolatérale.

CHAPITRE II

REVUE DE LITTERATURE

II.1 Introduction

Il n'existe que très peu d'études de la microstructure des ligaments croisés humains. Les premiers travaux sont des études morphologiques et histologiques [KENNEDY et coll., 1974; WILSON et DANYLCHUK, 1974; HEFFRON et CAMPBELL, 1978]. Ces travaux ont montré que le LCA humain possède une structure multifasciculaire. Les faisceaux de collagène sont orientés longitudinalement et séparés les uns des autres par un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins. La seule étude disponible concernant l'organisation microstructurale du LCA humain est celle de DANYLCHUK et coll., (1978). Toutefois cette étude s'est limitée à l'arrangement du collagène. Par contre, de nombreux travaux concernant la microstructure d'autres

tissus conjonctifs tels le tendon de queue de rat (TQR) ont été effectués [KASTELIC et coll., 1978; GATHERCOLE et coll., 1978; NIVEN et coll., 1982].

II.2 Composantes macromoléculaires des ligaments

Les ligaments contiennent, comme les autres tissus conjonctifs mous, trois principales composantes macromoléculaires:

(a) Collagène, une protéine fibreuse.

(b) Elastine, une protéine d'apparence amorphe.

(c) Les Protéoglycannes (PG-s), des protéines qui forment avec l'eau, la substance fondamentale de la matrice intercellulaire.

Il existe d'autres composantes dont le rôle biomécanique est moindre telles que la fibronectine et les fibroblastes.

L'analyse biochimique des tissus biologiques mous révèle que le pourcentage de ces macromolécules, par rapport au poids séché du tissu, dépend de la nature du tissu, de l'âge et de l'espèce. Le tableau II.1 résume les principales données de la littérature. On peut remarquer que dans certains tissus (tendon calcanéen) la teneur en collagène est très élevée, alors que dans d'autres (ligament de la nuque), c'est l'élastine qui constitue la protéine prédominante. On parle alors de tissus collagéniques et de tissus élastiques.

Les ligaments et les tendons articulaires peuvent être considérés comme des tissus collagéniques. En effet, bien qu'il n'existe pas encore de données précises concernant la composition chimique de ces tissus, le tableau II.1 suggère que leur poids séché contiendrait 60 à 87% de collagène, 2 à 5% d'élastine, et le matériau restant serait des glycosaminoglycannes (GAGs), des fibroblastes et de la fibronectine. Par ailleurs, les teneurs en GAG et en eau ne sont pas connues. L'eau représenterait 65% du poids hydraté

de la plupart des ligaments et des tendons articulaires [BETSCH et BAER, 1980].

On constate que les tissus conjonctifs mous, et en particulier les ligaments, peuvent être considérés comme des matériaux bio-composites. Leur comportement biomécanique serait optimisé, dans la nature, par une distribution effective des contraintes entre les différents éléments constitutifs. Les fibres de protéine (par exemple de collagène) résistent aux contraintes de tension associées au mouvement, alors que les polymères (les PG-s) dissous dans le fluide interfibrillaire s'opposent d'une part aux forces de compression, et assurent d'autre part une lubrification. L'élastine est responsable de l'élasticité physiologique des tissus mous, notamment pour des faibles niveaux de contrainte. Nous verrons que l'élastine dissipe très peu d'énergie et permet ainsi de minimiser la dépense d'énergie musculaire lors du mouvement de certains organes (tête des bovins, ailes d'insectes).

Tableau II.1: Composition biochimique des tissus biologiques mous. (Les proportions relatives sont en pourcentage du poids total du tissu séché.)

Tissu	Espèce (âge)	Elastine	Collagène	GAG	Références
Foie	-----	0,16 - 0,30	3,90	-----	Uitto J. (1979)
Tendon calcanéen	Eléphant	0,50	93	-----	Lowry et coll. (1941)
	Humain	2	86	-----	
Ligament capsulaire de l'articulation de la hanche	Rat (10 semaines)				Shikata J. et coll. (1979)
	Mâle	2,14	66,50	-----	
	Femelle	3,32	60,30	-----	
Peau	-----	2 - 4	71,90 - 75	-----	Uitto J. (1979)
	Humaine	-----	79	-----	Lowry et coll. (1979)
Tendon d'Achille	Humain	4,40	86	0,50	Uitto J. (1979)
Utérus	Humain	6,20	-----	-----	Starcher et coll. (1976)
Poumon	-----	3 - 7	10	-----	Uitto J. (1979)
	Canin	15,70	-----	-----	Starcher et coll. (1976)
	Humain	24,0	-----	-----	
Artère	Humaine				Purinya et coll. (1975)
	(25 - 39 ans)	12,61 ± 0,84	40,68 ± 2,9	0,737 ± 0,12	
	(40 - 49 ans)	11,11 ± 1,06	44,00 ± 4,47	0,646 ± 0,17	
	(50 - 59 ans)	15,07 ± 3,09	33,45 ± 3,04	0,718 ± 0,13	
Aorte	Humaine	28 - 32	12 - 24	5	Uitto J. (1979)
	Canine	40,0	-----	-----	Starcher coll. (1976)
	Humaine	47,10	-----	-----	
	Bovine	48,20	-----	-----	
Ligament de la nuque	-----	71 - 74,80	16 - 17	-----	Uitto J. (1979)
	Bovin	66,0	-----	-----	Starcher
	Eléphant	81,0	17	-----	Lowry
Cartilage	-----	-----	46,1 - 63,7	20,4 - 37,1	Uitto J. (1979)
Cornée	-----	-----	68,1	4,5	Uitto J. (1979)

Ce modèle de matériau biocomposite, renforcé de fibres, serait valable pour la plupart des tissus biologiques. Les propriétés mécaniques de tous les matériaux, tissus vivants aussi bien que matériaux "inanimés", dépendent de leurs configurations structurales du niveau moléculaire au niveau macroscopique. Par ailleurs, les intéractions physiques et chimiques entre les différentes composantes (collagène - PG, collagène - élastine, ...) déterminent les propriétés biophysiques du tissu. On peut donc dire que la composition spécifique et la structure (micro et macroscopique) d'un tissu, d'une part, et les intéractions entre ses constituants, d'autre part, déterminent les propriétés propres à chaque tissu biologique. Celles-ci à leur tour permettent au tissu d'assumer la fonction qui lui est assignée.

Il existe, par conséquent, une interdépendance entre la structure, la composition et les intéractions entre les composantes du tissu et sa fonction biologique.

La microstructure des ligaments du genou, en particulier du LCA, est l'une des plus complexes et n'est pas encore bien comprise. Toutefois, concernant cette complexité, tout semble se passer selon le pricipe bien connu en biologie "LA FONCTION CREE L'ORGANE", et est sans doute reliée à la complexité des déplacements physiologiques auxquels est soumis ce tissu.

Ces considérations nous montrent qu'il est nécessaire de comprendre la structure de chacun des éléments constitutifs du tissu, du niveau moléculaire au niveau supramoléculaire. De même, les intéractions physiques et chimiques entre les différentes composantes doivent être élucidées. Dans ce chapitre, une revue de littérature des connaissances actuelles sur la structure du collagène, de l'élastine, des PG-s, et des interactions entre les composantes structurales est présentée.

II.2.1 Collagène

Il existe divers types de collagène génétiquement et structurellement distincts, mais seulement cinq types ont été isolés [KUHN et GLANVILLE, 1980; TRELSTAD, 1981]. Les plus connus sont les collagènes interstitiels de type I, II et III. Les molécules de collagène diffèrent d'un type à l'autre par la nature des chaînes polypeptidiques qui les composent. Elles sont appelées chaînes α et formées d'une longue suite d'acides aminés.

Les tendons et les ligaments articulaires sont principalement formés de collagène type I, bien que les gaines des différentes unités structurales contiennent du collagène type III [VIIDIK et coll., 1982].

Structure moléculaire

(i) Collagène type I

Le collagène type I est formé de deux chaînes ∝ identiques (les chaînes ∝ 1(I)) et d'une troisième chaîne distincte mais homologue (la chaîne ∝2). Chaque chaîne est formée de 1052 résidus d'acides aminés et forme une hélice à gauche avec un pas de 0,89 nm [VIIDIK, 1979a]. Les trois chaînes s'enroulent en une superhélice à droite avec un pas de 8.7 nm, pour former la molécule de tropocollagène de 280 nm de long et 1,4 nm de diamètre (figure II.I).

Chaque chaîne ∝1(I) possède deux régions. La région centrale en hélice, constituée de 1011 résidus est responsable de l'auto-assemblage des molécules en des structures fibrillaires. Les deux extrémités non hélicoïdales, constituées de télopeptides de 16 résidus (pour l'extrémité N-terminale) et de 25 résidus (pour l'extrémité C-terminale), portent des groupes fonctionnels

Figure II-1

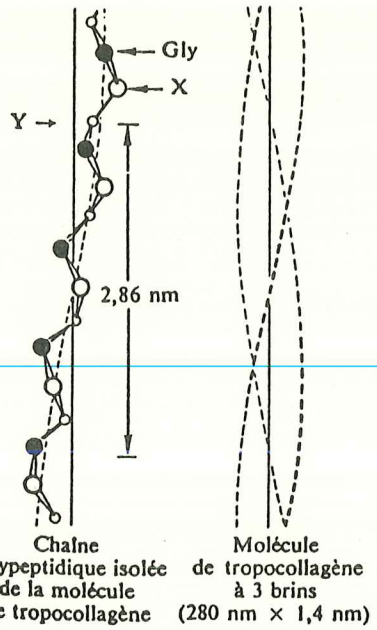


Figure II-2

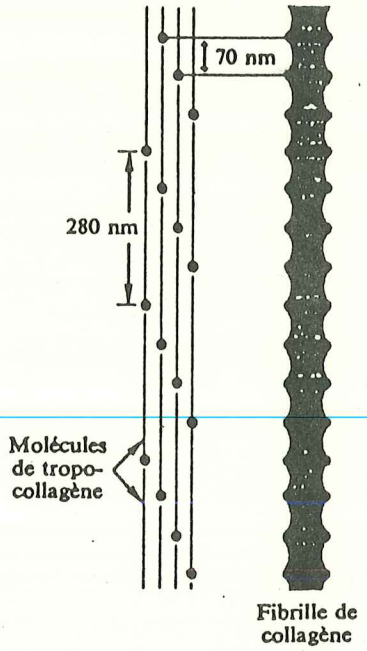


Figure II-1 Conformation des chaînes polypeptidiques dans la molécule à 3 brins de tropocollagène. Chaque chaîne est une hélice ayant des séquences Gly-X-Y répétées. (D'après LEHNINGER, 1981).

Figure II-2 Disposition des molécules de tropocollagène, responsables de la périodicité de 70nm des fibrilles. (D'après LEHNINGER, 1981).

pour les liaisons intermoléculaires (lysine ou hydroxylysine) [MILLER, 1980].

Une caractéristique essentielle pour la formation de la structure en triple hélice (région centrale) est que chaque troisième résidu soit occupé par la glycine:

GLY-X-Y-GLY...

Ces résidus de glycine forment des liaisons hydrogènes aux amides des liaisons peptidiques des chaînes adjacentes à la super-hélice.

La super-hélice est stabilisée par des unités tripeptidiques riches en proline telles que:

GLY-PRO-HYP et GLY-PRO-Y en formant des liaisons hydrogènes avec les deux autres chaînes [KUHN et coll., 1980] ou des ponts eau liée-Hydrogène [VIIDIK, 1979a].

Une autre caractéristique essentielle de la séquence des acides aminés dans la partie hélicoïdale, est la distribution des acides aminés polaires et hydrophobes, qui sont responsables de l'auto-assemblage des molécules de tropocollagène en structures fibrillaires [LIGHT et BAILEY, 1980(b)]. Ces acides aminés ne sont pas distribués uniformément le long des chaînes peptidiques, mais arrangés en fragments polaires et en zones hydrophobes. Par ailleurs, des calculs théoriques basés sur des séquences déterminées d'acides aminés, ont montré que les interactions entre les groupes hydrophobes aussi bien que polaires, des chaînes $\alpha 1(I)$ sont maximales lorsque le décalage axial des molécules adjacentes est de 234 résidus [PIEZ et TRUS, 1977; HOFMAN et coll., 1978].

Les fragments polaires peuvent être visibles au microscope électronique ou par diffraction aux rayons X. Une striation de période 66,8 nm apparaît, et corrèle bien avec la pseudo-périodicité de 234 résidus dans la distribution des acides aminés apolaires le long de la molécule [KUHN, 1980; MILLER, 1980].

Ces observations sont en accord avec le modèle largement accepté de l'ultrastructure du collagène: la pentafibrille (5 molécules de tropocollagène) décalée d'un quart (figure II.2).

Donc, la séquence primaire des chaînes α semble former le gabarit nécessaire pour un auto-assemblage moléculaire des pentafibrilles comme événement spontané, les groupes chargés dirigent l'alignement et les groupes hydrophobes étant impliqués dans la stabilisation de la pentafibrille.

Nous aborderons au paragraphe II.3.1, le problème des liaisons inter et intramoléculaires du collagène type I, car celles-ci jouent un rôle fondamental dans la résistance en tension et la stabilité mécanique du collagène.

(ii) Collagène type III

C'est le type de collagène présent dans les gaines de tissu conjonctif lâche des tendons [NIMNI, 1980; VIIDIK et coll., 1982], et probablement aussi des ligaments. Le collagène type III, souvent codistribué avec le type V, est synthétisé simultanément avec le type I par les fibroblastes.

Le collagène type III contient trois chaînes identiques, et est unique dans le sens où il contient des liaisons disulfides inter-chaînes (ou intramoléculaires) dans la région hélicoïdale de la molécule près de l'extrémité C-terminale.

L'ultrastructure du collagène type III est similaire à celle du type I.

Les liaisons intermoléculaires sont de type kéto-imine, et rendent ce collagène difficile à solubiliser et à purifier sans retirer les télopeptides par digestion de la pepsine [VIIDIK et coll., 1982].

Structure supramoléculaire

L'organisation des molécules de collagène type I en structure fibrillaire et l'arrangement des fibrilles en unités structurales au niveau plus élevé, ont été principalement étudiés dans le TQR [BAER et coll., 1974; GATHERCOLE et coll., 1978; KASTELIC et coll., 1978; NIVEN et coll., 1982]. Ces travaux ont montré que le collagène type I s'assemble dans une hiérarchie structurale à plusieurs niveaux. On a vu, au paragraphe précédent, que la formation des fibrilles dans l'espace extra-cellulaire, est un processus d'auto-assemblage contrôlé par la séquence des acides aminés du collagène, notamment par la distribution des résidus d'acides aminés polaires et d'acides aminés hydrophobes. Par ailleurs, l'interaction des molécules de

collagène, avec les autres constituants non-collagéniques tels que les PG-s, peut influencer ce processus de fibrillogénèse.

Bien que la structure du collagène type I peut varier d'un tissu à l'autre, nous allons faire le point, dans ce chapitre, sur les connaissances actuelles concernant les hiérarchies structurales du collagène des tendons. Le cheminement se fera du niveau moléculaire vers le niveau macroscopique.

a) Microfibrille

La microfibrille est l'unité structurale apparaîssant au microscope électronique, comme un mince filament de 4 nm de diamètre. La microfibrille est constituée de 5 molécules de tropocollagène qui sont décalées l'une par rapport à l'autre d'environ un quart de leur longueur, c'est-à-dire d'une distance de 67 à 70 nm [SMITH, 1968, cité par KUHN et coll., 1980]. Ces molécules de tropocollagène s'enroulent autour de l'axe droit de la

microfibrille pour former une "super-hélice" à gauche [VIIDIK, 1979a].

b) Fibrille et sub-fibrille

L'étape suivante dans ce processus d'assemblage est caractérisée par un alignement parallèle des microfibrilles en fibrilles [KUHN et coll., 1980], ou par un assemblage ("tressage") des microfibrilles en hélice à droite ayant un pas d'environ 1 000 nm [VIIDIK, 1979a].

L'unité structurale de base de la fibrille serait constituée de 2 ou 4 microfibrilles disposées en hélice [PIEZ, 1982]. Toutefois, on ignore encore le nombre de telles unités formant la fibrille.

La fibrille présente au microscope électronique une striation caractéristique de période variant de 60 à 70 nm. Cette périodicité serait due à l'arrangement des molécules de tropocollagène, décalées d'un quart de leur longueur au niveau microfibrillaire.

Les microfibrilles de collagène sont probablement couplées l'une par rapport à l'autre par des liaisons multivalentes dans le tissu mature [VIIDIK, 1980]. Cette étape paraît également être régulée par la structure primaire du collagène. Cependant, on ignore la contribution des autres composantes dans ce processus d'assemblage. On ne sait pas, non plus, comment est régulé le diamètre des fibrilles qui peut varier d'un tissu à l'autre, bien que l'interaction de la fibronectine et des PG-s semble jouer un rôle important [KLEINMAN et coll., 1981].

Au niveau fibrillaire de la hiérarchie structurale, les données de la littérature sont divergentes. Le diamètre des fibrilles du collagène de TQR varie de 10 nm à 485 nm [KASTELIC, 1978; PARRY et CRAIG, 1979]. Certains auteurs ont introduit un niveau d'organisation intermédiaire entre la microfibrille et la fibrille du TQR: la sub-fibrille. Celle-ci aurait un diamètre variant de 10 à 24 nm [KASTELIC, 1978; ITOH et coll., 1982].

Une distribution bimodale du diamètre de la fibrille a été également observée dans les tendons et les ligaments du cheval [PARRY et coll., 1978]. Par la suite, PARRY et coll. (1979) ont montré que le diamètre de la fibrille du collagène est un multiple de 8 nm dans divers types de tissus et d'espèces. De plus, ce diamètre aurait une distribution unimodale. Les fibrilles du TQR seraient constituées de 3 à 6 unités (microfibrilles) de 8 nm de diamètre.

Récemment, ITOH et coll. (1982) trouvent des fibrilles de TQR de diamètre beaucoup plus grand. Elles seraient formées d'environ 100 sub-fibrilles de 24 nm de diamètre. Dans le cartilage de l'oreille et la cornée des lapins, les fibrilles de collagène ne renfermeraient que 25 sub-fibrilles.

Les fibrilles de collagène du LCA humain auraient un diamètre variant de 150 à 250 nm [DANYLCHUK, 1978].

Il est également important de souligner que les fibrilles de collagène sont entourées d'une gaine constituée principalement de GAG-s et de glycoprotéines de structure [BAER et coll., 1974; BARENBERG et coll., 1978]. Cette gaine, appelée gaine de Henlé [MAILLET, 1979], a une extensibilité mécanique considérable puisqu'elle résiste encore lorsque la fibrille est étirée au-delà de la rupture [BARENBERG et coll., 1978]. A l'intérieur de cette gaine, les unités microfibrillaires et sub-fibrillaires baignent dans une matrice de carbohydrate [BAER et coll., 1974].

c) Fibre

La prochaine étape dans l'organisation hiérarchique du collagène est l'arrangement des fibrilles, qui peut s'effectuer de différentes façons. On sait maintenant que l'assemblage des molécules de tropocollagène en microfibrilles, puis de celles-ci en fibrilles, est déterminé principalement par la séquence des acides aminés. Par contre, nos connaissances sont encore très limitées quant aux mécanismes de la formation d'unités structurales

de dimensions plus grandes. Il semble néanmoins que le collagène type I peut s'organiser en structures macromoléculaires différentes selon le type de tissu.

Par exemple, les fibrilles de la peau, de diamètre relativement grand, s'enroulent les unes sur les autres pour former des fibres, qui ensuite forment un réseau tridimensionnel mécaniquement stable [KUHN et GLANVILLE, 1980].

Dans l'intestin de rat, des fibrilles de 80 nm, du collagène de la couche sub-muqueuse, s'assemblent d'abord en "sub-fibres", puis celles-ci forment à leur tour des fibres de 2 à 6 µm de diamètre [ORBERG et coll., 1982].

Selon VIIDIK et coll. (1982), les fibrilles de collagène des tendons et des ligaments s'assemblent d'abord en fibres de 1 à 10 um diamètre, ensuite celles-ci s'arrangent en faisceaux primaires et en unités plus grandes. En effet, dans le LCA humain, les fibrilles sont

organisées en fibres de diamètre variant de 1 à 20 µm [DANYLCHUK et coll., 1978].

d) Fascicule - sous-fascicule

Toutefois, il semblerait que dans certains tendons et ligaments, l'arrangement des fibrilles en fibres ne soit pas présent, et que les fibrilles soient organisées directement en unités plus grandes. Ainsi, dans le TQR, les fibrilles sont ondulées et forment avec la substance fondamentale le prochain niveau d'assemblage: les fascicules. Cependant, il existe parmi les différents auteurs ayant observé ce type de tissu (TQR), des divergences concernant la forme, les dimensions et l'arrangement des fascicules. KASTELIC et coll. (1978) ont suggéré que les fascicules ont une section droite circulaire ou elliptique, et un diamètre variant de 80 à 320 µm. Plus tard, GATHERCOLE et coll. (1981) confirmèrent la forme circulaire et/ou elliptique des fascicules, mais soulignèrent que chaque fascicule ("sous-unité du tendon") est constitué d'un doublet interne caractérisé par un plan

de glissement. Récemment, NIVEN et coll. (1982) ont proposé que l'unité structurale du TQR soit un fascicule de forme triangulaire de 150 à 300 µm.

Les travaux de DANLYCHUK et coll. (1978) ont montré que dans le LCA humain, un grand nombre de fibres de collagène forment l'unité sous-fasciculaire qui varie considérablement en diamètre, 100 à 250 µm. Les sous-fascicules sont entourés d'une mince couche de tissu conjonctif lâche, appelée l'endotendineum. Trois à vingt sous-fascicules s'assemblent pour former un fascicule de diamètre variant de 250 µm à plusieurs mm. Les fascicules sont entourés par une gaine dite l'épitendineum. Le ligament entier est également entouré par une gaine de tissu conjontif, appelée le péritendineum.

Ondulation du collagène

Le phénomène d'ondulation des fascicules de collagène a été observé depuis longue date [HERINGA et LOHR, 1924, cité par ELLIOTT 1967]. Depuis, cette morphologie

ondulée a été observée par plusieurs auteurs, principalement dans le TQR [GATHERCOLE et coll., 1978 et 1981; DLUGOSZ et coll., 1978; KASTELIC et coll., 1978; NIVEN et coll., 1982]. Cette ondulation présente également dans d'autres tissus [DALE et coll., 1974], a été signalée tantôt dans les fascicules, tantôt dans les sous-fascicules et/ou les fibres de collagène.

a) Caractéristiques de l'ondulation

La forme de l'ondulation du collagène n'est pas encore claire. DIAMANT et coll. (1972) ont observé dans le TQR une structure fibrillaire bidimensionnelle suggérant une ondulation planaire des fibrilles. EVANS et coll. (1975) favorisent une structure fibrillaire en hélice et s'accordent avec l'hypothèse selon laquelle l'onde apparente serait due à une torsion tridimensionnelle des fibrilles de collagène dans le fascicule.

D'autre part, certains auteurs ont décrit cette ondulation comme ayant une apparence en zig-zag [KASTELIC et coll., 1978; DLUGOSZ et coll., 1978; SHAH et coll., 1979].

Certains paramètres de l'ondulation ont pu être mesurés dans divers types de tissu. Le tableau 2.1 résume les principales données de la littérature. On remarque que les paramètres d'ondulation dépendent de l'espèce et de l'âge du sujet.

b) Mécanismes de l'ondulation

Bien que la morphologie ondulée des unités structurales du collagène type I soit confirmée, du moins in vitro, par différents auteurs, il n'en demeure pas moins que son origine reste encore incomprise.

MINNS et coll. (1973) ont suggéré que des fibres élastiques (à base d'élastine) restituent l'ondulation du

Tableau II.2 PARAMÈTRES DE L'ONDULATION

Auteurs	Source	Age	Demi-période (µm)	Angle d'ondulation (deg.)
DIAMANT, J. (1970) *	TQR	2 semaines	21 ± 1	20 ± 0,5
		3 semaines	46 ± 2	19,4 ± 1,4
		2 mois	64 ± 5	18,6 ± 0,5
		5 mois	86 ± 5	17,5 ± 0,7
		13 mois	92 ± 2	15,4 ± 0,5
		29 mois	110 ± 5	12,5 ± 1,5
GATHERCOLE (1978)	TQR	foetus	6	35
		3 semaines	42	25
DALE et coll. (1972) **	TQR	14 mois	100	12
		51 ans	50	12
		11,7 ans	75	8,9
		46 ans	20,50	6,8
ORBERG et coll. (1982)	intestin de rat (couche submucosa)	3 semaines	7,9 ± 0,8	—
		3 mois	9,8 ± 1,1	—
		5½ mois	11,6 ± 1,6	—
		12 mois	10,1 ± 1,4	—
		22 mois	10,3 ± 1,8	—
		25 mois	11,6 ± 1,6	—
SHAH et coll. (1979)	Ligament long. postérieur	de la colonne vertébrale humaine		15
	Ligament long. antérieur			13,6
	Ligament interépineux			14,8

* cité par BETSCH (1980)

** cité par FUNG (1981)

collagène après déchargement, c'est-à-dire que le mécanisme de l'ondulation serait dû à une interaction collagène-élastine.

DALE et BAER (1974) attribuent l'origine de l'ondulation à une interaction matrice-collagène. Pour vérifier leur modèle, ces auteurs ont utilisé des fibres synthétiques baignants dans une matrice de polyéthylacrylate qui subit une contraction volumique de 20% après polymérisation. Ils ont montré qu'une ondulation régulière, semblable à celle observée dans les tissus mous, se forme sur les fibres par suite de la contraction de la matrice lors du refroidissement. Ils ont suggéré que la diminution de l'acide hyaluronique avec l'âge, dans la substance fondamentale entourant les fascicules de collagène, provoque une contraction (c'est-à-dire une ondulation) similaire à celle du modèle synthétique. L'une des faiblesses de ce modèle est qu'il requiert la présence d'une importante quantité de substance fondamentale, laquelle n'est pas encore attestée in-vivo.

L'interaction inter-fibrillaire du collagène a également été proposée comme mécanisme d'ondulation. Se basant sur la hiérarchie ascendante de l'organisation du collagène, BROOM (1978) a suggéré que l'ondulation soit produite par une séquence répétée de contraintes internes générées par des mécanismes de liaisons très complexes intégrant les divers éléments sub-structuraux. Cette hypothèse est fondée sur l'analogie du bilame, où les contraintes internes induites par les coefficients de dilatation thermique différents de deux métaux, provoquent des variations de forme le long de l'axe du bilame. Des contraintes internes dans les fibres de collagène seraient "générées" par la présence de fibres adjacentes de collagène. Cette hypothèse, bien qu'en accord avec celle de génération spontanée de l'ondulation des faisceaux de collagène au-delà d'une certaine taille minimale [BAER et coll., 1974] n'est pas encore vérifiée en raison de la difficulté à mettre en évidence l'existence de contraintes inter-fibrillaires.

II.2.2 Elastine et protéine microfibrillaire

L'élastine est une protéine qui se trouve souvent associée à des glycoprotéines, pour former des structures élastiques dans divers tissus conjonctifs. Le ligament de la nuque des bovins est constitué d'environ 75% d'élastine (tableau II.1) et ce tissu a servi de base pour la caractérisation de la protéine d'élastine.

Dans la littérature, on rencontre diverses terminologies pour désigner les structures élastiques formées par l'élastine: fibres élastiques, fibres d'élastine, microfibrilles, etc.. Toutefois, l'examen au microscope électronique des structures à base d'élastine, telles que les fibres élastiques du ligament de la nuque ou de l'aorte, révèle l'existence de deux composantes distinctes [SEAR, 1978 et 1981 a et b; CLEARY et coll., 1981; KADAR, 1979].

On distingue successivement:

- Une composante majeure d'apparence amorphe: la protéine élastine.

- Une composante fibrillaire, avec des microfibrilles de diamètre régulier de 10 à 12 nm, entourent l'élastine amorphe: la protéine microfibrillaire.

Structure moléculaire

(i) Elastine

L'unité moléculaire de base de la protéine élastine est une seule chaîne polypeptidique d'environ 850-970 résidus, appelée la tropoélastine. Elle contient de la glycine et de la proline mais distribuées d'une façon plus aléatoire que dans le collagène. L'élastine contient également de l'hydroxyproline (tableau II.3), mais sa fonction n'est pas encore comprise. En effet, le rôle

Tableau II.3: Composition en acides aminés (résidus/1 000 résidus)
[GAY et MILLER, 1978; UITTO, 1979; GUAY et LAMY, 1980]

Acide Aminé	Collagène chaîne α 1(I)	Elastine insoluble Aorte porc	Tropo-élastine (Aorte porc)	Protéine Microfibrillaire (ligament nuque de bovin)
3- Hydroxyproline	1	---	---	---
4- Hydroxyproline	90	11	9	---
Aspartate (acide aspartique)	42	6	4	114
Thréonine	17	14	14	55
Sérine	37	11	9	59
Glutamate (acide glutamique)	77	19	19	111
Proline	135	117	112	70
Glycine	330	330	324	120
Alanine	115	234	231	59
Valine	21	120	94	54
Méthionine	7	---	---	16
Isoleucine	7	---	---	45
Leucine	20	54	44	57
Tyrosine	2	16	14	30
Phénylalanine	12	33	28	32
Hydroxylisine	5	---	---	---
Lysine	30	6	45	37
Histidine	2	1	0	14
Arginine	50	6	4	45
Isodesmosine	---	1.2	0	---
Desmosine	---	1.8	0	---
Lysinonorleucine	---	0.9	0	---
Cystine	---	---	---	---

critique de l'hydroxyproline dans la stabilisation de la triple hélice du tropocollagène sous des conditions physiologiques ne s'applique pas à l'élastine. L'hydroxyproline pourrait avoir une fonction importante dans une certaine phase de l'élastogénèse [MECHAM, 1981].

Par contre, la teneur élevée en lysine dans la tropoélastine joue un rôle essentiel dans la formation des liaisons covalentes [SANDBERG, 1976 et 1981]. Le processus commence par une désamination oxydative des groupes ε-aminés des lysines, et la formation des condensations aldols, les déhydro-lysinonorleucines et les déhydro-mérodesmosines, est une étape intermédiaire [VIIDIK et coll., 1982]. Ces composés aboutissent à des anneaux de pyridine, et par oxydation en DESMOSINES (DES) ET ISODESMOSINES (ISOD), qui sont les liaisons caractéristiques de l'élastine mature dans lesquelles on trouve 3 à 5 liaisons par 1 000 résidus d'acides aminés. Ces liaisons covalentes complexes (DES et ISOD) sont tétra-fonctionnelles, et confèrent une extrême insolubilité à l'élastine mature [GUAY et LAMY, 1980].

La liaison DES est aussi présente dans la membrane interne des coquilles d'oeuf, suggérant l'existence plus universelle des liaisons lysines [MECHAM, 1981].

Expérimentalement, on peut empêcher l'oxydation lysyl par un traitement au β-aminopropionitrile. C'est la méthode généralement utilisée pour obtenir de l'élastine soluble pour des analyses biochimiques. Cette approche n'est malheureusement d'aucun secours pour les recherches biomécaniques, étant donné que les liaisons DES et ISOD ne peuvent pas se réformer in vitro [VIIDIK et coll., 1982]. De plus, l'élastine et le collagène sont toujours présents conjointement, et il est impossible d'empêcher l'oxydation lysyl dans l'élastine seulement.

Plusieurs modèles de la structure moléculaire de l'élastine ont été suggérés pour tenir compte de la nature élastique spéciale des fibres. SANDBERG (1976) a résumé les quatre principaux modèles (figure II.3).

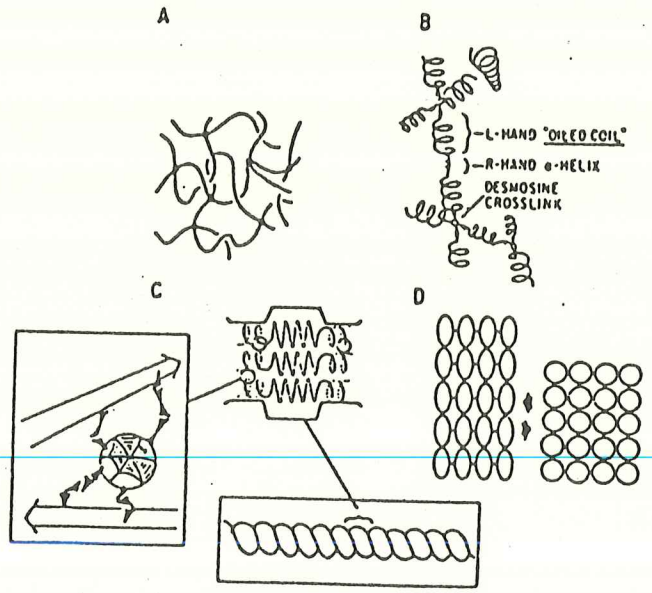


Figure II-3 Structure moléculaire de l'élastine:

(a) Modèle de chaîne aléatoire où les liaisons de l'élastomère sont irrégulières.

(b) Modèle dit «Oiled Coil» qui suppose l'existence de zones rigides (contenant des liaisons DES et ISOD) séparées par des zones flexibles.

(c) Modèle fibrillaire, constitué de segments d'hélice-α alternants avec des segments de spirale-β, donnants une apparence de tige torsadée.

(d) Modèle corpusculaire ou«de goutelette liquide», dans lequel les sous-unités de tropoélastine ont une configuration globulaire, et une région hydrophobe (à l'intérieur) et hydrophile (en surface).

(D'après SANDBERG, 1976).

Une vive controverse subsiste concernant les arrangements structuraux de l'élastine qui seraient compatibles avec ses propriétés physico-chimiques et mécaniques [TAMBURRO, 1981]. La question est de savoir si au niveau moléculaire, la chaîne de protéine se trouve sous forme d'enroulement aléatoire, ou si au contraire, elle possède une structure bien définie. En d'autres termes, l'élasticité de la protéine est-elle purement d'origine entropique ou non? Le principal désaccord semble se situer dans les conclusions obtenues respectivement par les mesures thermoélastiques, et par microscopie électronique à l'échelle super-moléculaire.

Les mesures thermoélastiques sont compatibles avec la théorie cinétique de l'élasticité du caoutchouc, suggérant que l'élasticité de la protéine (supposée comme ayant une structure en réseau aléatoire) est due aux variations d'entropie conformationnelle [HOEVE et FLORY, 1958 et 1974; GOSLINE, 1976; GOSLINE et FRENCH, 1979]. Nous verrons au paragraphe suivant que de nombreuses études de l'élastine au microscope électronique révèlent une structure

très ordonnée, constituée de filaments de 2 à 5 nm de diamètre. Ces filaments ont été considérés comme une preuve d'une structure moléculaire anisotrope de l'élastine qui est très différente de la structure en réseau aléatoire.

(ii) Protéine microfibrillaire

Les microfibrilles, contrairement à l'élastine, peuvent être digérées complètement par les enzymes protéolytiques. La composante microfibrillaire des jeunes fibres élastiques représente environ 8%, le reste étant de l'élastine amorphe [KADAR, 1979].

La caractérisation biochimique de la protéine microfibrillaire révèle que sa composition en acides aminés diffère de celle de l'élastine (Tableau II.3). Elle est riche en acides aminés polaires, et contient peu d'hydroxyproline, d'hydroxylysine et de liaisons DES ou ISOD. Elle a une teneur élevée en cystine qui est probablement indispensable pour les nombreuses liaisons

disulfides et responsable de l'insolubilité relative de cette protéine [UITTO, 1979].

Les microfibrilles contiennent aussi un grand nombre de résidus de sucre (tels que l'hexose et l'hexosamine), suggérant que la protéine microfibrillaire des fibres élastiques est une glycoprotéine. Récemment, SEAR et coll. (1978, 1981a et b) ont montré que les microfibrilles des fibres élastiques du ligament de la nuque bovin, contiennent deux glycoprotéines, désignées par MFPI et MFPII. MFPI est une glycoprotéine collagénique, de poids moléculaire apparent de 150 000 daltons, mais présentant des propriétés différentes des collagènes connus. MFPII est une glycoprotéine non-collagénique, de poids moléculaire apparent de 300 000 daltons.

Le rôle de ces glycoprotéines microfibrillaires n'est pas encore compris. La digestion des microfibrilles avec des enzymes protéolytiques a montré qu'elles ne jouent

aucun rôle dans les propriétés mécaniques des fibres élastiques du ligament de la nuque [HOFFMAN et coll., 1973].

Pour KADAR (1979), les microfibrilles dirigent l'organisation des molécules de tropoélastine, et donc jouent un rôle important dans l'établissement des liaisons. Durant l'élastogénèse, elles forment une trame régulière sur laquelle l'élastine se polymérise pour former des fibres élastiques; elles déterminent, donc, la forme et la direction ultérieure de la fibre.

Récemment, CLEARY et coll. (1981) ont suggéré que les microfibrilles sont constituées d'élastine précurseur (le tropoélastine) entourée de chaînes de glycoprotéine ayant un arrangement périphérique en spirale.

TAYLOR et coll. (1982) ont montré que les fibroblastes du tendon d'Achille bovin synthétisent in-vitro deux glycoprotéines, qui sont analogues à celles

synthétisées par les fibroblastes du ligament de la nuque bovin [SEAR et coll., 1981a et b].

Structure supramoléculaire

La microstructure de l'élastine et des protéines microfibrillaires a été particulièrement étudiée dans le ligamentum nuchae et l'aorte. Les techniques standards de coloration, pour la microscopie électronique, tels que l'acétate d'Uranyle et le citrate de plomb, ont permis la visualisation de la composante microfibrillaire; par contre, l'élastine amorphe, elle-même, demeure largement incolorée. L'inexistence de colorant spécifique pour l'élastine a pendant longtemps, limité sa caractérisation microscopique.

(i) Elastine

La structure de l'élastine a été particulièrement étudiée dans deux types de tissu: le ligament de la nuque et les vaisseaux sanguins. Dans chaque cas, différentes techniques de coloration de l'élastine furent développées.

Ligament de la nuque

L'une des premières méthodes, développée pour l'étude de l'ultrastructure de l'élastine du ligamentum nuchae, fut la coloration négative ou indirecte. Cette technique consiste à "colorer" le milieu environnant la structure de l'élastine, en attachant par une réaction chimique ou bien par un simple dépôt, une molécule colorante. Le colorant utilisé est le plus souvent du phosphotungstate (PTA) ou de l'acétate d'uranyle [GOTTE et coll., 1974, CLEARY et CLIFF, 1978; KADAR, 1979].

Une autre méthode, développée récemment pour l'étude de la microstructure de l'élastine dans ce type de ligament, est la technique de cryo-fracture et de répliques [PASQUALLI RONCHETTI et coll., 1979; FORNIERI et coll., 1982].

SHIKATA et coll. (1979) ont introduit une méthode de coloration des coupes ultrafines à l'hématoxyline ferreux de Verhoeff, suivie de citrate de plomb, pour visualiser

l'élastine des ligaments capsulaires de l'articulation de la hanche.

Ces travaux ont permis de montrer que la structure de l'élastine du ligamentum nuchae bovin comprend deux niveaux d'organisation. Au niveau supérieur, la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie optique (MO) révèlent que l'élastine est arrangée en fibres cylindriques de diamètre variant de 1 à 3 µm [GOTTE et coll., 1974; KADAR, 1979; GUAY et LAMY, 1980]. Ces fibres cylindriques d'élastine seraient arrangées soit en faisceaux parallèles, soit en réseau irrégulier. Le tableau II.4 résume les différents travaux concernant l'ultrastructure de l'élastine du ligament de la nuque.

Au niveau de la microscopie électronique à transmission (MET), les fibres cylindriques d'élastine apparaissent être constituées de minces filaments ou fibrilles d'élastine. Le diamètre de celles-ci varie de 1,6 à 5 nm (tableau II.4). Ces filaments sont arrangés soit parallèlement à l'axe de la fibre d'élastine, avec des

Tableau II.4: Structure de l'élastine du ligamentum nuchae.

Espèce	Technique	Unités structurales	Auteurs
Boeuf (2ans)	Coloration négative MEB & MET	Les fibres d'élastine sont constituées de minces filaments d'environ 3 à 4 nm de diamètre. Ces filaments présentent une périodicité de 4 nm.	Gotte et coll. (1974)
Boeuf (6 jours) (15 mois) (10 ans)	Coloration négative (PTA + KOH) MEB & MET	La substructure de l'élastine est fibrillaire. Le diamètre des fibrilles varie de 1,6 à 1,8 nm.	Cleary et Cliff (1978)
Boeuf	Cryo-fracture et répliques, MET	L'élastine est organisée en globules d'environ 5 nm, arrangés en longs filaments qui forment un réseau tridimensionnel.	Pasqualli Ronchetti et coll. (1979)
Boeuf	Séchage au point critique et, coloration négative	La MET des sections longitudinales et transversales de fibres élastiques révèle des fibres parallèles de 1 à 3 nm de diamètre. La MEB d'élastine purifiée montre des fibres cylindriques de 1 à 3 um de diamètre, formant soit un réseau irrégulier, soit des faisceaux de fibres parallèles. Les fibres cylindriques de 1 um sont constituées de faisceaux de fibrilles de diamètre inférieur à 100 nm.	Kádàr (1979)
Boeuf	Cryo-fracture, répliques, coloration négative MET	On observe des filaments de 4 à 5 nm de diamètre, et disposés presque en parallèle avec des interconnections.	Fornieri et coll. (1982)

interconnections transversales [GOTTE et coll., 1974; FORNIERI et coll., 1982], soit en un réseau tridimensionnel [PASQUALI RONCHETTI et coll., 1979; AARON et GOSLINE, 1980]. Certains auteurs ont observé que ces filaments présentent une striation de périodicité d'environ 4 nm [GOTTE et coll., 1974; FORNIERI et coll., 1982].

Toutefois, cette ultrastructure fibrillaire de l'élastine du ligamentum nuchae est encore controversée. A l'état de repos, l'élastine serait organisée en longs filaments dont le réseau tridimensionnel forme des globules. Dans ce cas, l'élastine apparait comme un matériau isotrope. Cependant, après un allongement de 180 à 200%, une structure fibrillaire (c'est-à-dire anisotrope) de l'élastine apparait [PASQUALI RONCHETTI et coll., 1979; FORNIERI et coll., 1982].

Récemment, AARON et GOSLINE (1980) ont observé, au microscope à lumière polarisée, que l'élastine hydratée ne présentait ni de biréfringence de forme, ni de biréfringence intrinsèque, ce qui indiquerait une structure isotrope aux

niveaux moléculaire et sub-microscopique. Leurs résultats montrent que les fibres d'élastine hydratée sont optiquement isotropes. Ces auteurs attribuent l'organisation fibrillaire au séchage de l'élastine en présence de sels de métaux lourds, utilisés dans les techniques de coloration négative.

Vaisseaux sanguins

Différentes techniques de coloration ont été développées pour étudier l'ultrastructure de l'élastine dans les vaisseaux sanguins. Le tableau II.5 regroupe les principaux travaux.

CLIFF (1971) a utilisé un traitement prolongé au tétroxyde d'osmium (O_sO_4) pour révéler l'ultrastructure des lamelles élastiques de l'aorte. Le tétroxyde d'osmium aurait un effet biphasique sur les tissus biologiques. D'abord, il provoque une gélatine du matériau amorphe de la matrice de "l'élastica" de l'aorte, ensuite son extraction différentielle si le traitement se prolonge. Cette

Tableau II.5: Structure de l'élastine aortique.

Espèce (âge)	Technique	Structure de l'élastine	Références
Aorte de rat (7 semaines)	Traitement prolongé à l'acide osmique; MET	Structure fibrillaire et tridimensionnelle de l'élastine. Le diamètre moyen des filaments est de 2 nm.	Cliff (1971)
. Artère carotide de lapin . Aorte d'embryon de poulet	Colorant: acide tannique - acétate d'uranyle; MET	Les fibres élastiques de l'aorte de poulet mesurent 30 à 50 nm de diamètre.	Kajikawa (1975)
Aorte de poulet	Complexe anticorps anti-tropoélastine conjugué à la ferritine; MET	Structure constituée de minces filaments de 3 à 5 nm de diamètre. Le conjugué anticorps ferritine ne réagit pas avec les microfibrilles de 10 à 12 nm de diamètre.	Keeley (1981)
Artère carotide de lapin	Traitement à l'acide périodique et au tétroxyde d'osmium; MET	Structure en réseau fibrillaire constituée de minces fibrilles d'environ 4 nm de diamètre	Katsuda et coll. (1982)

extraction du matériau de la matrice permet de révéler clairement la microstructure du tissu.

KAJIKAWA et coll. (1975) ont utilisé un colorant d'acide tannique - acétate d'uranyle sur des spécimens d'artère carotide et d'aorte. L'acide tannique permet d'augmenter la densité électronique de l'élastine amorphe.

Un complexe anticorps anti-tropoélastine conjugué à la ferritine a été utilisé récemment par KEELEY (1981), pour étudier l'élastine de l'aorte de poulet. Ce complexe est très spécifique, et ne réagit pas avec les microfibrilles.

Une technique de traitement à l'acide périodique (périodate) et au tétroxyde d'osmium, fut introduite par KATSUDA et coll. (1982) pour l'étude ultrastructurale de l'élastine. Le traitement prolongé au périodate permet de dissoudre les carbohydrates de l'élastine et de révéler ainsi, la microstructure de l'élastine, qui normalement se trouve masquée.

Ces différentes études ont permis d'élucider la structure de l'élastine aortique. Elle possède une ultrastructure fibrillaire comparable à celle du ligamentum nuchae. Le diamètre des fibrilles d'élastine, normalement distribué, varie de 2 à 5 nm (figure II.4). Ces fibrilles seraient ensuite organisées en fibres élastiques [KADAR, 1979]. GRUT et coll. (1977) ont observé au MEB, que les fibres élastiques d'aorte porcine, sont orientées longitudinalement, avec des interconnections. Ces fibres ont un diamètre moyen de 1,4 µm. Toutefois, il faut noter que ces dimensions varient avec l'espèce. Ainsi, KAJIKAWA et coll. (1975) ont observé, dans l'aorte d'embryon de poulet, des fibres élastiques de diamètre variant de 30 à 50 nm. D'autres auteurs ont observé, qu'au niveau supérieur, les fibrilles d'élastine aortique ne sont pas arrangées en fibres cylindriques, mais plutôt en feuillets ou en plaques [ROSS et BORNSTEIN, 1969; GUAY et LAMY, 1980].

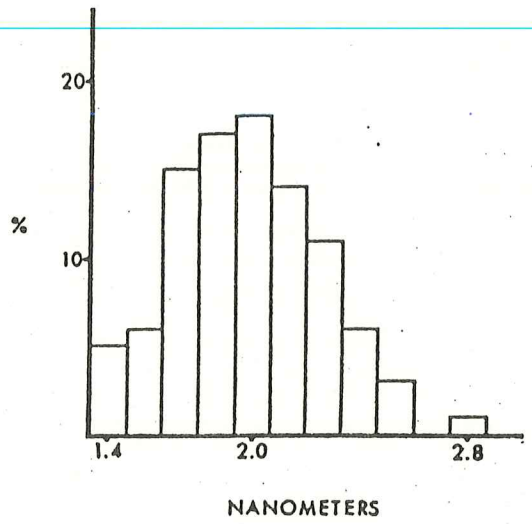


Figure II-4 Histogramme montrant le pourcentage de distribution des diamètres de fibrilles de la lamelle élastique de l'aorte. (CLIFF, 1971).

(ii) Protéine microfibrillaire

La structure des glycoprotéines microfibrillaires, associée au noyau d'élastine est relativement bien connue. Elle peut être révélée par une coloration négative, au rouge de ruthenium, ou par un complexe anticorps-ferritine [KADAR, 1979; CLEARY et coll., 1981].

Les glycoprotéines contenant les microfibrilles ont une structure filamenteuse en perles, et formeraient la charpente des fibres élastiques. Le diamètre des microfibrilles de l'aorte de porc varie de 8 à 12 nm [KADAR, 1979]. Celui des microfibrilles des ligaments capsulaires de l'articulation de la hanche varie de 17 à 20 nm [SHIKATA et coll., 1979]. Il semblerait donc, que le diamètre des glycoprotéines microfibrillaires dépende, entre autres, de l'espèce et du type de tissu. En effet, CLEARY et coll. (1981) ont observé des différences significatives du diamètre moyen, des microfibrilles entre quatre espèces différentes (tableau II.6). Par ailleurs, le diamètre moyen varie avec l'âge durant le développement foetal et

Species		Age	Mean	±2 SEM	*n*
SHEEP		11.5 months	13.3	±0.18	101
BOVINE	1	15–18 months	13.7	±0.34	44
	2	15–18 months	13.9	±0.18	107
HUMAN		18 years	14.2	±0.20	81
PIG	1	11–12 months	15.0	±0.27	35
	2	11–12 months	15.0	±0.25	70

Tableau no II-6 Diamètre des microfibrilles dans différentes espèces.
(CLEARY et coll. 1981).

Age	Copper replete diameter (nm) ± 2 SEM
99 day fetus	10.0 ± .22
108 day fetus	10.3 ± .19
1 day postnatal	11.5 ± .14
11.5 months	13.3 ± .19
8 years	13.6 ± .21

Tableau no II-7 Variation avec l'âge du diamètre des microfibrilles de l'aorte de Mouton.
(CLEARY et coll. 1981).

post-natal (tableau II.7). FANNING et coll. (1981) ont montré que les diamètres des microfibrilles de l'aorte, possédent une distribution normale pour chaque espèce (figure II.5).

Sommaire

L'organisation de l'élastine, au niveau du microscope optique et du microscope électronique à balayage, varie d'un tissu à l'autre. Elle se présente sous forme de fibres cylindriques (ligamentum nuchae), de feuillets (aorte, artère), ou encore de réseau à mailles lâches (derme, cartilage, alvéoles pulmonaires).

Au niveau ultrastructural (MET), ces différentes structures à base d'élastine sont constituées soit d'unités fibrillaires, soit d'unités globulaires. Le diamètre de ces unités (filaments ou globules) varie de 2 à 5 nm dans le cas du ligamentum nuchae et de l'aorte. Cependant, ces dimensions peuvent varier dans d'autres tissus. SHIKATA et coll. (1979) ont observé, dans les ligaments capsulaires de

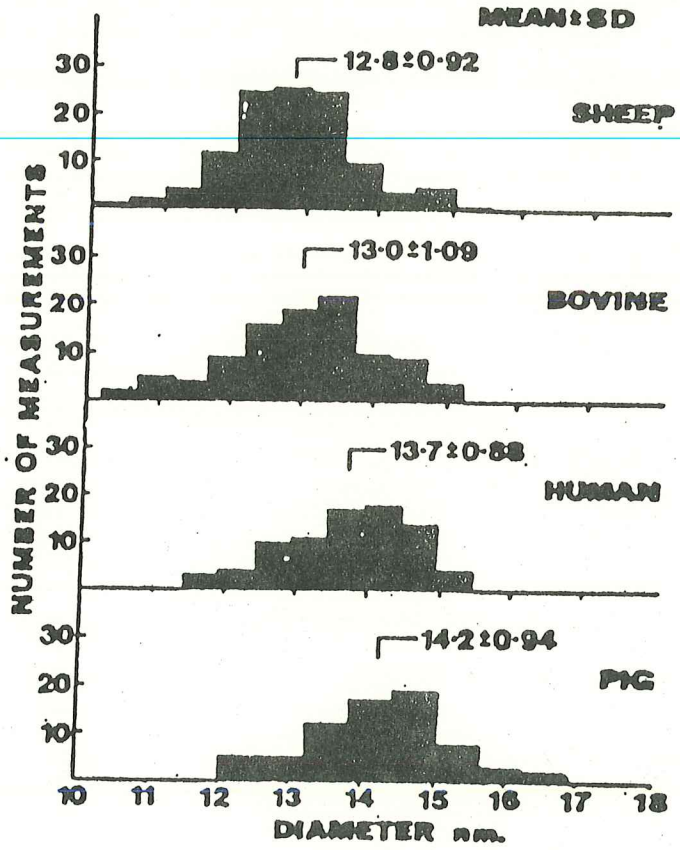


Figure II-5 Distribution des diamètres microfibrillaires de la lamelle élastique interne de l'aorte thoracique de 4 espèces.
(FANNING et coll. 1981).

l'articulation de la hanche, des fibrilles d'élastine de diamètre 60 à 80 nm.

La structure moléculaire des unités à base d'élastine n'est pas encore claire. En effet, l'ultrastructure fibrillaire ou filamenteuse (anisotrope) est en contradiction avec le modèle globulaire ou de réseau tridimensionnel (isotrope), lequel serait compatible avec les propriétés thermodynamiques et mécaniques de l'élastine [GOSLINE et FRENCH, 1979; AARON et GOSLINE, 1981]. La différence entre ces deux structures possibles de l'élastine ne serait qu'apparente selon TAMBURRO (1981), puisqu'un désordre à l'échelle moléculaire (c'est-à-dire une structure désordonnée ou isotrope) ne signifie pas nécessairement un désordre à l'échelle supramoléculaire. Il serait possible d'avoir des fibrilles d'élastine intérieurement amorphes (isotropes), mais en même temps associées avec un certain type d'arrangement, c'est-à-dire des fibrilles ou des filaments formées de globules alignées. Cette hypothèse est confirmée par l'observation récente de filaments d'élastine, non déshydratés, de 2 à 5 nm, et qui sont constitués par des

sous-unités globulaires de 6 nm de diamètre [FORNIERI et coll., 1981].

II.2.3 Les protéoglycannes et leurs constituants glycosaminoglycannes

La substance fondamentale des tissus conjonctifs mous, et en particulier des ligaments, contient des polysaccharides appelés glycosaminoglycannes (GAG-s), des glycoprotéines de structure et une variété de petites molécules. Il semblerait que la charge électrique nette de plusieurs tissus conjonctifs, au PH physiologique, soit due principalement à leurs composantes polysaccharidiques. En effet, les principaux constituants protéiques sont, soit essentiellement isoélectriques tels que le collagène, ou bien ne contiennent que de faibles densités de charge tels que l'élastine [GRODZINSKY, 1983].

Structure moléculaire

Dans les tissus conjonctifs, les GAG-s se présentent sous forme d'unités disaccharidiques, couplées au noyau d'une protéine (à l'exception de l'acide hyaluronique), appelées les protéoglycannes (PG-s). Les unités répétitives de disaccharides sont constituées d'héxosamine et d'acide héxuronique (à l'exception du sulfate de keratan qui contient du glucosamine et du galactose). Il existe sept groupes de protéoglycannes dans les tissus des vertébrés: l'acide hyaluronique (AH), la chondroïtine 4-sulfate (CS-4), la chondroïtine 6-sulfate (CS-6), le dermatane sulfate (DS), le kératane sulfate (KS), l'héparine sulfate (HS) et l'héparine (H) [COMPER et LAURENT, 1978].

Toutefois, comme l'ont montré GILLARD et coll. (1977), et PEDRINI (1983), la CS, le DS et l'AH sont les seules GAGs détectables en quantités mesurables dans les tendons et les ligaments.

L'AH résulte de la polymérisation d'un motif disaccharidique formé d'acide D-glucoronique lié au N-acétyl-D-glucosamine (figure II.6). La structure de l'AH est linéaire; ses groupements carboxyliques complètement ionisés à pH7, donc chargés négativement, lui permettent de se dissoudre dans l'eau en donnant des solutions extrêmement visqueuses [LEHNINGER, 1981].

La structure de la chondroïtine, très proche de celle de l'AH, n'en diffère que par la nature de l'hexosamine: la N-acétyl-D-galactosamine y remplace la N-acétyl-D-glucosamine.

Le DS est un mucopolysaccharide acide que l'on trouve souvent associé au collagène. Bien que l'on ignore encore la conformation de ces macromolécules à l'état hydraté, le concept de réseaux enchevêtrés est souvent adopté [VIIDIK et coll., 1982].

Structure supramoléculaire

Le poids moléculaire, la conformation et l'état d'aggrégation des PG-s varient beaucoup avec l'âge et aussi d'une espèce à l'autre. Les PG-s du cartilage sont les plus étudiés [COMPER et LAURENT, 1978]. Différentes techniques de coloration ont été utilisées pour l'observation microscopique et histologique de la structure des PG-s [SCOTT et coll., 1980 et 1981; BUCKWALTER, 1983]. Les principaux résultats de ces études structurales peuvent se résumer ainsi: les PG-s existent sous forme de trois niveaux d'organisation et qui sont respectivement, les sous-unités individuelles, les aggrégats, et un niveau créé par l'interaction des sous-unités appartenant à des aggrégats différents.

- Les sous-unités sont formées d'un noyau de protéine en filament portant de nombreuses chaînes de CS et de KS, liées d'une façon covalente. Le noyau filamenteux de protéine comprend trois régions [BUCKWALTER, 1983]. La

région de liaison de l'AH occupe environ un tiers de la longueur totale du noyau de la protéine, et peut s'associer d'une façon réversible à l'eau. La région riche en KS occupe environ un dixième de la longueur, et est adjacente à la région de liaison de l'AH. La région riche en CS varie beaucoup en longueur. De plus, la longueur des chaînes de CS varie d'une sous-unité à l'autre. Par conséquent, la taille et la composition de la sous-unité sont variables.

- Dans le cartilage, la plupart des PG-s existent sous forme d'aggrégats. Les aggrégats se forment à partir des sous-unités PG-s associés d'une façon non covalente à des filaments d'AH à l'aide de petites protéines, appelées protéines de liaison (figure II.7). Ces protéines de liaison et l'AH organisent et stabilisent l'arrangement des sous-unités PG-s. Les filaments d'AH s'attachent aux fibrilles de collagène, et une digestion enzymatique de l'AH rompt

l'organisation en réseau de la matrice et libère les PG-s [BUCKKWALTER, 1983]. Les aggrégats augmentent la viscosité d'une solution protéoglycanne.

- Un troisième niveau d'organisation est dû à l'interaction des sous-unités d'un aggrégat avec celles d'un autre aggrégat. Les chaînes de CS jouent un rôle important dans l'arrangement et la stabilisation de l'organisation inter-moléculaire. Ces aggrégats peuvent occuper un volume important de la matrice, et en se déployant ils maximisent l'exposition des groupes anioniques des chaînes de CS au fluide tissulaire.

La figure II.8 montre une comparaison entre l'arrangement spacial de la fibrille du collagène et des PG-s. Les molécules de la composante PG forment une structure beaucoup moins dense, mais déployée, elle occuperait un volume important.

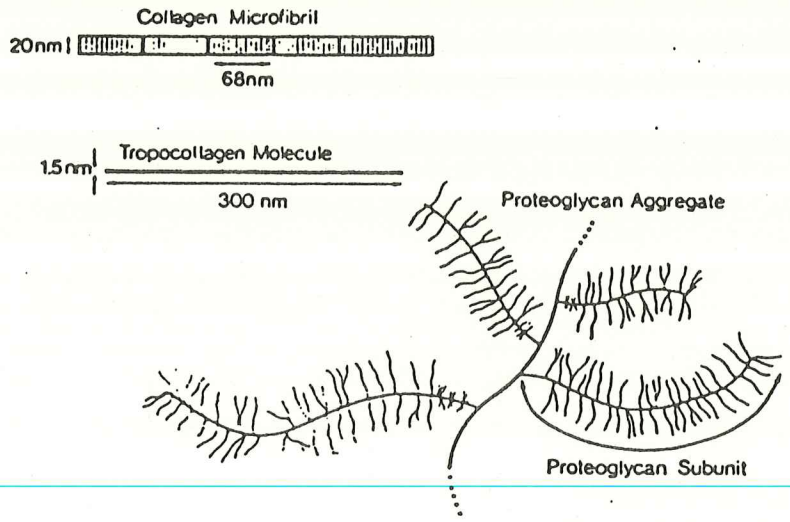


Figure II-8 Diagramme à l'échelle illustrant les formes et les dimensions relatives du collagène et des PG_S. (BUCKWALTER, 1983).

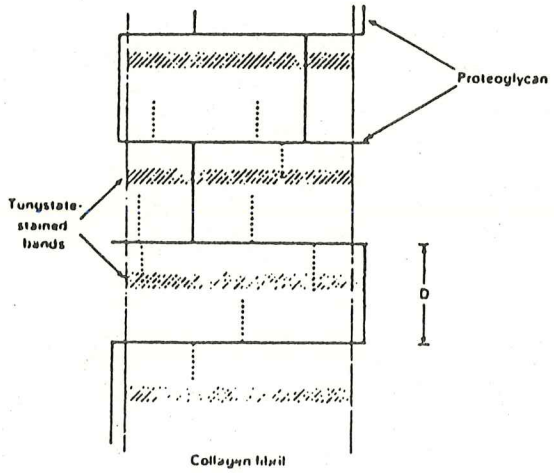


Figure II-9 Diagramme (non à l'échelle) montrant les principales caractéristiques de l'arrangement collagène-PG_S du tendon. D indique la période de striation de la fibrille de collagène. Les lignes discontinues représentent les chaînes GAG_S, et les lignes continues les noyaux de PG_S. (SCOTT, 1980).

L'organisation des GAG-s répond bien aux propriétés mécaniques qu'elles doivent assumer, c'est-à-dire fournir une rigidité et une réponse élastique suffisantes au cartilage [BUCKWALTER, 1983].

Les protéoglycannes dans les ligaments et les tendons

Certains auteurs ont suggéré que la non-linéarité observée dans la région initiale de la courbe contrainte-déformation du tendon est principalement due au cisaillement de la substance GAG, entre les fibres ondulées de collagène [COHEN et coll., 1976; HOOLEY et coll., 1980].

Par ailleurs, nous avons vu précédemment qu'une interaction collagène-glycosaminoglycanne a été suggérée comme étant à l'origine de l'ondulation caractéristique des fascicules de collagène.

GILLARD et coll. (1977) ont déterminé la teneur en GAG dans diverses régions du tendon fléchisseur commun profond des doigts. Dans la région du tendon soumise à la force de tension, le tissu contient 0.2% de GAG-s du poids séché, principalement du DS. La région soumise à une compression latérale contient 3,5% de GAG, soit 10 à 20 fois plus, principalement de la CS. Dans le péritendineum des tendons, l'AH représente environ 50% des GAG-s, [REID et FLINT, 1974, cités par GILLARD1], et est probablement impliqué dans le rôle de ce tissu comme une surface de glissement.

Le DS, associé aux fibrilles de collagène, est le GAG prédominant dans les tissus soumis à des forces de tension (ligament et tendon). En effet, le DS représente 2 mg/g de poids hydraté du tendon d'Achille de lapin et du TQR [SCOTT, 1980 et 1981].

Le DS et l'AH semblent prédominer par contre, dans le tissu foetal. L'AH est également présent dans le ligament rotulien [VAILAS et coll., 1982].

Dans le LCA, où les fibres de collagène ne se chargent pas en même temps, mais séquentiellement, le mouvement relatif entre ces fibres est grand, et l'on peut s'attendre à ce que l'AH soit également présent dans l'espace interfibrillaire et inter-fasciculaire.

L'organisation supramoléculaire des GAG-s, dans les tendons et ligaments n'est pas encore bien comprise. Récemment, VAILAS et coll. (1982) ont rapporté l'existence des trois niveaux d'organisation des PG-s dans différents ligaments: des monomètres (ou sous-unités) de PG-s, des aggrégats de PG et de l'AH à l'état libre.

SCOTT et all. (1980) ont étudié au microscope électronique la structure fine des PG-s du TQR et du tendon d'Achille de lapin. Un réseau de filaments de PG-s, constitué de composantes horizontales et verticales a été observé. Les composantes horizontales sont régulièrement espacées d'une distance égale à la période de striation du collagène. Cet arrangement des filaments de PG-s est attribué à l'existence d'une interaction spécifique

collagène-PG. SCOTT propose un modèle supposant que le PG est constitué d'un noyau polypeptidique portant des chaînes de GAG-s distribuées symétriquement de chaque côté. Le polypeptide étant placé entre les bandes (stries) cationiques du collagène vers lesquelles sont dirigées les chaînes GAG (figure II.9).

II.2.4 Les autres constituants

(a) L'eau: c'est une substance d'origine exogène. L'eau représente environ 65% du poids hydraté du TQR, et dépend de l'âge de l'animal [BETSCH et BAER, 1981]. Dans les tissus mous, l'eau peut être à l'état libre, notamment dans les minces espaces qui engainent les unités fibrillaires. Cette eau, non liée aux macromolécules de la substance fondamentale, circule librement, transportant l'oxygène des nutriments, des sels, et des électrolytes. Elle peut être également associée aux GAG-s de la matrice par des liaisons chimiques ou emprisonnée dans les mailles de l'acide hyaluronique lorsqu'il est fortement polymérisé. Dans ce cas, elle est liée.

(b) Fibroblastes: ce sont les cellules des ligaments et des tendons dont le rôle est de synthétiser les différentes protéines: collagène, élastine, GAG. Ces cellules peuvent exercer des contraintes importantes sur la matrice intercellulaire en raison de leur nature contractile.

(c) Fibronéctine: le fibronéctine est une grande glycoprotéine, présente dans le tissu conjonctif et qui a pour rôle essentiel d'assurer l'attachement des fibroblastes au collagène. C'est une protéine d'adhésion spécifique aux fibroblastes [KLEINMAN, 1982], et qui se trouve en abondance dans les membranes limitantes (i.e. les gaines) [RUOSLAHTI, 1981].

II.3 Interactions des composantes structurales

L'approche macroscopique, considérant les ligaments et les tendons comme des matériaux homogènes, est limitée. Elle ne peut expliquer la relation structure et propriétés de ces tissus. En effet, les propriétés biomécaniques des tissus conjonctifs dépendent de leurs configurations

structurales du niveau moléculaire au niveau macroscopique. La composition et la teneur en protéines, ainsi que les interactions entre les divers constituants jouent également un rôle important dans les propriétés biomécaniques et biophysiques de tissus mous.

Ces considérations remettent en cause de nombreuses études expérimentales "in-vitro", où certains paramètres influençant la microstructure et/ou les interactions biochimiques et morphologiques des constituants du tissu n'ont pas été contrôlés. Le degré d'hydratation, le pH, la température, l'origine et l'histoire du tissu (espèce, âge, état de santé, degré d'activité, etc.) sont des paramètres importants à toute expérience biorhéologique exigeant une minimisation des modifications post-in vivo, et à toute comparaison entre les données expérimentales.

Après avoir considéré la structure moléculaire et supramoléculaire des ligaments et des tendons, il est important de comprendre la nature des liaisons inter-moléculaires du collagène (constituant principal),

responsables de sa résistance en tension. De même, l'interaction de la structure du collagène avec celle du matériau de la matrice (PG-s, élastine, eau, etc.) sera analysée.

Deux approches ont été utilisées pour l'étude des interactions: les études biochimiques et les études biomécaniques. Les études biochimiques, utilisant des techniques d'électrophorèse, de chromatographie d'affinité, etc., sont orientées vers la compréhension des liaisons chimiques entre les macromolécules du tissu.

Les études biomécaniques, utilisant des techniques de digestion séquentielle enzymatique, suivies d'essais biomécaniques, s'intéressent à la compréhension de la contribution de chaque constituant aux propriétés globales du tissu.

Les interactions morphologiques entre les composantes, nous l'avons vu, font l'objet d'études microscopiques.

II.3.1 Liaisons du collagène

Nous avons vu que le collagène de type I constitue environ le tiers des protéines du corps des mammifères, et fournit la "charpente" de la plupart des tissus mous. Il est, non seulement responsable de la résistance mécanique de ces tissus, mais du maintien de leurs formes structurales. C'est pourquoi plusieurs études ont été consacrées à la caractérisation biochimique de cette protéine. Il est maintenant établi que la stabilité physico-chimique et la résistance aux contraintes physiques des fibres de collagène dépendent des liaisons de cette protéine. En effet, par sa nature, une liaison confère une stabilité moléculaire mais confine aussi les molécules en diminuant leur mobilité. Il existe, donc, une arme à double tranchant intrinsèque à la liaison [TANZER et WAITE, 1982]. Les liaisons ont probablement évolué dans le collagène pour fournir une résistance mécanique suffisante aux forces de tension, tout en maintenant une extensibilité de la protéine pour permettre un certain degré de mobilité de sorte que les

ruptures brusques ne se produisent pas. La résistance en tension et la stabilité mécanique du collagène sont assurées par les liaisons inter-moléculaires des molécules constituantes. Des études chimiques de collagène purifié, ont révélé la présence de groupes aldéhydes dans ces polypeptides. Ces aldéhydes proviennent d'une modification enzymatique des acides aminés: lysine et hydroxylysine. Une enzyme, l'oxydase lysyl, isolée à partir de tissus conjonctifs, convertit la lysine et l'hydroxylysine du collagène et de l'élastine, en aldéhydes de liaisons des peptides [NIMNI, 1980].

Les liaisons inter-moléculaires sont formées par l'interaction de ces aldéhydes avec les résidus hydroxylysine des molécules adjacentes (ou fibrilles) [LIGHT et BAILEY, 1980].

Il semblerait que ces liaisons intermoléculaires se produisent entre les télopeptides (régions non-hélicoïdales) d'une rangée de molécules et les parties hélicoïdales des autres rangées adjacentes (figure II.10).

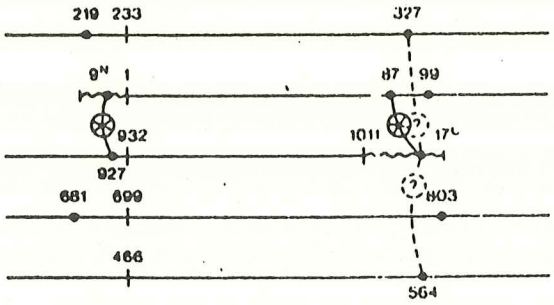


Figure II-10 Liaisons établies et probables dans la région des télopeptides. (VIIDIK, 1979).

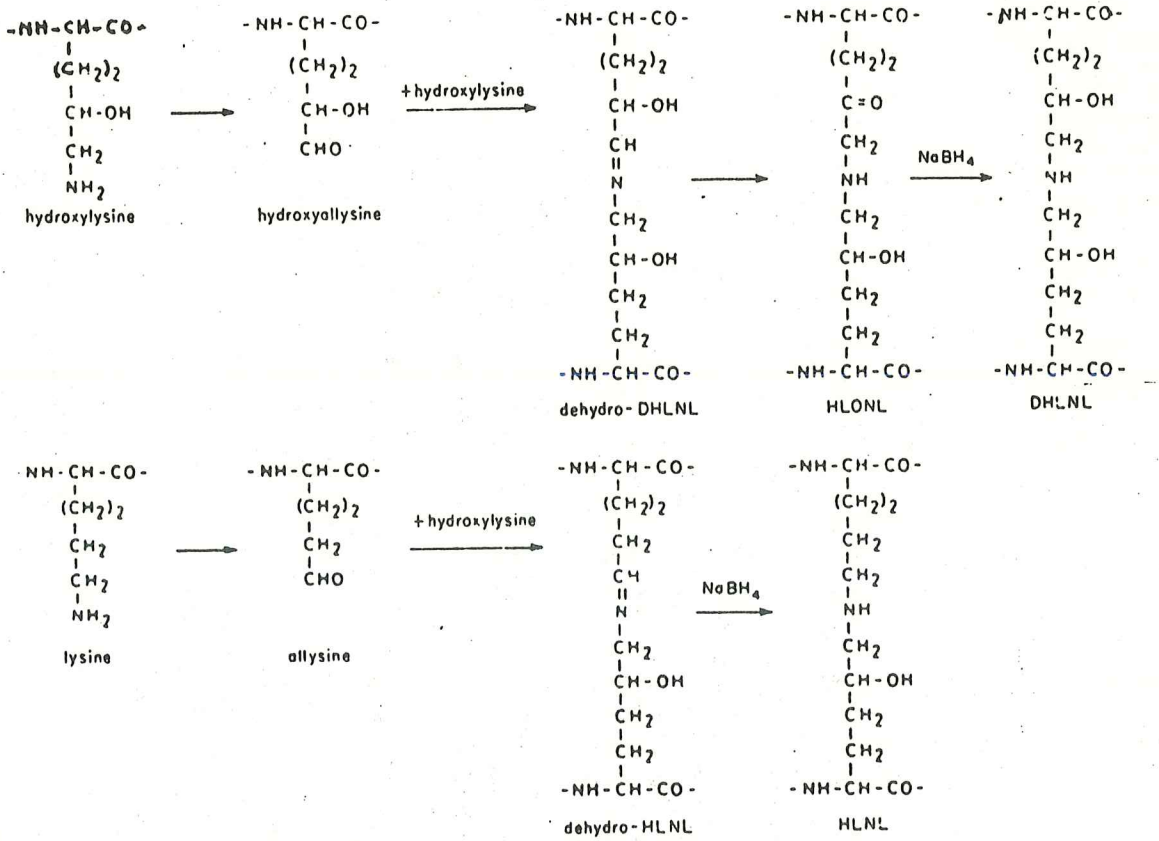


Figure II-11 Structures chimiques des liaisons réductibles. (LIGHT et BAILEY, 1980).

Liaisons_réductibles

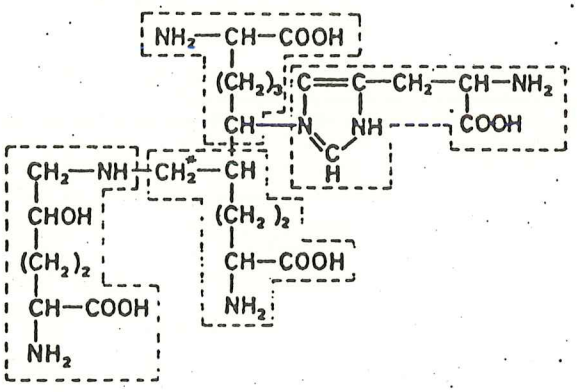
Les aldéhydes sont les précurseurs des liaisons intramoléculaires et inter-moléculaires du collagène. La première étape est la conversion d'un [hydroxy] lysine dans un télopeptide en un [hydroxy] allysine (qui est un aldéhyde) effectuée enzymatiquement par l'oxydase lysyl (figure II.11). Dans l'étape suivante, qui se produit spontanément, cette [hydroxy] allysine est couplée avec un [hydroxy] lysine de la partie hélicoïdale d'une molécule adjacente pour former un aldimine: déhydro-hydroxylysinonorleucine (déhydro-HLNL) [VIIDIK, 1979(a); LIGHT et BAILEY, 1980].

Dans le cas où le télopeptide contient un hydroxyallysine, la liaison primaire (déhydro-HHLN) est spontanément réarrangée en un kétoimine: l'hydroxylysino-5-kéto-norleucine (HLONL), qui est plus stable du point de vue physico-chimique.

Le collagène du tendon, contient des quantités environ égales de ces 2 principales liaisons réductibles (déhydro-HLNL et HLOLN). Par ailleurs, un troisième type de composante réductible, l'histidino-hydroxymérodesmosine (HHMD), peut être isolé en quantité relativement importante, à partir du collagène du tendon réduit au boro-hydrure [BAILEY et PEACH, 1971 cité par LIGHT et BAILEY, 1980].

La structure de cette composante, formée d'hydroxylysine (un produit de condensation aldol de deux allysines) et d'hystidine, est schématisée sur la figure II.12.

Les trois liaisons ci-dessus sont toutes réductibles in vitro par du borohydrure de sodium et sont alors convertis en formes, qui sont beaucoup plus stables du point de vue physico-chimique (par exemple, contre l'action d'acides dilués et de dénaturation thermique).



HISTIDINO-HYDROXYMERODESMOSINE

Figure II-12 Liaisons trouvées en proportion diverse dans du collagène de différents tissus. Les acides aminés qui donnent naissance à ces liaisons, principalement la lysine et les aldéhydes dérivés de la lysine, et l'histidine sont encadrés sur la figure. (NIMNI, 1980).

II.3.2 Interactions

Les tendons et les ligaments sont des matériaux composites constitués principalement d'un réseau de fibres de collagène baignant dans une matrice de PG-s et d'élastine. La nature précise des forces exercées à travers ce réseau est très complexe. Elle est reliée à la fois à l'interaction morphologique ou physique (enchevêtrement mécanique) et aux effets de liaisons biochimiques entre les fibres de collagène, les PG-s, l'élastine, etc.. On connaît très peu de choses sur ces effets d'interaction, principalement parce qu'il est difficile d'examiner l'ultra-structure du tissu pendant l'application simultanée de charges physiologiques.

Interactions morphologiques

L'interaction morphologique est un effet géométrique où il existe une interconnection des composantes du tissu à travers leurs interfaces. Ce type d'interaction (mécanique) peut s'effectuer par contact direct entre deux unités

structurales (collagène-élastine, collagène-PG, ou élastine-PG), ou par l'intermédiaire d'une troisième composante moléculaire (collagène-PG-élastine, collagène-PG-collagène, etc.).

Cependant, en raison du manque d'information sur la microstructure et la micro-architecture de l'élastine et des PG-s, ces interactions morphologiques ne sont pas encore mises en évidence.

Interactions_biochimiques

Nous avons vu que les fibrilles de collagène sont liées entre elles, et probablement aux autres constituants de la matrice par divers types de liaisons chimiques (covalentes, hydrogènes, ioniques ...). Ces liaisons peuvent avoir une influence importante sur le comportement biomécanique du tissu, puisqu'elles influencent la nature des interactions fibre-fibre et fibre-matrice durant la

déformation. Ces interactions déterminent à leur tour les variations de la structure des fibres lors de la déformation.

Plusieurs études biochimiques ont été consacrées à la caractérisation des liaisons entre les macromolécules des tissus conjonctifs. Toutefois, en raison de la complexité du système, ces études n'ont pas encore été au-delà des systèmes binaires (deux composantes).

(a) Interaction collagène-PG

Nous avons vu que les GAG-s sont des polysaccharides qui se lient aux protéines par des liaisons covalentes pour former des PG-s.

La plupart des GAG-s, à l'exception de l'AH n'a pas de groupe sulfate, et du SK qui n'a pas de groupement carboxyl, se lient au collagène par des interactions électrostatiques à pH et force ionique physiologiques [COMPER et LAURENT, 1978; PODRASKY, 1981].

Similairement au GAG-s, la réactivité de l'unité PG réside principalement dans les groupes sulfates des chaînes polysaccharidiques. Le noyau de la protéine protubérante de la molécule PG (figure II.7) représente un site potentiel pour des interactions additionnelles, différentes de celles des chaînes GAG-s. Ainsi, la liaison collagène-PG est plus forte que celle du collagène avec les GAG-s [PODRASKY, 1981]. Cette interaction collagène-PG est due à la liaison électrostatique des groupes acides des PG-s aux radicaux basiques du collagène [JUNQUIERA, 1980].

Il existe certaines différences entre les types de collagène quant à leur liaison aux PG-s. Le collagène type II, présent dans le cartilage articulaire, a une capacité de liaison aux PG-s, plus élevée que le collagène type I et III des ligaments et des tendons [JUNQUIERA et coll., 1980].

L'interaction collagène-AH est encore controversée [PODRAZKY, 1981]. Toutefois, des facteurs autres que les forces électrostatiques, doivent être considérés tels qu'un

enchevêtrement moléculaire (interaction morphologique) ou une interaction entropique.

(b) Interaction élastine-PG

Similairement au collagène, l'élastine peut former des fibrilles en absence des autres substances de poids moléculaire élevé. L'aggrégation de l'élastine soluble est dirigée par des interactions hydrophobes, comme on pouvait s'y attendre en raison de la teneur élevée des résidus non polaires d'acides aminés dans cette protéine (tableau II.3).

L'interaction hydrophobe se réfère à la tendance des groupes non polaires à s'aggréger et à diminuer leur contact avec l'eau.

VELEBNY et coll. (1981) ont montré que durant la coacervation (aggrégation), il existe des interactions électrostatiques entre l'élastine, les PG-s et les glycoprotéines, en plus des interactions hydrophobes entre les chaînes tropoélastines.

Il semblerait que l'interaction élastine-PG a un caractère ionique, généralement connue comme une interaction-polyanionique-polycationique.

(c) Interaction collagène-élastine

Cette interaction n'a pas encore été étudiée du point de vue biochimique. D'un autre côté, l'ignorance de la microstructure de l'élastine jusqu'à maintenant, n'a pas permis la mise en évidence d'interactions collagène-élastine par interconnexion moléculaire ou protéique.

Les seuls résultats dont on dispose sont ceux déduits par digestion enzymatique du collagène, ou de l'élastine, et qui suggèrent que les fibres collagènes sont maintenues dans un état ondulé par l'élastine. OAKES (1977) a montré qu'un traitement à l'élastase d'un tendon provoque son allongement même en absence de chargement (c'est-à-dire un redressement des fibres de collagène).

Toutefois, si l'on se fie aux résultats concernants les interactions collagène-PG et élastine-PG, on peut soupçonner l'existence d'une interaction électrostatique collagène-élastine selon le schéma suivant:

Collagène-PG-Elastine

(d) Interaction GAG-eau

La fonction biologique des polysaccharides est fortement reliée à leurs interactions avec l'eau. L'eau peut être liée par des liaisons hydrogénes ou polaires aux groupes hydrophobes et aux groupes chargées des chaînes de polysaccharides [COMPER et LAURENT, 1978].

Cette interaction GAG-eau fournit une pression osmotique au solvant, situé entre les fibrilles de collagène du tissu. Si l'on retire l'AH du gel inter-fibrillaire, celui-ci se rétrécit et par conséquent le degré de

gonflement du tissu diminue. Le gonflement du tissu est dû à sa teneur en GAG [COMPER et LAURENT, 1978], et à son degré d'hydratation.

(e) Interaction collagène-fibronéctine

Le collagène type I, III et l'AH sont des molécules interagissantes avec la fibronéctine. Des régions spécifiques de la molécule de collagène sont impliquées dans la liaison de la fibronéctine. Dans le collagène type I, le site de liaison est dans α1 (I)-CB7 (CB: désigne les peptides produits à partir du collagène par le bromure de cyanogène). KLEINMAN (1982) a localisé le site de liaison collagène-fibronéctine aux niveaux des résidus 773-780. Toutefois, on ignore encore la nature de cette liaison.

La fibronéctine joue un rôle important durant le processus de guérison des blessures en attirant des fibroblastes vers la zone de plaie. En retardant le fibrillogénèse du collagène, la fibronéctine réglerait, in vivo, la taille du fibrilles de collagène [KLEINMAN et coll., 1981].

CHAPITRE III

OBJECTIFS DE L'ETUDE

III.1 Définition de la problématique

Cette revue de littérature nous montre que la microstructure des ligaments, et en particulier celle du LCA humain, n'est pas encore bien comprise. La plupart des études de caractérisation microscopique des tissus collagéniques ont été faites sur le TQR. La structure du collagène, du moins dans ce type de tissu, est relativement bien connue par rapport à celle des autres composantes structurales (élastine, PG-s). Toutefois, les travaux qui traitent de la structure des ligaments sont, en plus d'être limités au collagène, souvent qualitatifs.

Or, parmi les différentes approches utilisées pour modéliser les ligaments et les tendons, les plus récentes visent à l'interprétation de leur comportement global à partir de la microstructure. Une collecte systématique des données géométriques de la micro-anatomie est donc nécessaire pour toute modélisation structurale de ces tissus.

Par ailleurs, l'analyse de la littérature révèle que les propriétés morphologiques et architecturales des tissus mous varient avec le type de tissu, l'espèce et l'âge. Nous verrons que ces propriétés peuvent également être influencées par d'autres facteurs (l'état de santé, le degré d'activité) qu'il convient de contrôler dans toute expérience de caractérisation microscopique.

Ces considérations nous montrent que plusieurs points concernant la microstructure du LCA restent obscurs et, par conséquent, feront l'objet de la présente étude. Parmi ceux-ci, on peut citer:

(i) L'organisation et l'arrangement du collagène

L'organisation hiérarchique du collagène des ligaments, du niveau moléculaire au niveau macroscopique, n'est pas bien connue. Il en est de même de la forme de la section droite des fascicules et des sous-fascicules de collagène. On ne dispose que très peu de données quantitatives des différentes unités structurales du collagène.

(ii) Morphologie du collagène: ondulation

Le phénomène d'ondulation du collagène n'a pas été étudié en détail. La plupart des auteurs ne décrivent pas si cette ondulation se produit systématiquement sur toutes les unités structurales, ou bien si elle est seulement caractéristique à certaines d'entre elles. On ne sait pas non plus si l'ondulation est régulière et uniforme sur toute la longueur de l'unité où elle se produit. Notons également que la forme de cette ondulation est encore controversée: planaire ou tridimensionnelle, lisse ou en zig-zag. Par

ailleurs, les paramètres de l'onde varient selon l'âge, le tissu et l'espèce (tableau II.2). Ces paramètres doivent donc être déterminés pour le collagène du LCA humain.

Notons enfin que l'origine même de cette ondulation demeure une énigme. Certains auteurs l'attribuent à une interaction entre le collagène et l'élastine, ou bien entre le collagène et la matrice de PG-s. Or jusqu'à présent, ni la localisation, et encore moins la microstructure de l'élastine et des PG-s, n'ont été étudiées dans le LCA. D'autres pensent que c'est un artéfact dû à la préparation des tissus pour l'observation microscopique.

(iii) L'élastine

Les colorants traditionnels de l'élastine, utilisés dans les observations en microscopique photonique, tels que l'hématoxyline classique de Verhoeff, le résorcine-fuchsin de Weigert, et l'orcéine n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de l'élastine dans le LCA canin [DESJARDINS, A., 1981]. Ces colorants agissent par des

liaisons hydrogènes ou par formation de liaisons covalentes entre les aldéhydes du tissu et les groupes amines du colorant.

De même, les colorants standards de microscopie électronique tels que l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, n'ont permis de visualiser que les glycoprotéines microfibrillaires qui entourent l'élastine. L'élastine amorphe demeure largement incolorée et apparaît en MET comme des plages claires sans striation, ni régularité [GUAY et LAMY, 1980; SANDBERG et coll., 1981]. L'élastine ne peut donc être identifiée, sans équivoque, par ces procédures conventionnelles que si elle possède une morphologie reconnaissable.

La structure de l'élastine est encore controversée même dans les tissus élastiques (ligamentum nuchae). La question est de savoir si elle est fibrillaire ou globulaire, c'est-à-dire a-t-elle une structure isotrope ou anisotrope? Les études ultrastructurales de l'élastine ont été limitées par manque de méthode de coloration spécifique,

n'altérant pas sa sous-structure durant la préparation pour la microscopie électronique.

(iv) Les interactions entre les composantes structurales

Le manque d'information concernant la micro-architecture et la microstructure du collagène, de l'élastine et des PG-s n'a pas permis de déterminer les interactions morphologiques et fonctionnelles entre les composantes structurales.

III.2 Objectifs de l'étude

On se propose dans cette thèse d'étudier la microstructure des ligaments du genou, en particulier du ligament croisé antérieur (LCA) et du ligament rotulien (LR).

Cette caractérisation microscopique concerne notamment le collagène type I qui est le principal

constituent des ligaments du genou. L'élastine et la vascularisation seront investiguées principalement dans le LCA canin.

Les principaux objectifs visés par ce travail peuvent s'énoncer ainsi:

- Développer des techniques de préparation des tissus conjonctifs mous pour réduire les artéfacts, et en particulier le rétrécissement des spécimens.

- Déterminer les propriétés morphologiques et architecturales du collagène des ligaments humains et canins (LCA et LR).

- Obtenir des données quantitatives des paramètres structuraux constitutifs des deux types de ligament.

- Etudier la vascularisation tridimensionnelle du LCA et la localisation topographique des principaux vaisseaux sanguins.

- Développer une méthode de coloration de l'élastine pour l'observation au MET, et localiser ensuite cette protéine afin de comprendre l'interaction collagène-élastine.

L'ensemble de ces objectifs permettront de développer une analogie structurale du LCA, nécessaire à la modélisation structurale.

CHAPITRE IV

MATERIELS ET METHODES

IV.1 Structure du collagène

IV.1.1 Acquisition des spécimens

(a) Ligaments canins

Nous avons prélevé, sur le même chien, le ligament croisé antérieur et le ligament rotulien. Une vingtaine de chiens, sacrifiés pour d'autres expériences, ont été utilisés. Dans cette série d'expérience, nous ne disposons pas de l'identité de chaque chien; mais ils sont généralement matures (3 à 8 ans) et de poids variant de 15 à 30 kg. Le tableau IV.1 donne les caractéristiques des chiens identifiés.

Immédiatement après sacrifice, les ligaments ont été excisés, découpés en sections longitudinales et transversales, puis fixés pour éviter tout contact avec l'air.

b) Ligaments humains

Les ligaments humains (LCA et LR) sont prélevés sur des cadavres durant l'autopsie. Le prélèvement de ces tissus a été effectué sur un seul genou, l'autre ayant servi à d'autres expériences biomécaniques. Le temps post-mortem varie de 3 à 23 heures; toutefois, les cadavres étaient conservés au froid jusqu'au moment de l'expérience. La population étudiée est généralement âgée. Le tableau IV.2 résume les caractéristiques des donneurs.

Tableau IV.1

Caractéristiques des chiens utilisés

Age (ans)	Sexe	Race	Masse (kg)
7	M	Malamut pur	29,54
4	F	Colley croisé	20,45
5	M	Berger allemand	19,54
8	F	Fox-terrier	21,80
5	M	Berger allemand	34,55
4	M	Berger allemand	24,55
7	F	Terre-neuvien	27,27
2	M	Malamut	22,73

Tableau IV.2: Caractéristiques des donneurs.

No	Age (ans)	Sexe	Masse (kg)	Cause du décès	Temps post-mortem (heures)	Genou utilisé (D: droit) (G: gauche)
01	54	M	77,25	----------	3	D
02	77	F	65	Cancer des ovaires	18	G
03	62	M	61,35	Infarctus	19	G et D
04	62	F	61,82	Infarctus	15	G et D
05	57	M	77,25	Infarctus	18	G
06	73	F	59,08	Infarctus	5	D
07	58	M	68,17	Infarctus	12	D
08	51	M	86,35	Infarctus	16	G
09	61	F	56,81	MCAS	23	D
10	52	M	72,72	Cirrhose du foie	13	G
11	63	M	73	Amputation (nécrose)	1440	G
12	47	M	68,17	Amputation (nécrose)	2064	D

Remarques

No

---

01 – Spécimen utilisé également pour localisation l'élastine

02 – Sujet immobilisé longtemps avant la mort (os porreux)

03 – LCA prélevé sur genou droit, et LR prélevé sur genou gauche

04 – LCA appartenant au genou gauche, et LR du genou droit

11 - Les ligaments sont prélevés sur une jambe d'un amputé, congelés durant 2 mois à -30°C

12 - Les tissus étaient congelés environ 3 mois à -30°C avant l'expérience

IV.1.2 Préparation des spécimens pour la microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour examiner des échantillons biologiques dans les chambres à vide poussé de microscope électronique à balayage (MEB) ou à transmission (MET), ils doivent être complètement déshydratés. Si ce retrait de l'eau s'effectue par séchage à l'air libre, des distorsions ou des destructions importantes se produisent à cause des forces de tension de surface. Celles-ci peuvent altérer la surface et le volume naturel des échantillons. La méthode de séchage au point critique (SPC) évite la déformation des échantillons biologiques due à ces contraintes de tension superficielle.

(a) Principe de la méthode de séchage au point critique

Pour certains domaines de température et de pression, les fluides existent sous forme de deux phases discrètes (vapeur en équilibre avec liquide) séparées par une interface (la surface du liquide). Considérons une chambre, fermée hermétiquement, remplis à moitié avec du liquide très volatile tel que le dioxyde de carbone (CO_2) à l'état liquide sous pression (figure 4.1). La chambre possède des orifices de remplissage et de ventilation. Si l'on chauffe, le liquide se dilate et s'évapore. Si la chambre est remplie à peu près à moitié, l'évaporation équilibre tout juste la dilatation et le ménisque (interface liquide-vapeur) reste au centre. Toutefois, le liquide dilatant, mais à peu près incompressible, devient moins dense. Par contre, le gaz compressible ou la phase vapeur devient de plus en plus dense. La densité totale du système à deux phases reste constante. L'interface entre les deux phases devient moins distincte et la tension interfaciale (tension superficielle) diminue au fur et à mesure que les

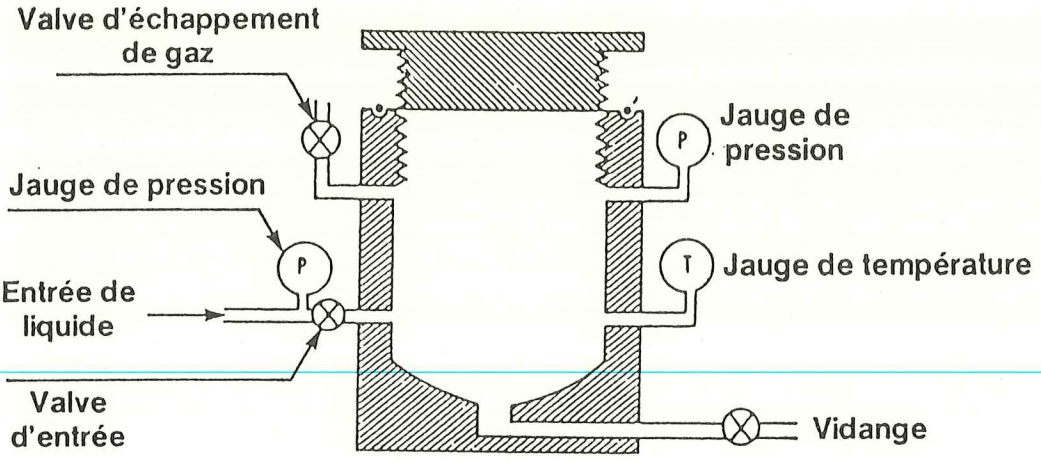


Figure IV.1 Apareil de séchage au point critique.
(COLEMAN, 1975).

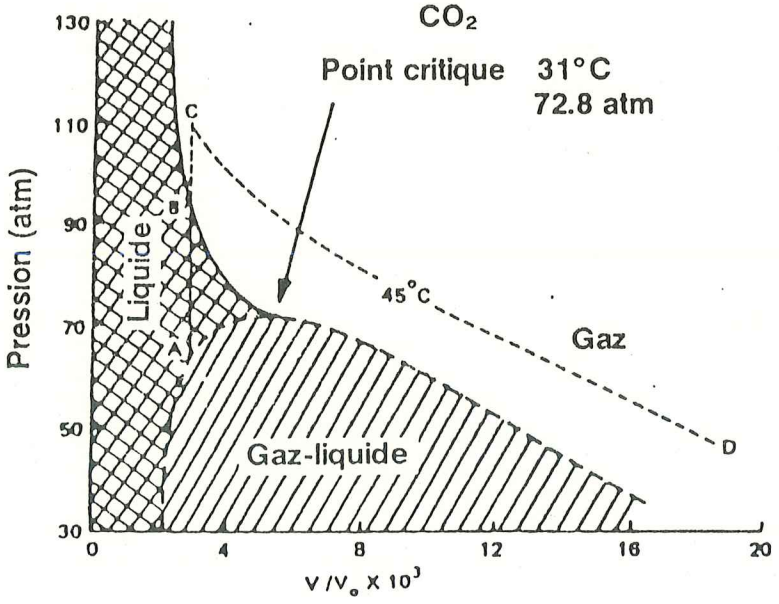


Figure IV-2 Diagramme de phase du dioxyde de carbone montrant le point critique.
(COLEMAN, 1975).

densités et les autres propriétés des deux phases du fluide s'approchent l'une de l'autre. A une température spécifique, la température critique (Tc), les densités et toutes les autres propriétés deviennent identiques. A ce point là, le ménisque ainsi que la tension de surface disparaissent. C'est ce qu'on appelle le point critique (Pc). La pression et la densité du Pc sont respectivement la pression critique (Pc) et la densité critique (Dc). La tension de surface au Pc est toujours nulle. Au point critique, les phases sont réellement continues et le fluide est homogène. Si on augmente la température au dessus de Tc, le fluide devient de plus en plus gazeux.

Si on place un échantillon dans le liquide, et que l'on chauffe au dessus de Tc, l'échantillon est amené d'un environnement liquide à une phase de vapeur sèche sans être en contact avec un interface. Il ne subit donc pas les effets de distorsion de la tension de surface. Si on ouvre légèrement la valve d'échappement pendant que la température est élevée, le gaz s'évacue jusqu'à ce que la pression atmosphérique soit atteinte. L'échantillon est alors séché

et peut être retiré. La figure 4.2 illustre le principe du SPC. On notera que lorsque la chambre est remplie à plus de la moitié avec du CO_2 liquide, le processus suivi est A - B - C, c'est-à-dire que l'on passe au voisinage du point critique.

Idéalement, à cause de la composition des tissus mous (plus de 65% d'eau), l'eau aurait été le fluide de transition de choix au lieu du CO_2. Malheureusement, l'eau possède une température critique de 374°C alors que celle du CO_2 est de 31,3°(tableau 4.3) ce qui peut provoquer des dommages thermiques importants. Le CO_2 est donc utilisé comme un fluide de transition; c'est-à-dire le fluide faisant la transition de la phase liquide à gazeuse. L'éthanol et l'amyl acétate sont utilisés comme fluides de déshydratation parce qu'ils sont complètement miscibles avec le CO_2 liquide [COHEN, 1979].

Tableau IV.3

Propriétés critiques du dioxyde de carbone et de l'eau

Fluides de transition	Température critique Tc (°C)	Pression critique Pc (MPa)
Dioxyde de carbone (CO_2)	31,3	5,138
Eau (H_2O)	374,0	21,995

(b) Procédure de séchage au point critique

(i) Méthode I

Avant l'étape de SPC, les échantillons sont préparés en suivant la procédure standard de fixation et de déshydratation des tissus pour la MEB.

a. Excision

Dès l'ouverture de la capsule articulaire du genou, les ligaments à prélever sont arrosés de fixatif pour éviter les dommages dus au contact avec l'air. Après excision, les tissus sont immédiatement immergés dans le fixatif de glutaraldéhyde (GA) à 2% (voir Appendice B). Tout en baignant dans le GA, les tissus sont ensuite découpés en sections transversales et longitudinales.

b. Fixation

Les échantillons sont alors fixés pendant 2 à 4 heures, au GA 2% tamponné au cacodylate 0,1 M et pH = 7,45 à température ambiante.

c. Lavage

Ils sont ensuite lavés dans trois bains successifs de tampon de lavage à pH = 7,45 durant 30 minutes chacun à température ambiante.

d. Post-fixation

Une post-fixation est effectuée au tétroxyde d'osmium (O_5O_4) à 1% tamponné au cacodylate de sodium dilué à 0,1 M pendant 1 heure à 4°C.

e. Rinçage

Les échantillons sont rincés abondamment à l'eau distillée 3 fois.

f. Déshydratation

Une déshydratation est effectuée dans deux séries de mélange:

- Série eau/éthanol: 30 et 50% d'éthanol pendant 10 min. chacun à 4°C; 70 - 80 - 85 - 90 - 95 - 100 (X3) % d'éthanol durant 15 min. à température ambiante.

- Série éthanol/amyl acétate: 30 - 50 - 70 - 90 - 100 (X3) % d'amyl acétate durant 10 min. à température ambiante.

g. Séchage_au_point_critique_(SPC)

Après la déshydratation, les échantillons sont ensuite séchés au point critique en utilisant un appareil de SPC de type LADD (figure IV.3). On procède de la façon suivante:

- Deux minutes avant la fin du bain à 100% amyl acétate, on refroidit adiabatiquement la chambre de séchage à 10°C, en faisant une circulation de CO_2.

- On place les échantillons dans des grilles en nickel, puis on les introduit très rapidement dans la chambre.

- Aussitôt, on remplit la chambre avec du CO_2 liquide de façon à immerger complètement les échantillons. Après 5 min. d'incubation, on vide

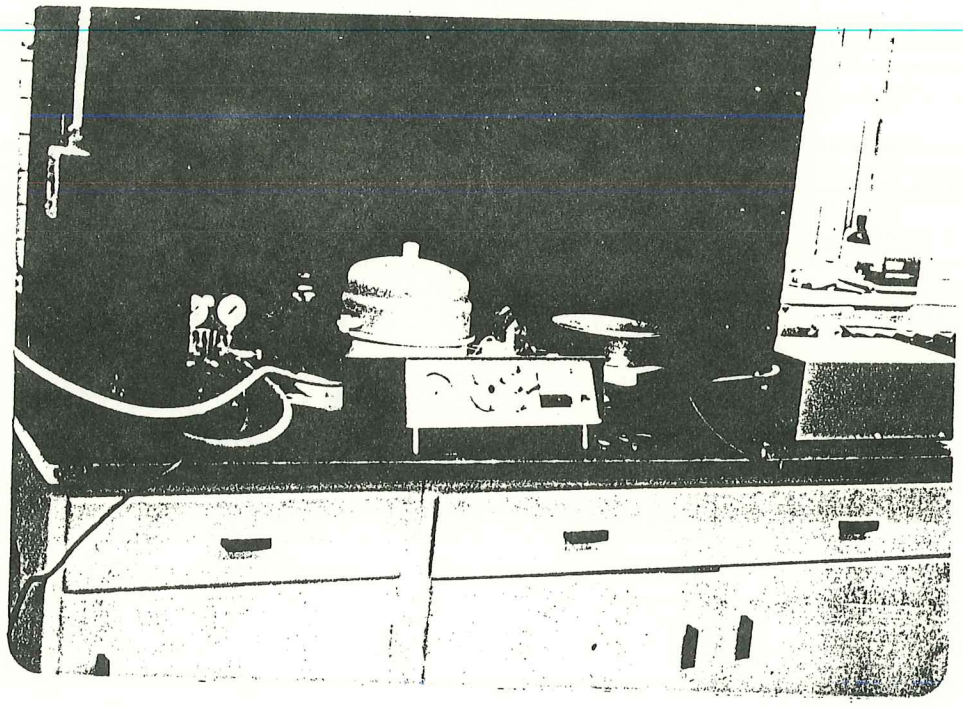


Figure IV.3: Photographie de l'appareil de séchage au point critique.

la chambre. On répète 5 fois ce processus de façon à éliminer le fluide de déshydratation (amyl acétate).

- Ensuite, le niveau de CO_2 liquide dans la chambre est ramené à la moitié (les échantillons étant toujours couverts de liquide). On chauffe alors la chambre en surveillant la montée en température et en pression.

- Au dessus du point critique du CO_2 (T = 42°C, p = 8962,2 KPa), tout le liquide est convertit en gaz. On ajuste la valve d'échappement à environ 690 KPa/minute et on ouvre pour évacuer le gaz.

- Lorsque la pression devient nulle, on ouvre la chambre de séchage pour retirer les échantillons.

h. Enrobage d'or

Les échantillons ainsi séchés sont ensuite fixés sur des supports à l'aide d'une colle d'argent (électroconductives Dotite, type: D 550).

On dépose alors une couche d'or sur les échantillons, par pulvérisation cathodique (de type HUMMER II). Les conditions d'opération sont ajustées de façon à ce que l'élévation de température durant le dépôt d'or n'excède pas 5°C/min. et que la température maximale n'atteigne pas 40°C.

Les échantillons sont enfin observés immédiatement après ou bien placés sous-vide dans un dessicateur.

(ii) Méthode II

La seconde méthode pour préparer les échantillons avant le SPC utilise un traitement à l'acide tannique [KATSUMOTO et coll. 1981; WOLLWEBER et coll., 1981].

On procède de la même façon que la méthode I, pour les étapes a à e, sauf que cette fois ci le fixatif GA à 2% est tamponé au phosphate à 0,1 M et pH = 7,2. De plus, après le rinçage (étape e), les échantillons sont traités dans un bain d'acide tannique à 1% dans du tampon cacodylate à 0,05 M et pH = 7,2 pendant 1 heure à température ambiante. Ils sont ensuite rincés dans une solution saline (0,9%) trois fois avant d'être déshydratés (étape f), séchés au point critique (étape g) et couverts d'or (étape h).

(iii) Méthode III

Dans cette méthode, les échantillons ont été soumis à une digestion enzymatique immédiatement après excision. Deux enzymes ont été utilisés lors de ce traitement:

Elastase: (Worthington) La concentration utilisée est de 25 mg/200 ml de tampon de carbonate de sodium (0,05 M de Na_2CO_3, 0,01% de NaN_3) ajusté au

pH = 8,8 avec du Hcl. La température de digestion est de 37°C, et la durée de digestion de 19 heures.

Hyaluronidase: (Worthington) La concentration est de 1500 unités/150 ml de solution tampon d'acétate de sodium (0,1 M, pH = 5,4, à 37°C) contenant du NaCl (0,75 M) et 0,01% de NaN_3. La température de digestion est de 37°C, pendant 24 heures.

Les échantillons sont ensuite fixés et séchés au PC selon la méthode I.

(c) Evaluation du rétrécissement du tissu lors du SPC

Bien que la méthode de SPC assure une bonne préservation des structures de surface, un rétrécissement du tissu semble inévitable [LEE et coll., 1979].

Les mécanismes du rétrécissement ne sont pas encore identifiés. Toutefois, l'extraction possible de matériaux

cellulaires durant la fixation, la déshydratation et le SPC des échantillons pourrait y jouer un rôle.

Des réactions cytochimiques pourraient stabiliser les tissus biologiques pour leurs permettre de résister aux forces moléculaires de contraction et empêcher ainsi leur rétrécissement. L'acide tannique, en raison de son effet mordant lorsqu'il se combine aux ions de tétroxyde d'osmium, a été récemment suggéré [KATSUMOTO et coll., 1981, WOLLWEBER et coll., 1981].

Nous avons évalué le rétrécissement des échantillons de cinq ligaments provoqué par la méthode conventionnelle de préparation des tissus pour le SPC (méthode I), et par la méthode utilisant un traitement à l'acide tannique (méthode II).

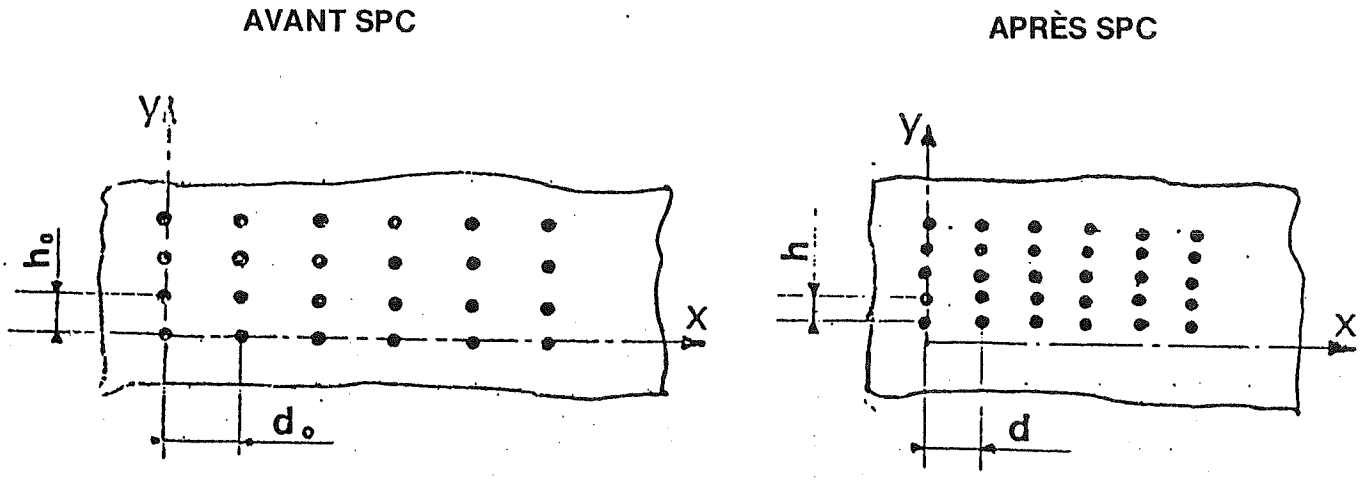
Des billes d'acier de 1/32" de diamètre ont été collées (colle cyanoacrylate) sur la surface des échantillons, après la fixation au GA (étape b). Ces billes ont été disposées en rangées parallèles telles qu'illustrées

par la figure IV.4. Le spécimen est ensuite placé dans un bac, contenant du fixatif et qui est fixé sur un dispositif amovible dans les deux directions X et Y à l'aide de vis micrométriques (figure 4.5). Un microscope stéréoscopique permet de repérer le centre des billes (cibles).

Les coordonnées (X,Y) de chaque bille ont été mesurées après la fixation au GA, puis après le SPC. Le rétrécissement linéaire est ensuite calculé dans la direction axiale et transversale de la surface du tissu, en faisant la moyenne de dix mesures entre deux billes consécutives pour chaque direction.

(d) Méthode de Batson (1935)

Immédiatement après sacrifice, les artères fémorales du chien sont dénudées sur environ 3 cm au niveau des arcades crurales. Une aiguille de calibre 18 est introduite et maintenue en place par deux noeuds avec du fil Dexon ooo. Les artères tibiales sont clampées avec des pinces hémostatiques. Les vaisseaux sont perfusés, au



Rétrécissement axial: $s = \frac{d - d_o}{d_o}$

Rétrécissement transversal: $h = \frac{h - h_o}{h_o}$

Figure IV-4 Mesure du rétrécissement axial et transversal.

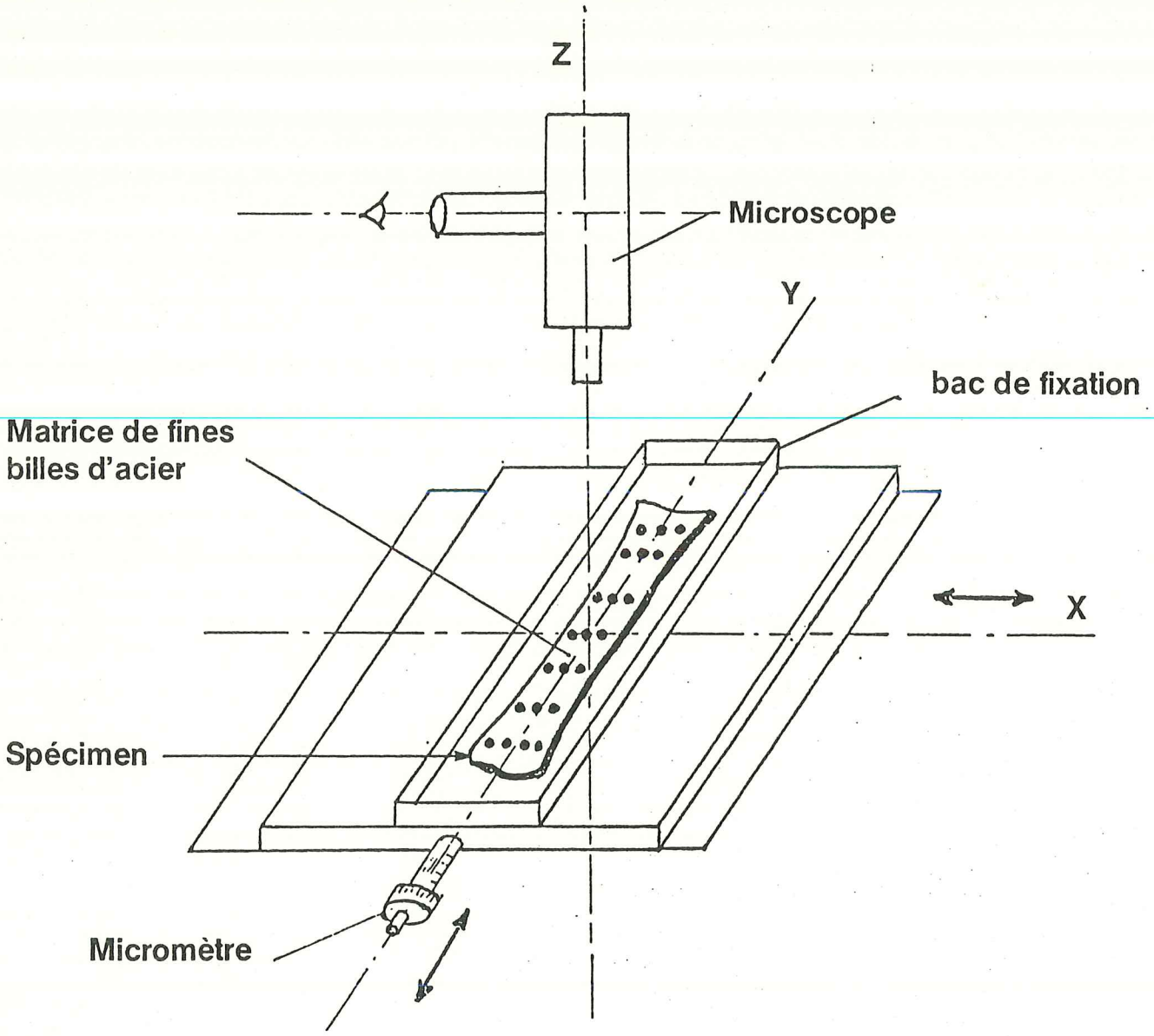


Figure IV.5 Montage de mesure du rétrécissement

préalable, avec 200 à 300 ml de solution NaCl physiologique V (0,9%) pour retirer les caillots sanguins de l'arbre vasculaire.

Ensuite, une solution de Batson no 17 est préparée. Elle consiste en 20 ml de manomètre de base (polysciences, inc. cat. 2599), 3 ml de catalyseur (corrosion compound component B, cat. 2608), 0,15 ml de promoteur (corrosion compound component C, cat 7349), et environ 1 ml de pigment rouge (Batson's Red Pigment, cat. 7350). Ce mélange est agité pendant environ 30 secondes, puis injecté sous-pression manuelle dans l'artère fémorale. L'injection doit être complétée en deça de 20 minutes à cause de la polymérisation rapide de cette solution de Batson. Deux heures plus tard, on sectionne le fémur à 5 cm au-dessus du genou et on désinsère le LCA de son attache tibiale. On immerge ensuite le spécimen dans une solution "corrosive" de KOH à 10%. Toutes les 2 heures, on retire le spécimen de la solution de macération pour le rinser à l'eau. Au bout de 12-24 heures, les tissus mous sont digérés et l'arbre vasculaire apparaît jusqu'aux fines

ramifications capillaires. Finallement, après un rinçage à l'eau, les spécimens ont été séchés, montés sur des supports d'aluminium et recouverts d'or pour être observés au MEB.

IV.1.3 Préparation des spécimens pour la microscopie électronique à transmission (MET)

Les coupes minces des tissus étudiés sont préparées au laboratoire de microbiologie de l'Université de Montréal. La procédure suivie est celle décrite par GLAUERT (1974) et décrite à l'appendice C.

IV.1.4 Méthodes d'observation et d'analyse

Les observations microscopiques des échantillons séchés au Pc ont été effectuées au microscope électronique à balayage. Trois microscopes furent utilisés au cours de ce travail: Jéol JSM T20, T300 et 840. La tension d'accélération varie de 15 à 25 KV. Les clichés ont été réalisés à des grossissements allant de 30 à 60 000 fois avec des films Kodak P x P.

Les observations des coupes ultrafines ont été faites sur un microscope électronique à transmission de type Jéol 100-Cx avec une tension d'accélération de 40 à 60 KV, et un courant de faisceau de 40 µA.

L'analyse morphométrique des différentes unités structurales du collagène (fascicules, sous-fascicules) a été réalisée à l'aide d'un analyseur d'images (Quantimet 720, type Imenco), équipé d'un calculateur extérieur. Cet appareil permet de déterminer, à partir des photographies, l'aire de la section droite des structures analysées. Le pourcentage d'aire occupé par le collagène, dans une région donnée de la section transversale du ligament, est également obtenu.

Certaines mesures d'aire des sections droites des unités de collagène ont été effectuées à l'aide d'un planimètre OTT de type 31. Chaque mesure a été répétée une dizaine de fois et on prend la moyenne. La précision du

planimètre a été évaluée sur une vingtaine de mesures. La déviation standard de cet appareil est de 2%.

Le diamètre des fibrilles et des fibres de collagène, ainsi que les paramètres d'ondulation (période, amplitude) ont été mesurés directement sur les microphotographies.

IV.2 Localization de l'élastine par la technique enzyme-or

IV.2.1 Description de la technique

(a) Choix de la méthode

Des techniques de coloration de l'élastine pour la MET ont été proposées ces dernières années (tableaux II.4 et II.5). Toutefois, la plupart de ces méthodes ont été développées pour des études structurales des tissus riches en élastine (ligamentum nuchae, aorte). Or si l'on se base sur des données disponibles concernant la composition des

tissus mous, les ligaments articulaires du genou ne contiendraient que 2 à 5% d'élastine (tableau 1). De plus, cette faible quantité d'élastine baignerait dans une matrice de matériau amorphe (probablement des glucides) qui masque sa substructure [CLIFF, 1971; KATSUDA, 1982]. Un traitement prolongé au tétroxyde d'osmium ou à l'acide périodique peut permettre la digestion du matériau de la matrice (les portions de glucides) et de révéler ainsi l'élastine. Cependant, ces produits attaquent également les glycoprotéines microfibrillaires et introduisent des artéfacts [AARON et GLOSLINE, 1980]. L'acide phosphotungstique (PTA), utilisé par ailleurs pour augmenter la densité électronique de l'élastine, s'attache également aux carbohydrates polymérisés par des liaisons hydrogènes des molécules de sucre [KADAR, 1979]. Le PTA se combine aussi au collagène et ne constitue pas un colorant spécifique à l'élastine [DAMIANO et coll., 1979].

Les techniques de cryo-fracture et de répliques, bien qu'intéressantes, nécessitent l'emploi d'appareils très

sophistiqués dans lesquels on puisse maintenir un vide, très poussé, de l'ordre de 10^{-8} mmHg.

Les méthodes récentes d'immuno-électron microscopie et d'immuno-cytochimie nécessitent de soulever des anticorps anti-élastine suffisamment spécifiques. Elles exigent donc une certaine expertise dans les méthodes immunologiques, d'autant plus que les anticorps anti-élastine ne sont pas disponibles sur le marché.

Ces considérations nous ont conduit à utiliser une technique cytochimique pour identifier et localiser l'élastine dans le ligament croisé antérieur. Cette technique, développée récemment pour une localisation ultrastructurale des acides nucléiques, utilise des complexes enzyme-or [BENDAYAN, 1981]. L'enzyme est un réactif qui se combine avec le substrat pour former un complexe enzyme-substrat. La technique enzyme-or utilise cette affinité élevée qui existe entre une enzyme et son substrat, pour localiser les macromolécules. Le principe de cette méthode consiste, dans un premier temps, à marquer

l'enzyme à l'aide d'un traceur de densité électronique élevée, et de l'appliquer ensuite sur des sections minces de tissu pour révéler son substrat correspondant (figure IV.6).

(b) Enzyme: élastase

Dès sa découverte [LANSING et coll., 1952], l'élastase fut utilisée dans les méthodes cytochimiques en microscopie électronique. KADAR (1979) a utilisé une digestion directe à l'élastase sur des sections ultrafines et enrobées dans une résine soluble dans l'eau. L'élastase employée (porcine pancreatic) avec une concentration de 6,4-IU/ml (pH = 8,8, T = 37°C) permet de digérer spécifiquement l'élastine mature sur des sections ultrafines. KADAR a montré que cette enzyme digère complètement la zone centrale amorphe (c'est-à-dire l'élastine) de la lamelle élastique de l'aorte de rat. Par contre, les protéines microfibrillaires résistent à l'effet digestif de l'élastase. Par conséquent, cette enzyme est spécifique à l'élastine, et a été choisie pour préparer nos complexes élastase-or.

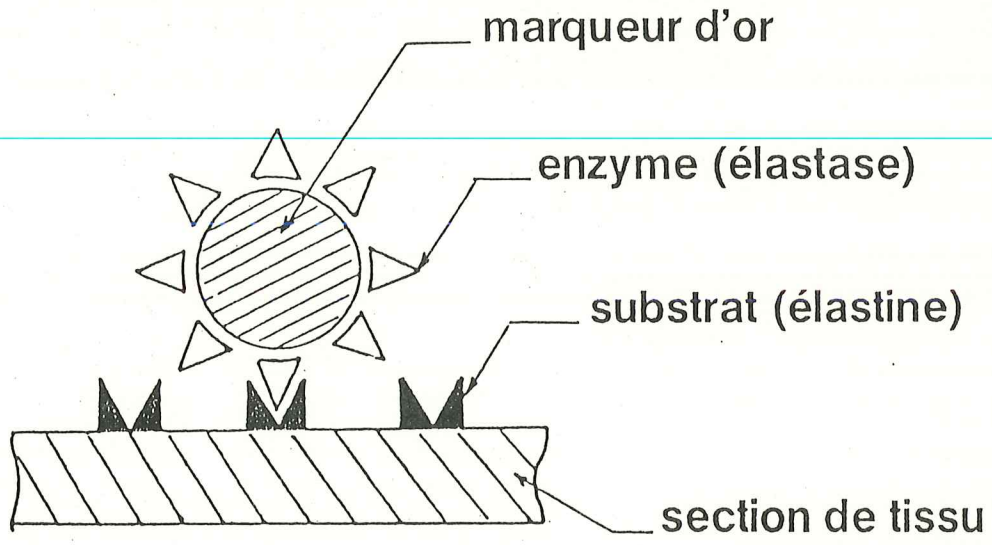


Figure IV-6 Technique Enzyme-Or. Les molécules d'élastase entourant la particule d'or interagissent avec leur substrat correspondant présent à la surface de la section du tissu.

(c) Traceur: or colloïdal

L'or colloïdal est utilisé comme traceur en raison de ses divers avantages et de sa versatilité. Les particules d'or ont une densité électronique élevée et sont donc facilement détectables par MET. De plus, leur forte émission d'électrons secondaires permet leur visualisation au MEB également [HORISBERGER, 1981].

Acquisition des spécimens

(a) Spécimens d'étude

Les spécimens canins sont prélevés sur des chiens ayant servi au préalable à d'autres expériences. Immédiatement après sacrifice, on ouvre la capsule articulaire et on arrose in-situ le LCA avec du fixatif. On procède ensuite à l'excision du tissu, tout en le maintenant dans le fixatif.

Les spécimens humains sont prélevés sur des cadavres durant l'autopsie. Le temps post-mortem avant la fixation du LCA varie de 3 à 19 heures.

Le tableau IV.4 résume les caractéristiques des donneurs des spécimens étudiés.

(b) Spécimens de contrôle

Pour les ligaments canins, nous avons utilisé l'aorte comme tissu de contrôle. Nous savons que ce tissu contient environ 40% d'élastine (tableau II.1) localisée essentiellement dans les lamelles élastiques internes et externes [KADAR, 1979].

Pour l'étude de l'élastine dans le LCA humain, nous avons utilisé l'artère du poplité (continuité de l'artère fémorale) pour des raisons de commodité. Selon PURINYA et coll. (1975), l'artère contient environ 15% d'élastine et se trouve localisée également dans les lamelles élastiques.

Tableau IV.4: Identification des spécimens

(1) Spécimens canins

Race	Sexe	Age (ans)	Masse (kg)	Temps post-mortem avant fixation (heures)	Numéro d'expérience
Labrador	F	4	24,5	0	C01
Berger Allemand	M	5	25	0	C02
Terre-Neuve	F	7	30	0	C03

(2) Spécimens humains

Sexe	Age (ans)	Masse (Kg)	Cause du décès	Temps post-mortem avant fixation (heures)	Numéro d'expérience
F	58	44,6	Leucémie	7	H01
M	60	77,84	Cancer poumon	19	H02
M	48	72	Cirrhose du foie	3	H03

Préparation du complexe élastase-or

(Bendayan, 1981)

(a) Préparation de l'or colloïdal de diamètre 14,5 nm

L'or colloïdal est préparé à partir de l'acide chloroaurique (BDH, code: B27686, chemicals Toronto) par un agent réducteur (citrate de sodium).

Les récipients utilisés pour la préparation doivent être "siliconisés", c'est-à-dire trempés dans H_2O avec du silicot (sigma).

A partir d'une solution stock de 2% d'or dans H_2O, conservé au frais, on prépare une solution de 0,01% d'or. On chauffe cette solution jusqu'à ébullition, puis on ajoute 4 ml de citrate de sodium à 1% diluées dans H_2O. On laisse bouillir jusqu'à ce que la solution devienne rouge, ensuite on la refroidit sous un jet d'eau ou bien en la plaçant à 4°C pendant 1 heure.

(b) Contrôle du pH de la solution d'or

Pour l'élastase, le pH de suspension de l'or est de 8,5. Si le pH n'est pas exact, il y aura flocculation (le complexe devient bleu).

Pour contrôler le pH, on utilise un pH mètre mais avec des petites quantités de solution d'or (5 cc).

D'abord, on doit stabiliser l'or colloïdal par une solution de 1% de polyéthylène glycol (PEG) - 2 gouttes. En effet, les particules d'or sont chargées négativement et se repoussent les unes des autres. Pour éviter que l'électrode du pH mètre ne soit recouverte de particules d'or, il faut stabiliser, au préalable, l'or colloïdal par du PEG.

Pour ajuster le pH à 8,5, on ajoute du potassium K_2CO_3 à 0,2 M directement à la solution d'or. Si le pH n'est pas correct, on peut ajouter du HCL dilué (HCL à 1N: 1 1/5cc).

N.B.: On jette à chaque fois la solution d'or (5 cc) ayant servie pour lire le pH.

(c) Préparation du complexe élastase-or

On utilise 0,5 mg d'élastase (pancreatopeptidase E, sigma), dissous dans 2 gouttes d'H_2O distillée (conservée à froid dans un tube siliconisé).

On ajoute 10 ml de solution d'or (non touchée au PEG) à la solution d'élastase.

On prend un deuxième tube pour balancer la centrifugeuse (les 2 tubes doivent avoir le même poids).

Les mélanges sont ensuite centrifugés à 25 000 tours/minute pendant 30 min. à 4°C dans un rotor Beckman Ti50. La centrifugeuse utilisée est de type Beckman LS-65B, équipée d'un rotor à angle fixe.

Après centrifugation, on obtient un précipité (un point) collé à la paroi du tube et des sédiments. On pipette pour retirer le supernatant. Le sédiment rouge-foncé formé par le complexe élastase-or est resuspendue dans du PBS (0,01 M) contenant 0,02% de PEG. Le pH de cette solution tampon (PBS) doit être de 8,5 pour l'élastase.

Le complexe élastase-or est ensuite conservé à 4°C et utilisé dans 3 jours au plus tard.

Préparation des spécimens

La procédure de préparation des spécimens est la même que celle décrite à l'appendice C pour la MET. Toutefois, la fixation à l'acide osmique n'est pas effectuée car elle diminue l'intensité du marquage cytochimique [BENDAYAN, 1981]. Avant l'étape de coloration, les coupes ultrafines de tissu sont marquées avec le complexe élastase-or.

(a) Marquage_cytochimique_et_coloration_des_coupes

La procédure de marquage cytochimique des grilles de tissu est la suivante:

- Incubation des coupes sur une goutte de solution tampon de phosphate (PBS) à pH = 8,5 à 9 pendant 5 minutes à température ambiante.

- Incubation ensuite des coupes sur une goutte du complexe élastase-or. Le temps d'incubation varie de 30 minutes à 1 heure.

- Rinçage des coupes au PBS, puis abondamment à l'eau distillée pendant 3 minutes.

- Séchage des coupes à l'aide de papier absorbant.

- Coloration à l'acétate d'uranyle (2%) pendant 7 à 10 minutes, à l'abri de la lumière.

- Rinçage à l'eau distillée (3 minutes).

- Coloration au citrate de plomb pendant 5 minutes, en absence de CO_2 et de la lumière.

- Rinçage à l'eau distillée, puis séchage des coupes.

(b) Contrôle du marquage

Les résultats du marquage cytochimique dépendent, non seulement de la préparation du tissu, mais aussi de la qualité du complexe élastase-or. Durant la préparation de celui-ci, chaque étape peut être critique quant à sa spécificité. Lors du marquage proprement dit, la concentration du complexe, la durée et la température d'incubation des coupes sont des facteurs déterminants. Ainsi, pour chaque complexe fraichement préparé, nous procédons au contrôle du marquage en vue de déterminer les conditions optimales.

Pour ce faire, lors de chaque marquage, nous traitons simultanément deux coupes: une coupe de LCA (spécimen d'étude) et une coupe aortique (spécimen de contrôle), de sorte que les conditions de marquage soient exactement les mêmes. On vérifie la qualité du marquage, en observant le spécimen de contrôle au microscope électronique. Si le marquage est trop intense, on dilue le complexe avec du PBS (0,01 M, pH = 8,5) jusqu'à l'obtention d'une intensité jugée correcte (très peu de bruit de fond).

On procède ensuite à des essais de marquage, en utilisant différents temps d'incubation des coupes dans le complexe, pour déterminer la durée optimale d'incubation. Généralement, au-delà de 30 minutes, le complexe élastase-or sèche et devient difficile d'enlever par rinçage les particules d'or non spécifiques.

Observations microscopiques

Lors du marquage cytochimique, nous avons utilisé, pour vérifier la qualité du marquage, un microscope électronique Philips (EM 300) avec un voltage d'accélération de 80 KV.

Les observations systématiques ont été effectuées ensuite sur un microscope électronique Jéol 100 Cx avec un voltage d'accélération de 40 KV et un courant du faisceau de 40 µA.

CHAPITRE V

RESULTATS

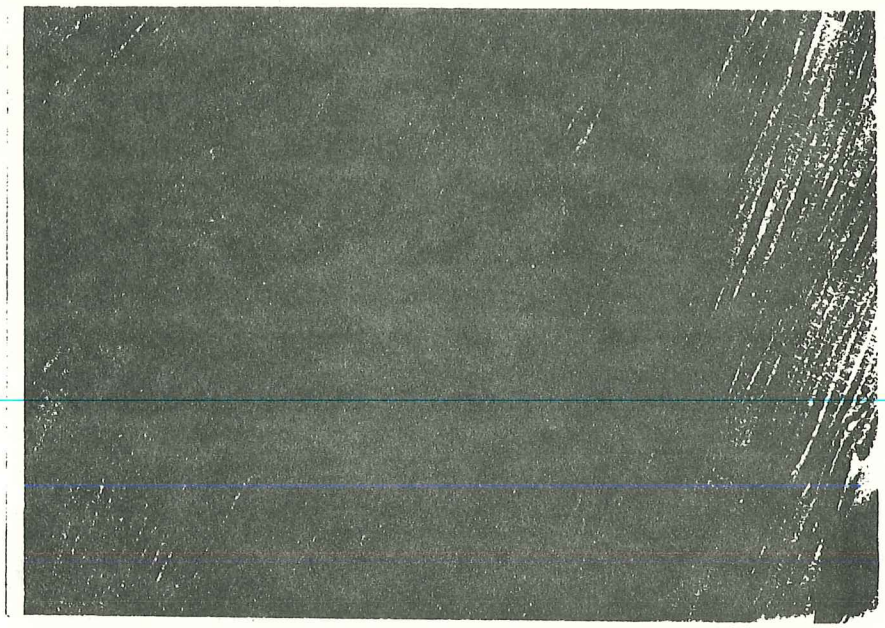
V.1 Structure du collagène

V.1.1 Organisation hiérarchique

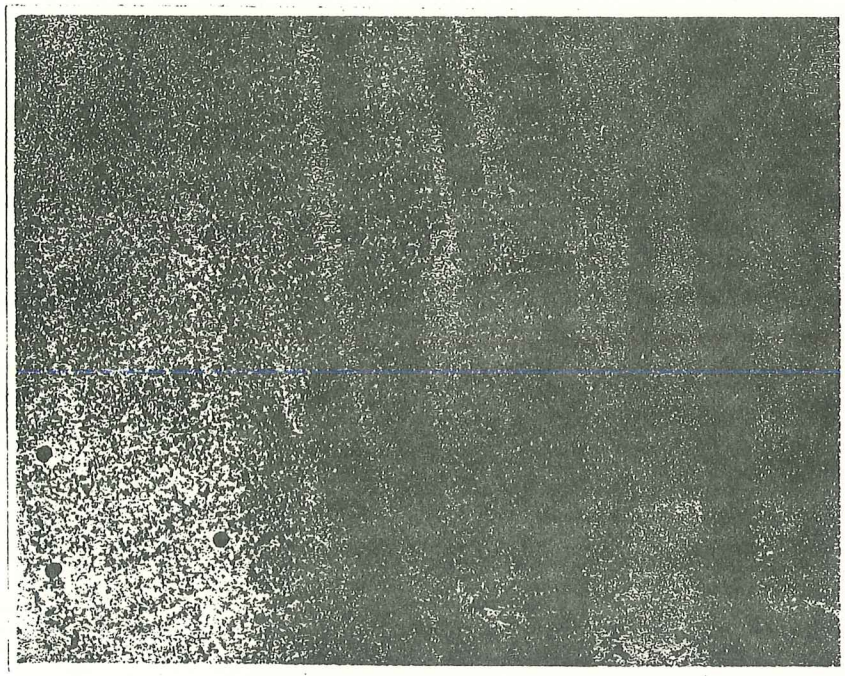
Nous avons vu au chapitre II que dans la plupart des tissus conjonctifs mous, le collagène type I s'assemble dans une hiérarchie structurale du niveau moléculaire au niveau macroscopique. Par ailleurs, indépendemment du type de tissu ou de l'espèce, cette hiérarchie d'organisation du collagène serait la même pour les quatre premiers niveaux, soit successivement les acides aminés, la molédule de tropocollagène, les microfibrilles et les fibrilles. Par contre, au-delà du niveau fibrillaire, des différences inter-espèces ou inter-tissulaires ont été rapportées.

Nos observations au MET et au MEB nous ont permis d'étudier cette organisation, à partir du niveau supramoléculaire (fibrille) jusqu'au niveau macroscopique (ligament), aussi bien dans les ligaments humains que dans les ligaments canins.

La plus petite unité structurale observée est la fibrille de collagène. Au MET, elle est caractérisée par une striation de périodicité d'environ 67 nm. La plaque V.1 montre que le diamètre des fibrilles est variable. A un grossissement de 100 000 fois, les fibrilles striées paraissent être disposées parallèlement à l'axe longitudinale. De plus, les stries de fibrilles adjacentes semblent être alignées. Au MEB, jusqu'à des grossissements de l'ordre de 30 000 fois, la striation régulière n'est pas visible (plaque V.2). Ceci suggère que la striation n'est pas un phénomène de surface, mais plutôt un arrangement interne de la fibrille. Il est possible également que la morphologie de la fibrille soit masquée par la gaine de



A



B

Figure V.1: Fibrilles de collagène Type I du LCA (MET). (A) Arrangement parallèle des fibrilles de LCA canin(X 32500). (B) A plus fort grossissement, on distingue la striation caractéristique des fibrilles du LCA humain (X 100000).

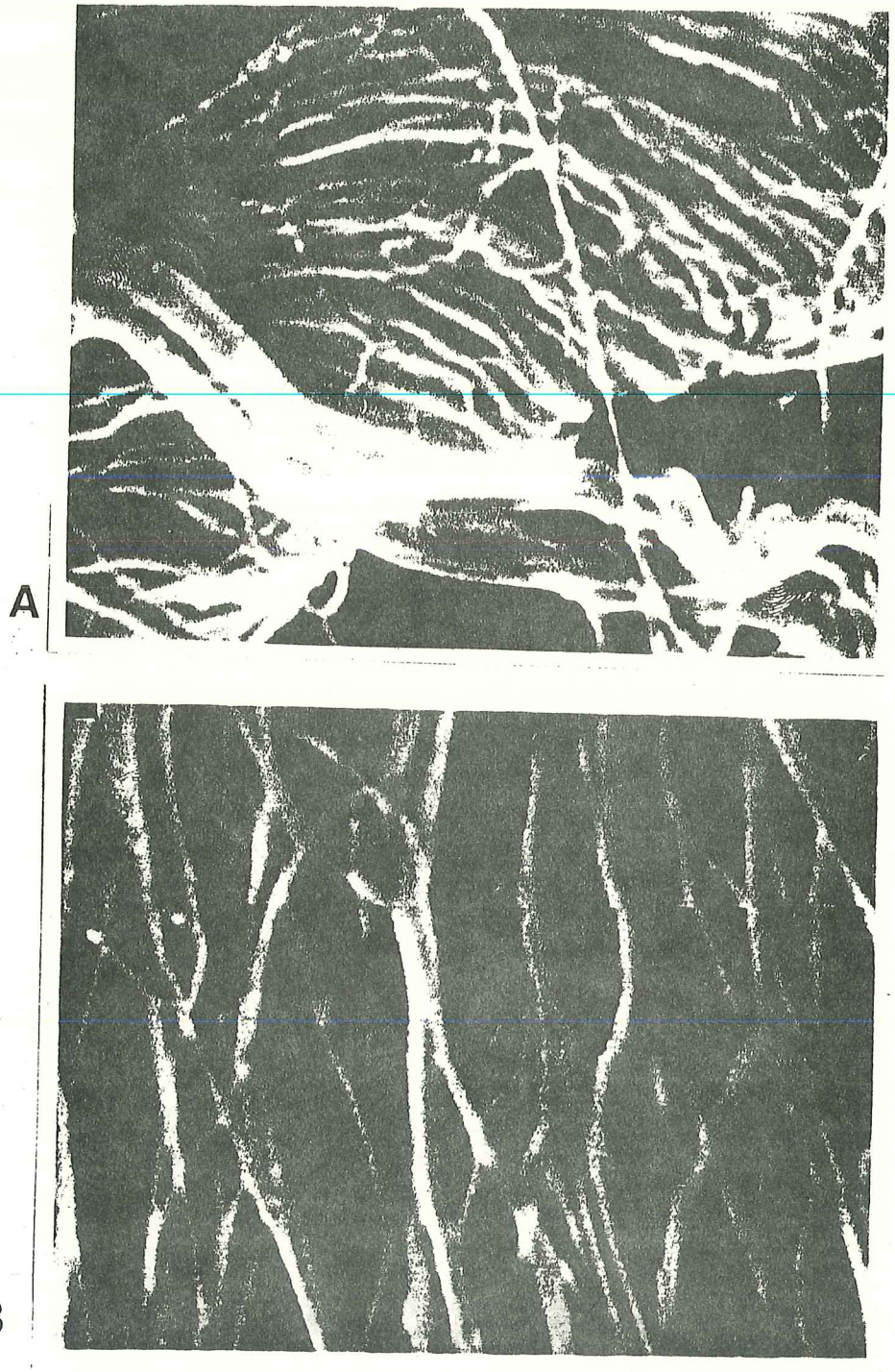
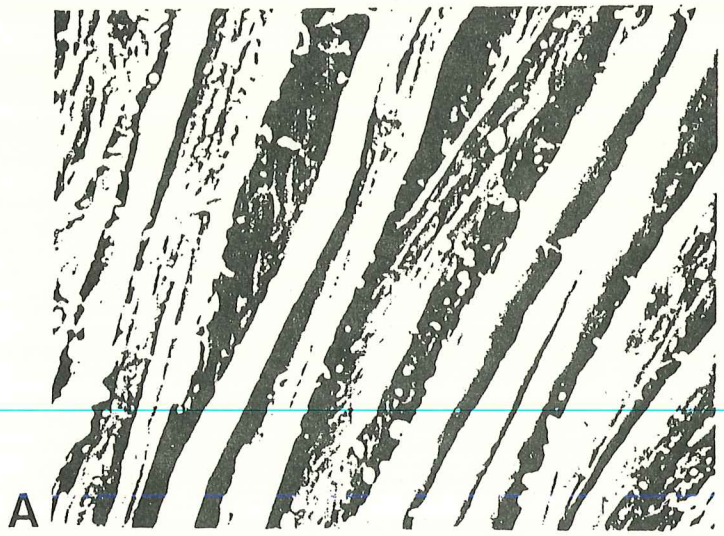


Figure V.2: Fibrilles de collagène Type I du LCA humain (MEB). (A) Au MEB, même à fort grossissement, la striation caractéristique n'est pas visible(X 30000). (B) Fibrilles et sub-fibrilles du LCA(X 30000).

Henlé. La plaque V.2 montre, par ailleurs, que les fibrilles sont composées de petites fibrilles, appelées sub-fibrilles.

L'arrangement des fibrilles constitue le prochain niveau d'organisation du collagène. Plusieurs fibrilles s'assemblent pour former une fibre de collagène. La plaque V.3 montre des fibrilles disposées en parallèle. Des fibrilles disposées en réseau tridimensionnel pour former la fibre ont également été observés (plaque V.4). Ces figures montrent que la direction de la majorité des fibres est parallèle à l'axe longitudinal du ligament. Toutefois, il n'est pas clair si les fibres ont un arrangement tridimensionnel ou parallèle. Un grand nombre de fibres forment l'unité sous-fasciculaire. On reconnaît le sous-fascicule à la gaine de tissu conjonctif lâche qui l'entoure (l'endotendineum).



A



B

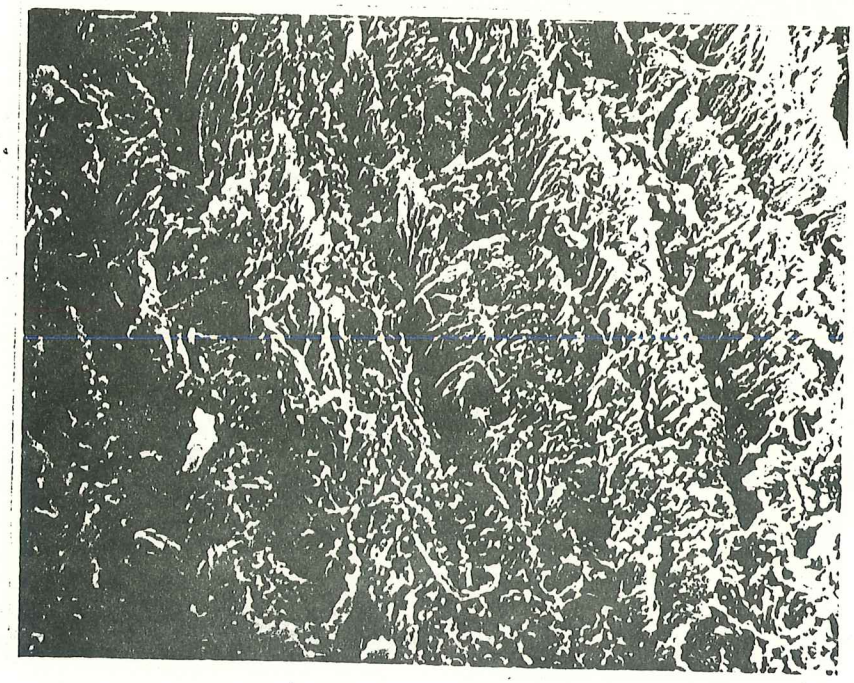


C

Figure V.3: Fibres de collagène Type I du LCA canin. (A) Fibres parallèles à l'axe longitudinal du ligament (X 500). (B) et (C) Fibrilles disposées en parallèle pour former une fibre (X 1000 et X 5000.



A



B

Figure V.4: Fibres de collagène Type I du LCA humain. (A) et (B) Fibres arrangées parallèlement à l'axe longitudinal du ligament. Les fibrilles constitutives présentent un arrangement tridimensionnel (X 1500).

Un certain nombre de sous-fascicules (3 à 25) sont assemblés à leur tour et entourés d'une gaine de tissu conjonctif (l'épitendineum) pour former une unité plus grande: un fascicule. La plaque V.5 montre des fibres assemblés en fascicule.

Finalement, les fascicules formant le ligament sont entourés par le péritendineum (une gaine similaire mais plus épaisse que l'épitendineum). La plaque V.6 montre le péritendineum du LCA et du LR humain.

V.1.2 Morphologie des différentes unités structurales du collagène

Forme de la section droite

La forme de la section droite des sub-fibrilles, des fibrilles et des fibres de collagène des ligaments du genou (LCA et LR) est approximativement circulaire chez l'humain et le chien. Cependant, pour les niveaux supérieurs de la

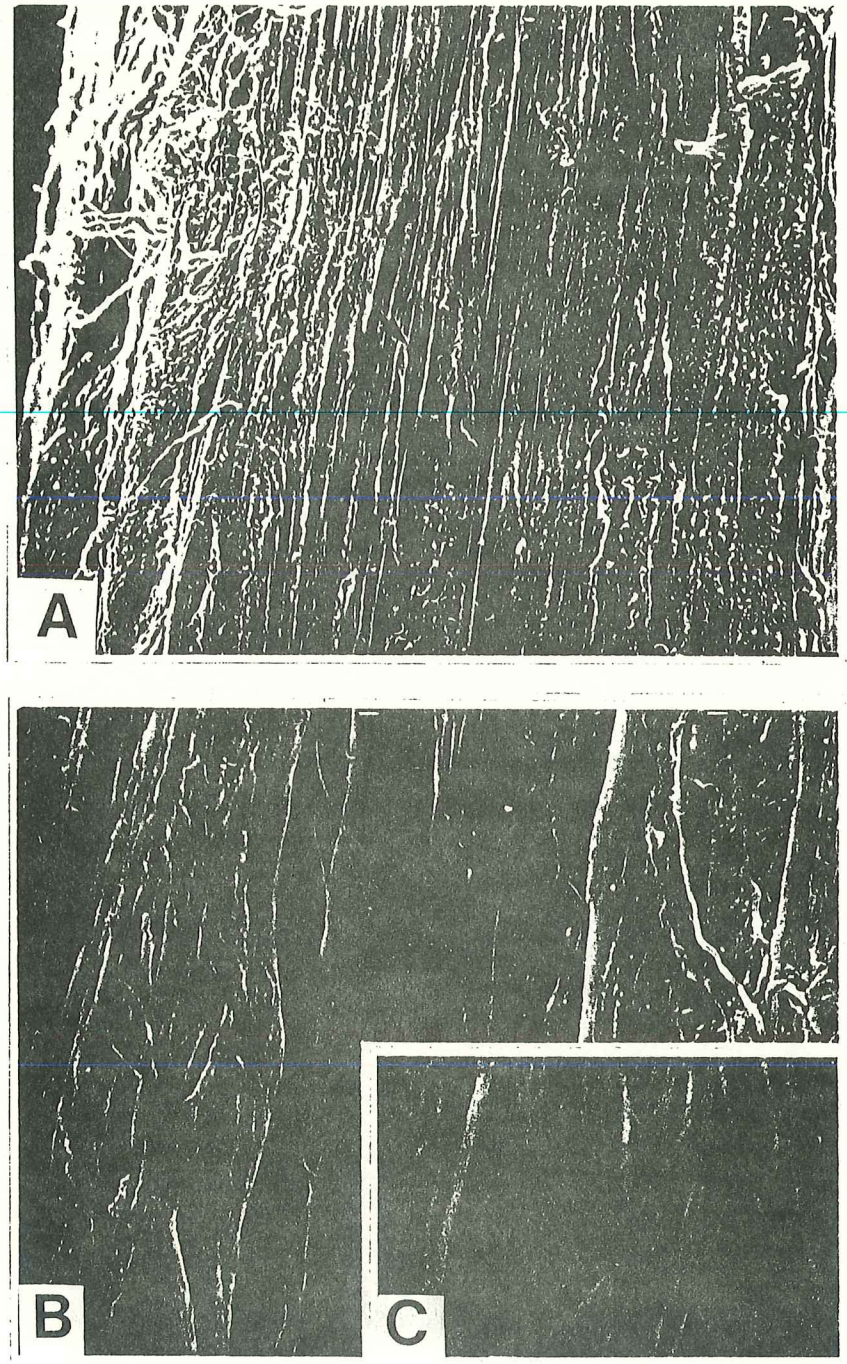
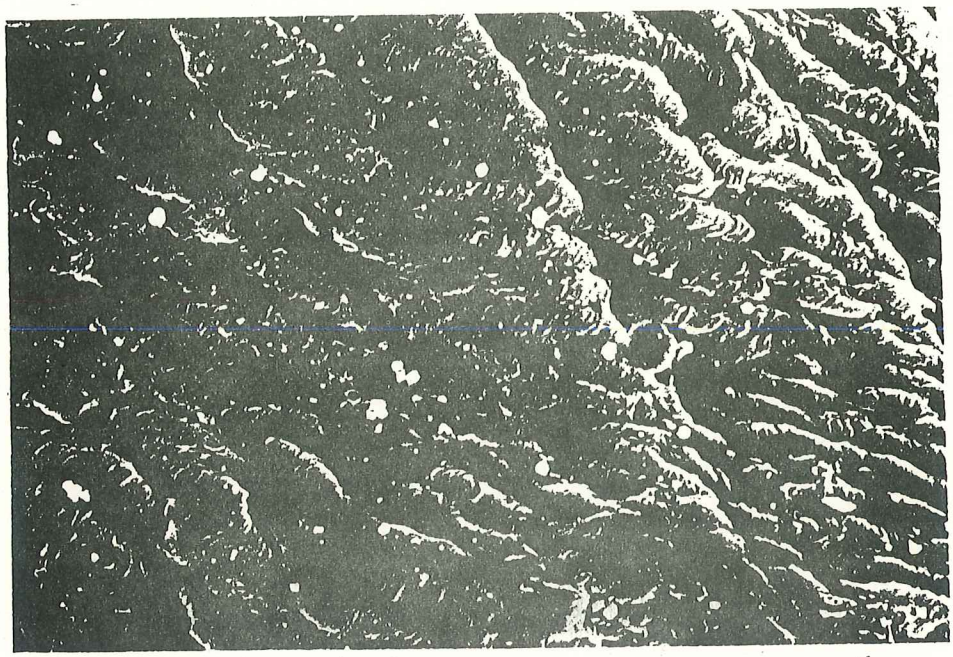


Figure V.5: Section longitudinale du ligament rotulien humain (77 ans). (A) On observe les différentes unités de l'organisation hiérarchique du collagène. La flèche indique un fascicule (X 35). (B) et (C) A plus fort grossissement, on distingue les fibrilles du fascicule (respect. X 500 et X 5000).



A



B

Figure V.6: Gaines de morphologie ondulée entourant le ligament. (A) Péritendineum du LR humain (X 200). (B) Péritendineum du LCA humain (X 500).

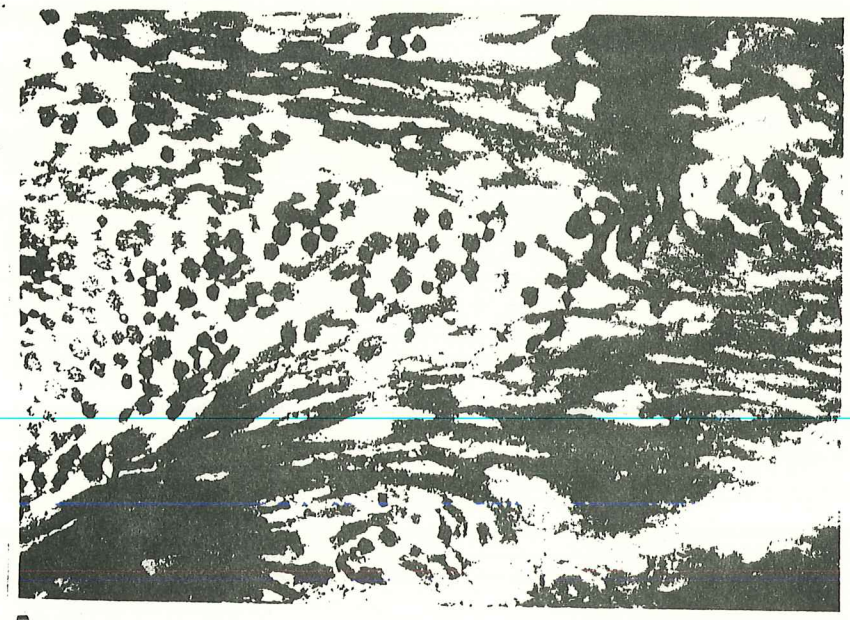
hiérarchie du collagène, il existe des différences morphologiques d'un ligament à l'autre, et également d'une espèce à l'autre.

Les micrographies de la figure V.7 mettent en évidence des fibrilles de section droite circulaire. On peut remarquer la distribution bimodale du diamètre des fibrilles; les sub-fibrilles sont celles de petit diamètre.

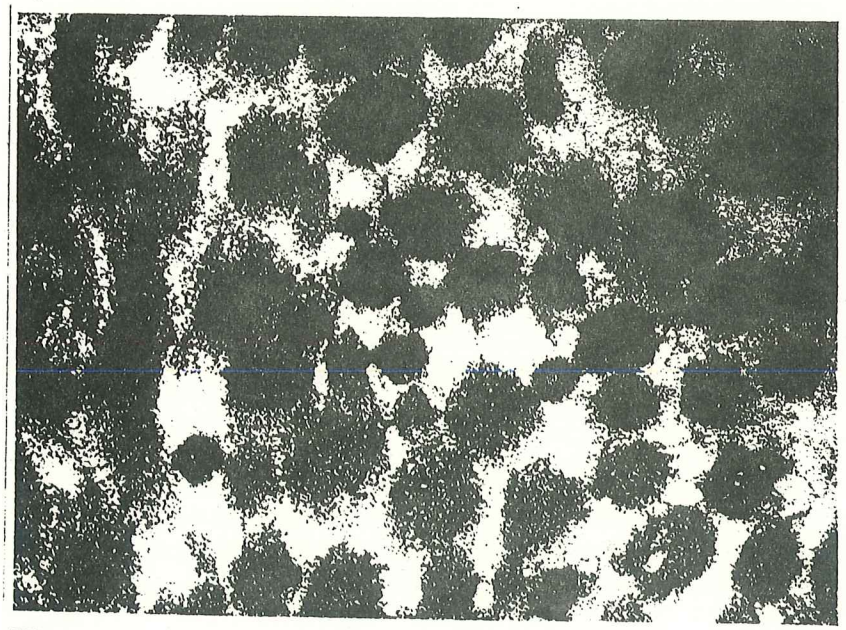
La plaque V.8 illustre des fibres, en coupe transversale et qui sont assemblées dans un fascicule. Leur section droite est de forme à peu près circulaire et/ou elliptique.

Par contre, la forme de la section droite des sous-fascicules et des fascicules dépend de l'espèce et du tissu considéré.

Dans le LCA humain, la forme et la taille de la section droite des fascicules varient à travers la section du ligament. On distingue deux régions de la section droite,

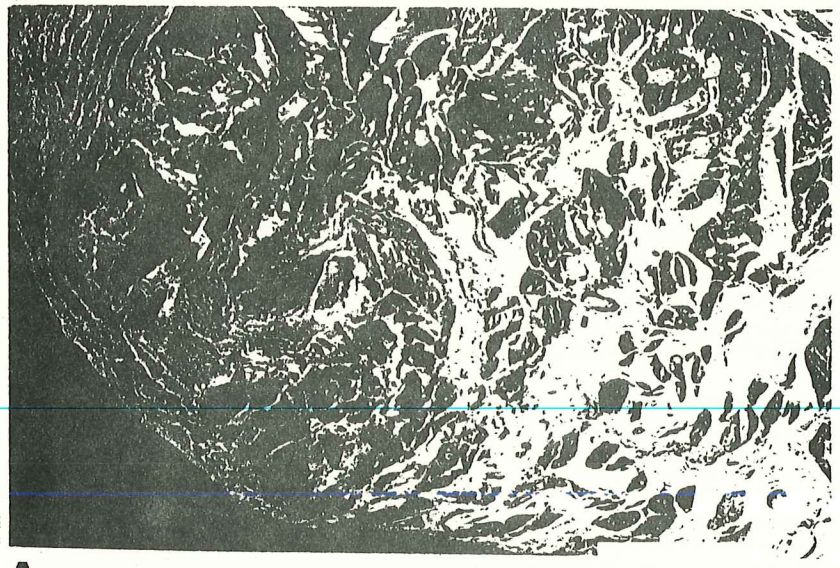


A

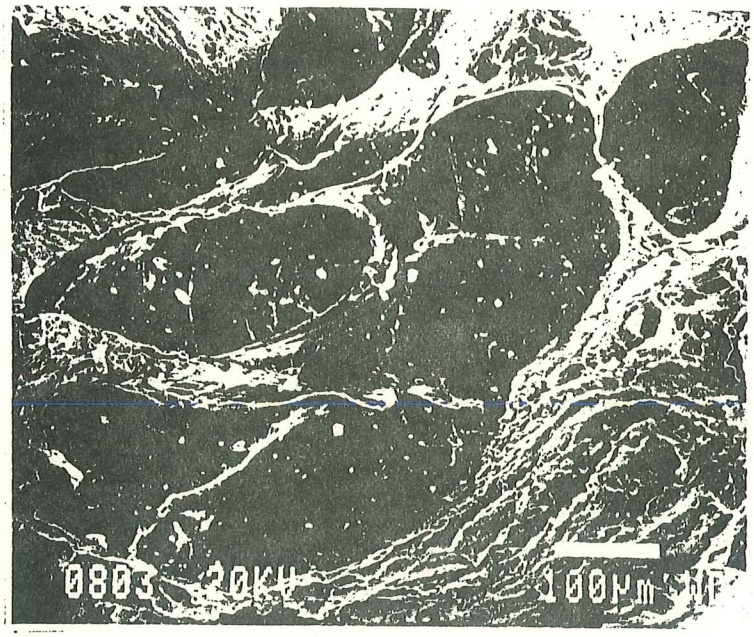


B

Figure V.7: Forme de la section droite des fibrilles du LCA humain. (A) Section droite circulaire (X 26000). (B) A plus fort grossissement, les sub-fibrilles ont également une section droite circulaire (X 100000).



A



B

Figure V.8: Section transversale du LCA humain. (A) Section au niveau médial montrant une hétérogenéité anatomo-topographique du ligament: une région riche en collagène (antérieure) et une autre en substance fondamentale (postérieure) (X 19). (B) Section droite elliptique des fibres (X 140).

l'une composée de gros fascicules et l'autre formée d'unités beaucoup plus petites baignant dans une substance fondamentale (figures V.8 et V.9). Ces deux régions correspondent respectivement à la bande antéro-médiale (figure V.9) et à la bande postéro-latérale (figure V.8B) du LCA. Il existe, par conséquent, une non-homogénéité anatomico-topographique du ligament. La section droite des fascicules a une forme allongée dans la direction radiale (antéro-postérieure). La longueur projetée dans la direction antéro-postérieure peut atteindre 1400 µm (figures V.9 et V.10).

Dans le LCA canin, la forme de la section droite des sous-fascicules et des fascicules est, contrairement à celle observée dans le LCA humain, plus régulière. Elle présente souvent une forme à peu près circulaire, elliptique ou triangulaire (figures V.11 et V.12). Par ailleurs, la section droite parait plus homogène avec des fascicules plus denses et moins de substance fondamentale (figure V.13).

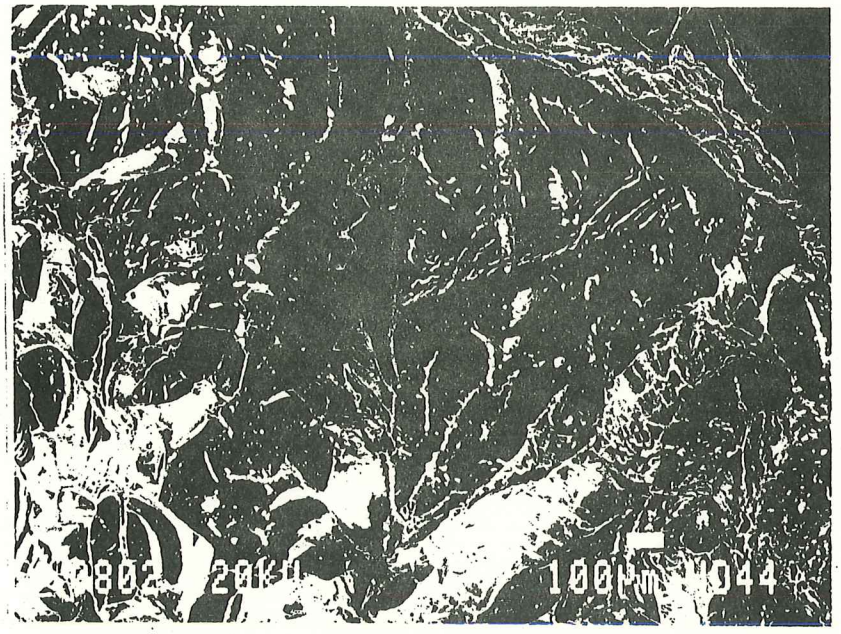
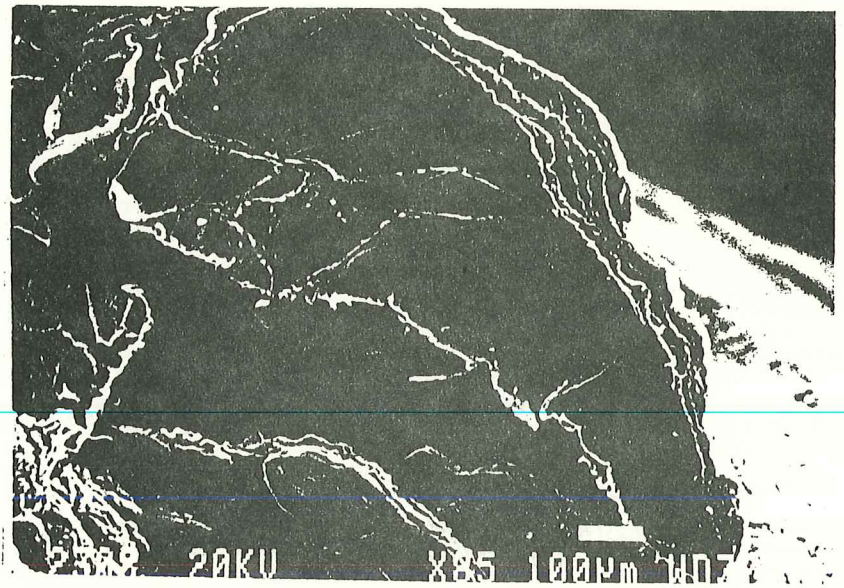


Figure V.9: Section transversale du LCA humain montrant la région antéro-médiale dense en collagène. Les fascicules ont une forme allongée dans la direction radiale (X 50).



A



B

Figure V.10: Section transversale des fascicules (A) et des sous-fascicules (B) du LCA humain. Ces unités ont une forme allongée, avec une longueur projetée, dans la direction radiale, de l'ordre de 1 400 µm (respect. X 85 et X 120).

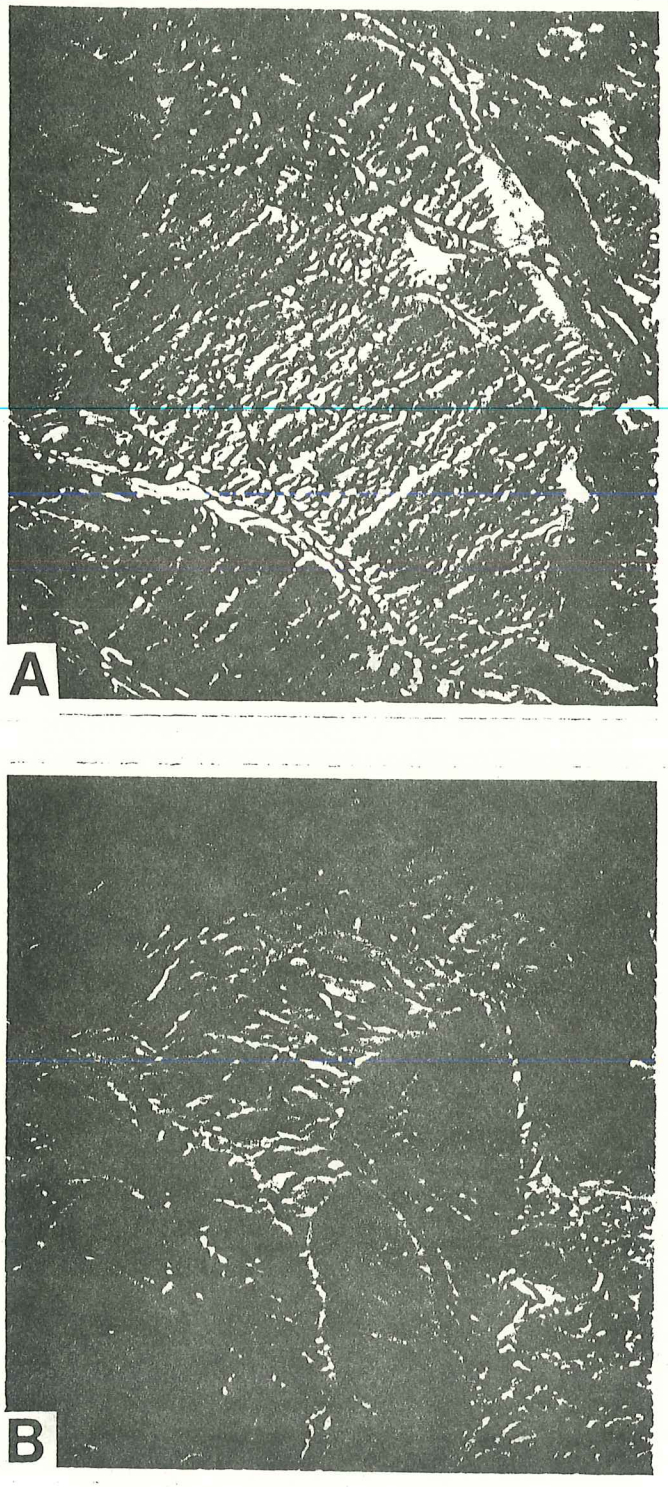
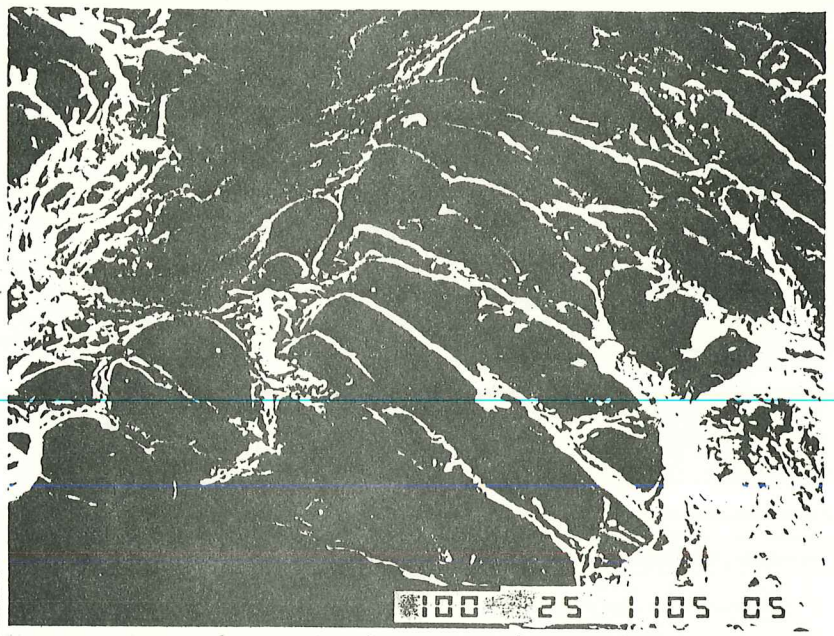
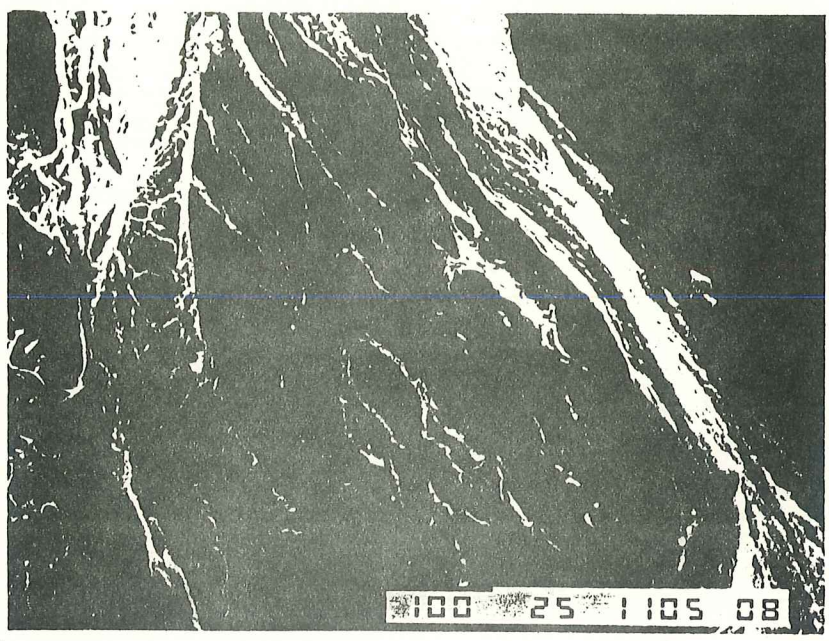


Figure V.11: Forme de la section droite des fascicules et des sous-fascicules du LCA canin: triangulaire (A) et elliptique (B) (X 425).



A



B

Figure V.12: Section droite des fascicules du LCA canin. (A) Forme régulière des sous-fascicules. (B) Epitendineum entourant un fascicule (X 150).

L'épaisseur des gaines entourant les sous-fascicules et les fascicules (endotendineum et épitendineum) est plus mince que dans le cas du LCA humain.

Dans le LR humain, les fascicules sont entourés par un épitendineum relativement plus épais que celui du LCA. Ainsi, on distingue nettement mieux la forme de la section droite des fascicules (figure V.14). Il en est de même de l'endotendineum qui peut atteindre une épaisseur de 171 µm (figures V.14 et V.15). La forme de la section droite des fascicules est, comme dans le LCA, allongée dans la direction antéro-postérieure, avec une longueur projetée dans cette direction variant de 1 à 2,3 mm. La section droite du LR humain n'est pas homogène. On distingue, comme dans le LCA, l'existence de deux régions (figure V.16). La plaque V.17 montre les deux régions avec un même grossissement, où l'on observe dans la partie antérieure de gros fascicules (A), et dans la zone postérieure des petits fascicules (B).

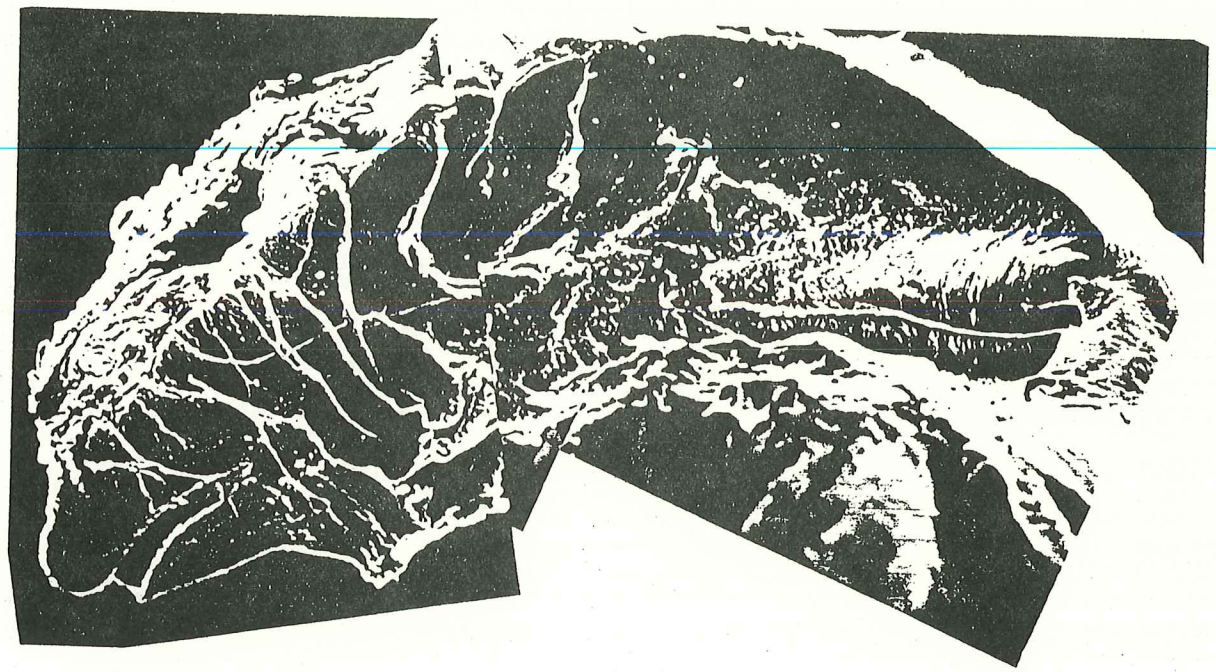


Figure V.13: Section transversale du LCA canin. Au niveau tibial, la section est homogène et contient moins de substance fondamentale. On observe le péritendineum entourant le ligament (X 35).

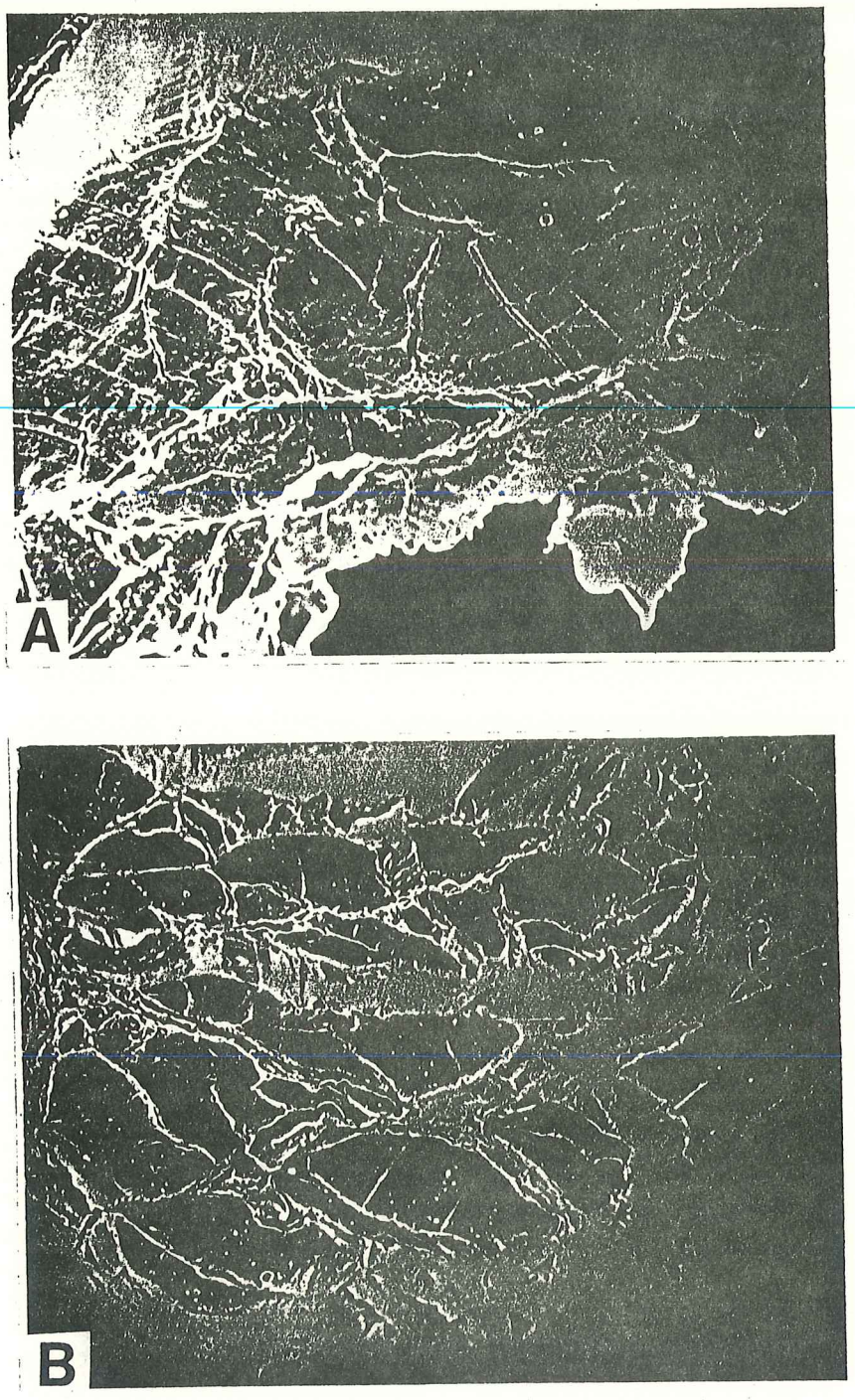
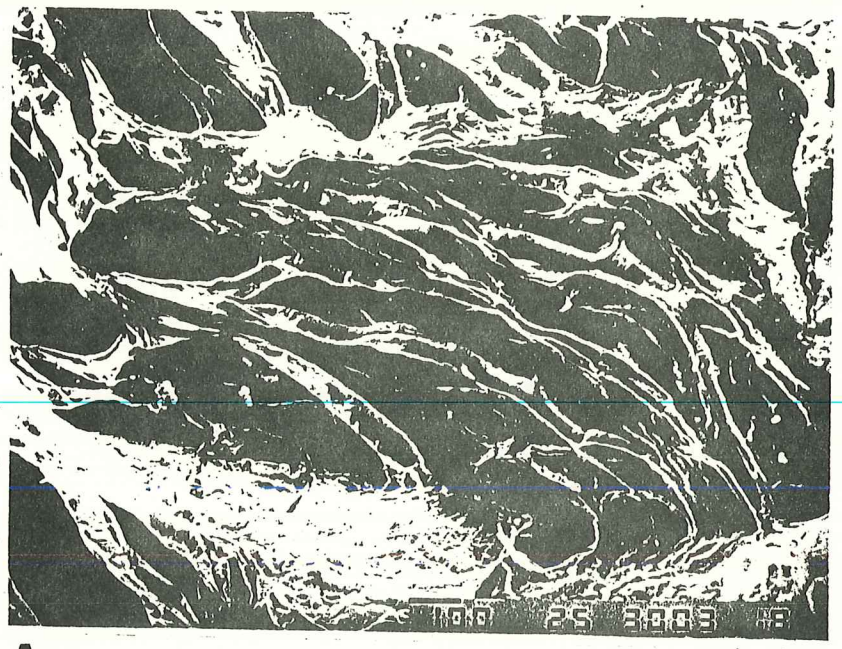
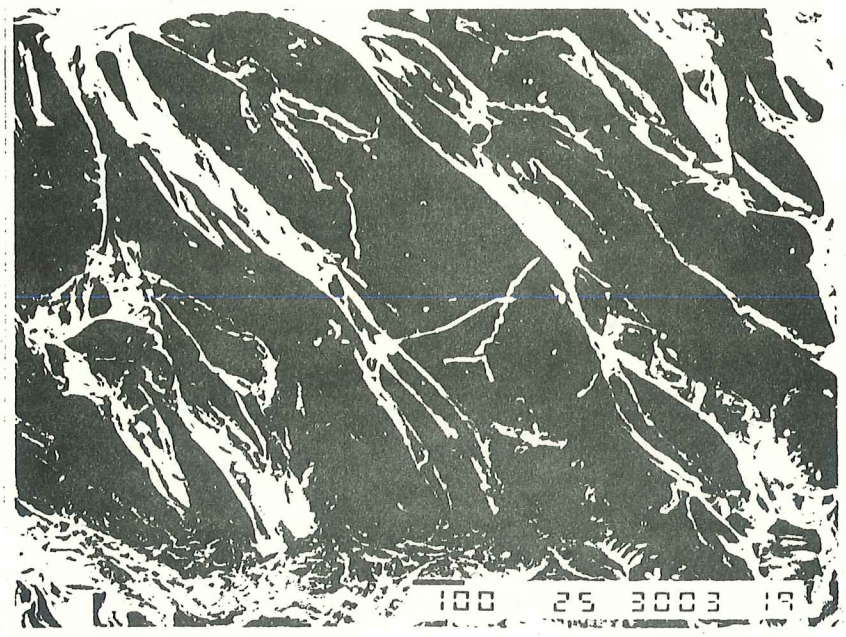


Figure V.14: Section transversale des fascicules et des sous-fascicules du LR humain. On remarque que l'épaisseur de l'épitendineum et de l'endotendineum est plus importante que celle des gaines du LCA (X 75).



A



B

Figure V.15: Fascicules du LR humain. (A) et (B) Forme des sous-fascicules est également allongée dans la direction radiale (X 75).

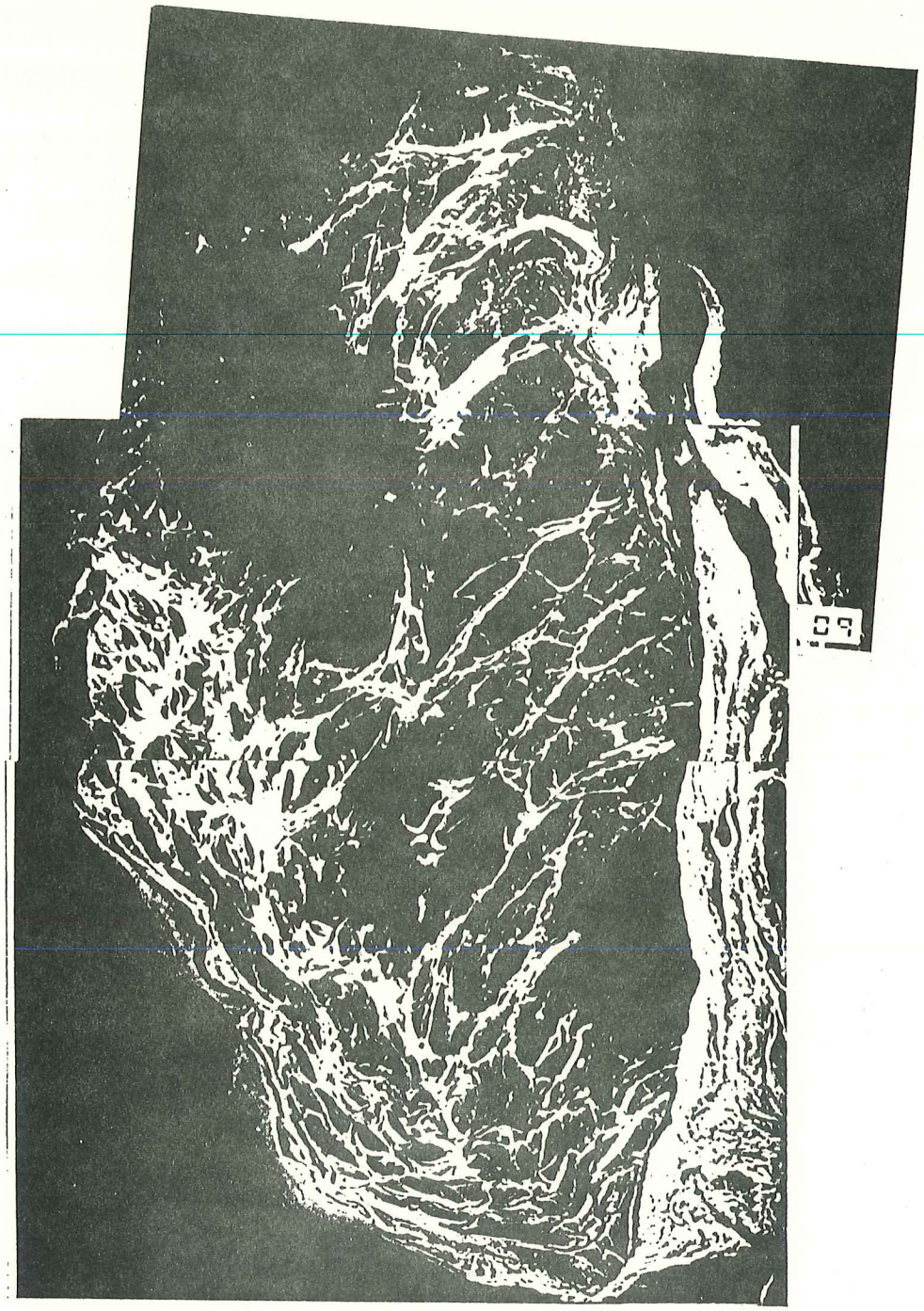
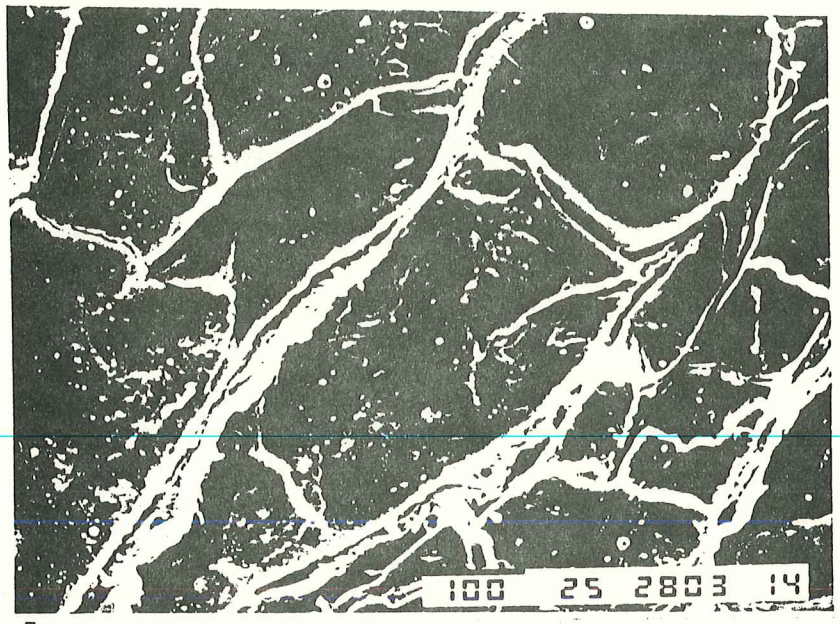
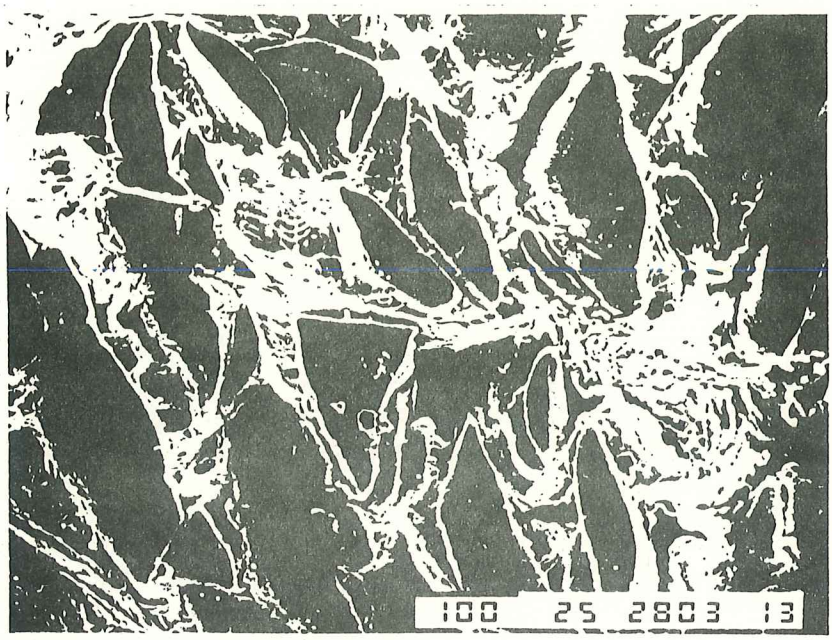


Figure V.16: Coupe transversale du LR humain. La section droite n'est pas homogène: une région dense en collagène A (antérieure) et une autre composée de substance fondamentale B (postérieure) (X 35).



A



B

Figure V.17: Hétérogeneité de la section transversale du LR humain. Fort grossissement des régions A et B de la figure V.16 (X 150).

Dans le LR canin, la forme de la section droite des fascicules est très régulière. La figure V.18 montre des fascicules de forme à peu près circulaire. Ces fascicules sont assez isolés l'un de l'autre, et entourés par un épais épitendineum. On remarque que les fascicules sont distribués à peu près uniformément sur la section droite du ligament. A plus fort grossissement, on distingue clairement les subdivisions fasciculaires. La forme de la section droite de ces sous-fascicules est tout à fait aléatoire (figure V.19). On peut noter que l'épaisseur de l'endotendineum est très faible.

Ondulation et arrangement des unités structurales du collagène

Nous avons vu précédemment que les fibres de collagène type I présentaient une configuration ondulée. Toutefois, les détails de cette ondulation n'ont pas été étudiés dans le collagène des ligaments. D'autre part,

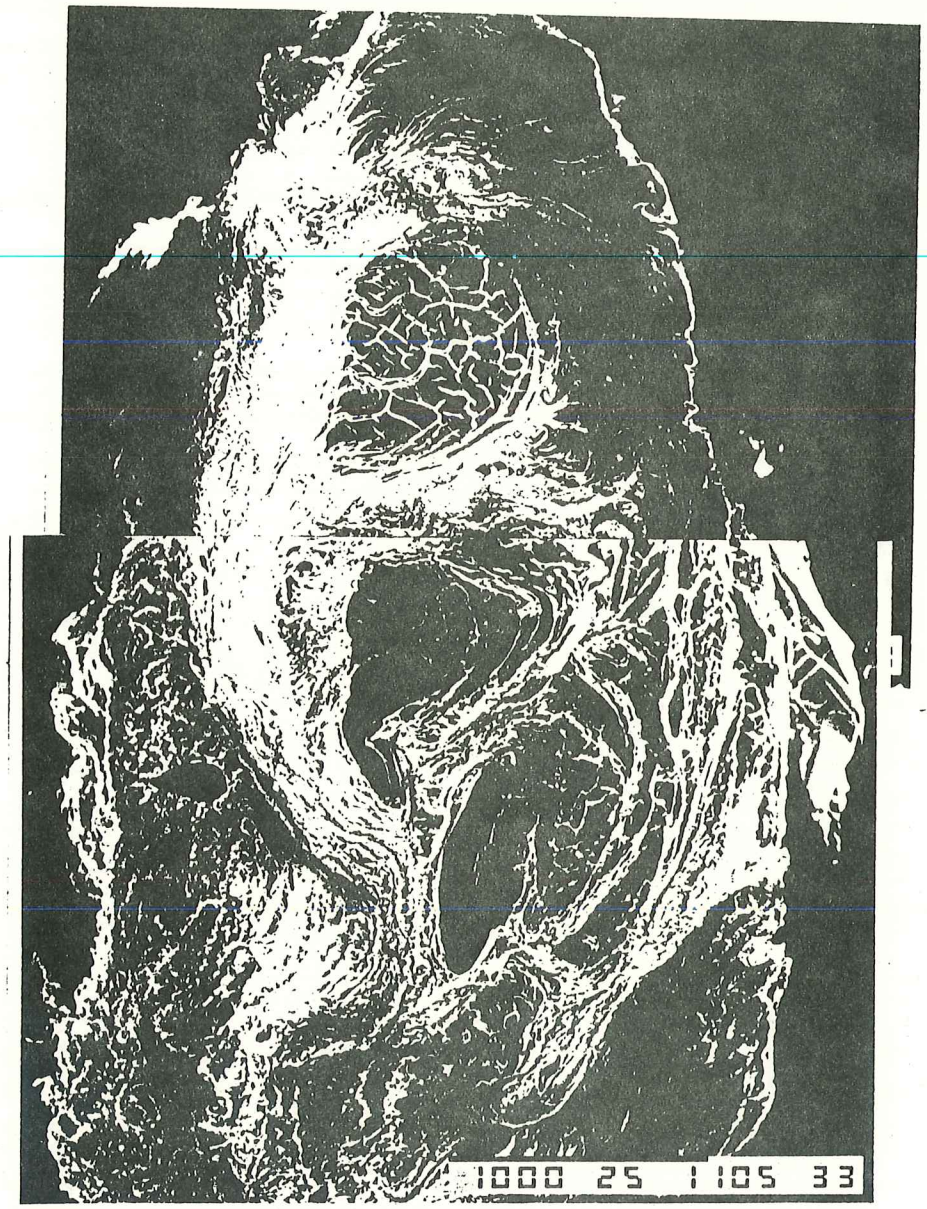


Figure V.18: Section droite du LR canin. On distingue clairement les fascicules, de forme à peu près circulaire, entourés d'un épais épitendineum (X 35).

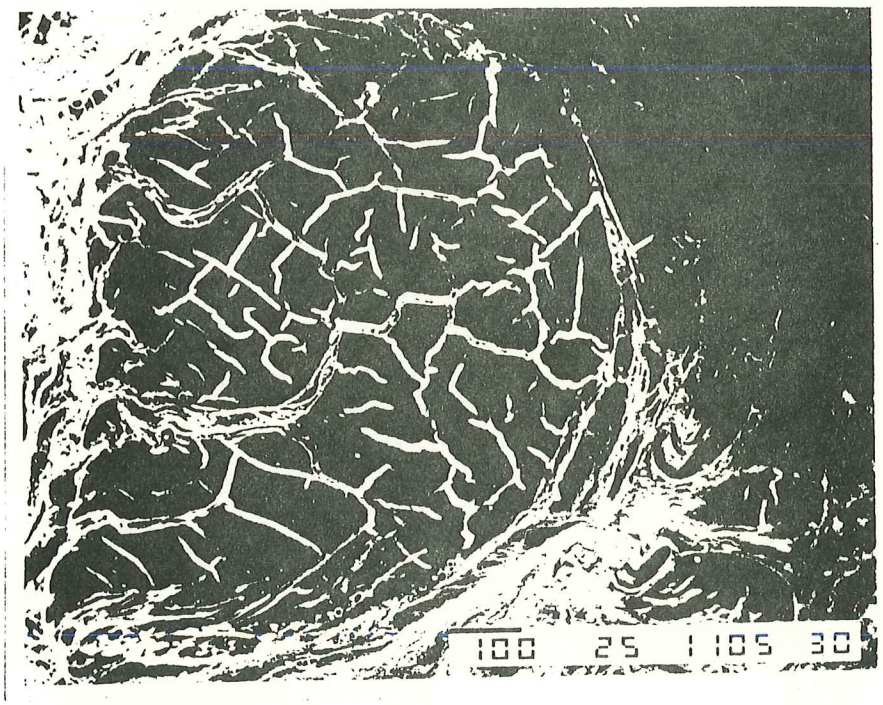


Figure V.19: Fascicule du LR canin. Les sous-fascicules, de forme aléatoire, sont séparés par un endotendineum très mince (X 100).

plusieurs points concernant cette ondulation sont encore controversés.

Nos observations au MEB nous ont permis de mettre en évidence deux types d'ondulation, une ondulation sporadique et une ondulation périodique.

(a) Ondulation sporadique

L'ondulation sporadique se produit d'une façon aléatoire principalement sur les fibres de collagène isolées. Cette ondulation n'est pas uniforme le long de ces entités fibreuses. La figure 5.20 montre que dans certaines régions, l'ondulation est très marquée alors que dans d'autres, elle est très atténuée.

Par ailleurs, l'ondulation sporadique n'est pas seulement une morphologie de surface, mais persiste à travers l'épaisseur entière des fibres.

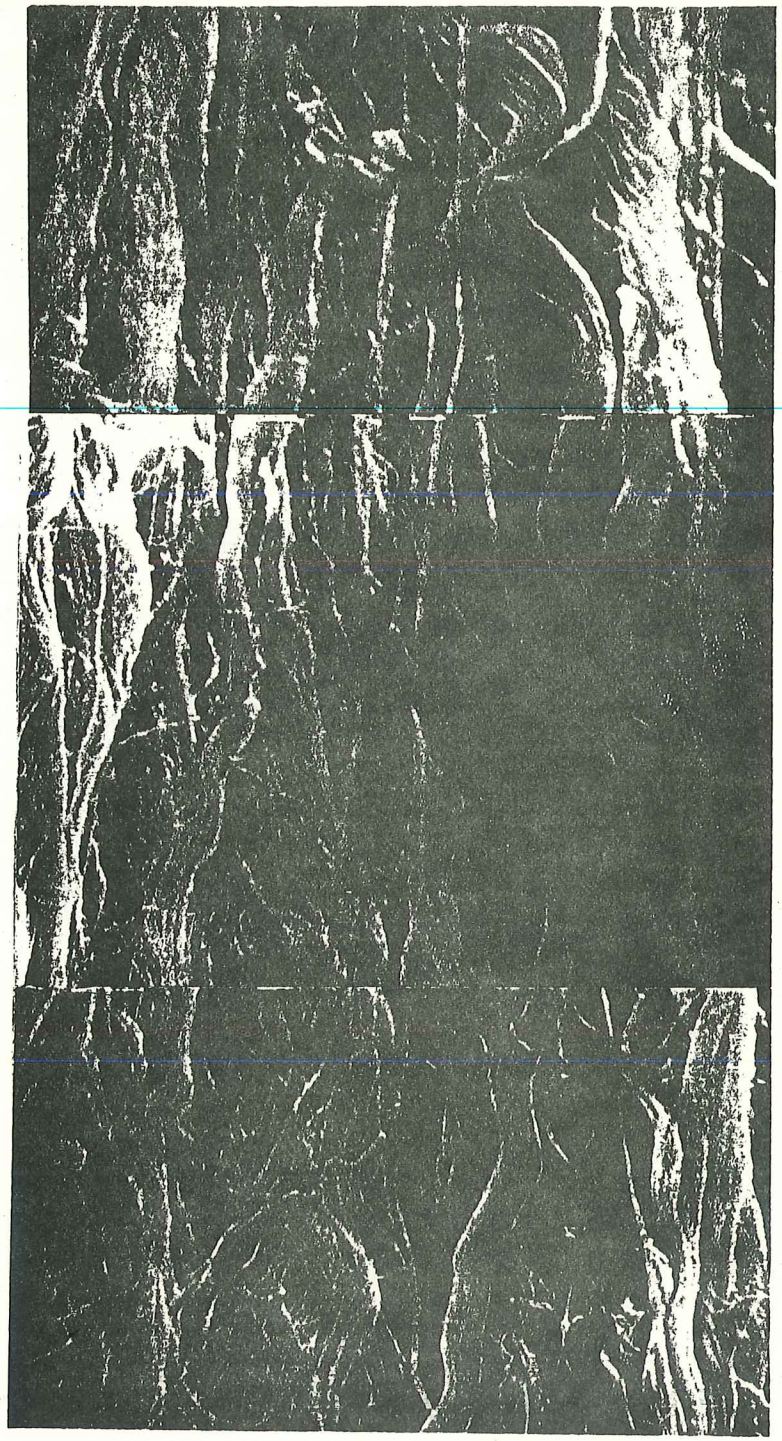


Figure V.20: Ondulation sporadique des fibres de collagène du LCA canin. Dans certaines régions, l'onde se raidit; dans d'autres, elle s'aplatit (X 2000).

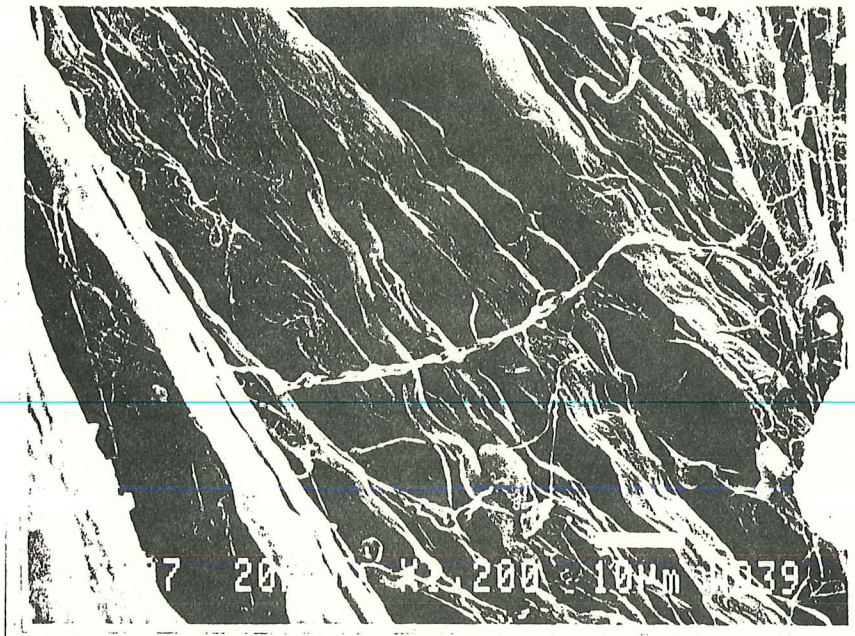
Les figures V.21 et V.22 montrent que toutes les unités fibrillaires composants la fibre sont ondulées en phase.

(b) Ondulation périodique

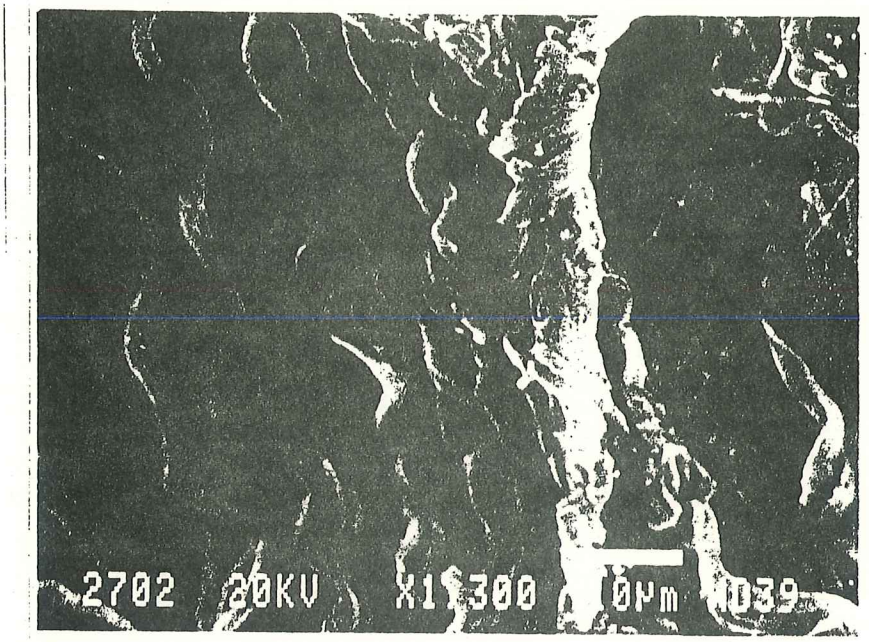
Le second type d'ondulation observé est une ondulation périodique. Ces ondulations uniformes et régulières caractérisent la surface des fascicules et des subdivisions fasciculaires. L'ondulation périodique présente soit une forme d'onde planaire ou bien une forme d'onde hélicoïdale.

(i) Forme d'onde planaire

La figure V.23 montre trois sous-fascicules assemblés dans un fascicule présentant une surface ondulée périodiquement. On remarque que la surface du fascicule est périodiquement affaissée, ce qui donne cette morphologie ondulée.



A

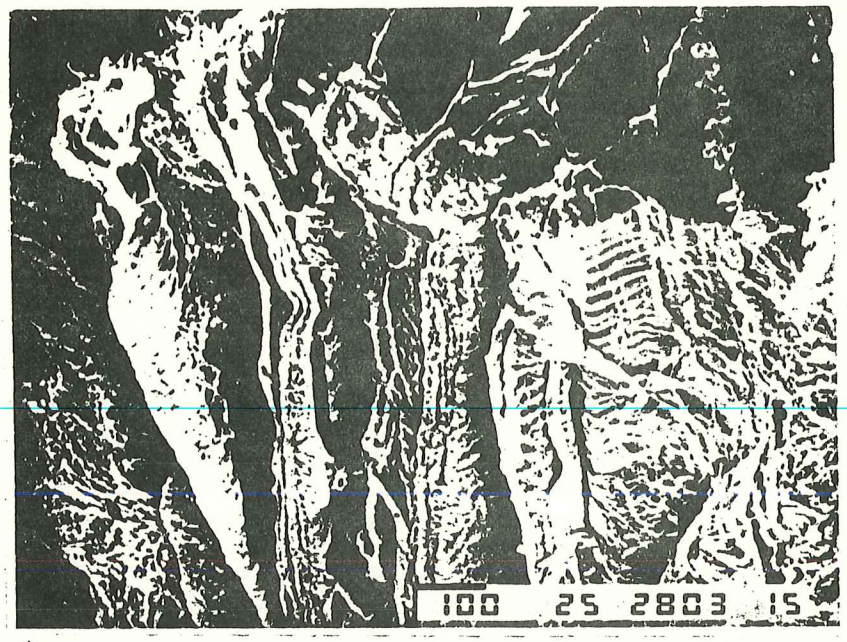


B

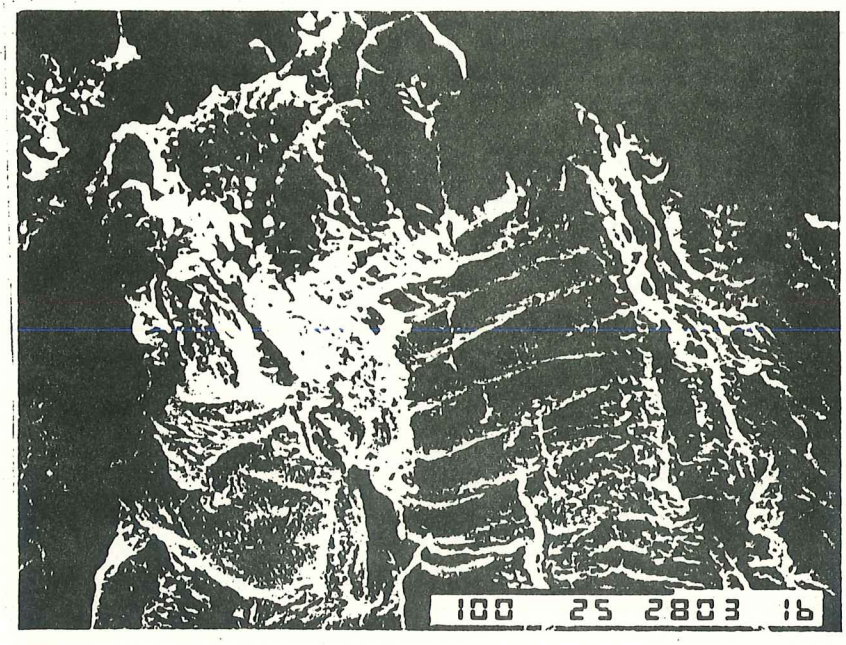
Figure V.21 : (A) et (B) Ondulation sporadique des fibres de collagène du LCA humain (respect. X 1000 et X 1300).



Figure V.22: Idem que la figure V.21. L'ondulation sporadique persiste à travers l'épaisseur entière des fibres (X 1000).



A

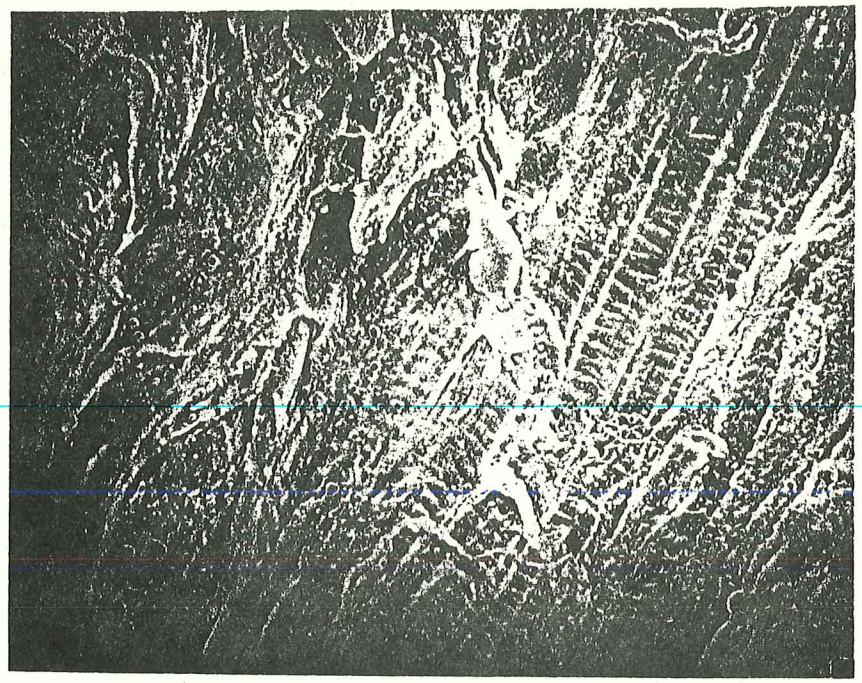


B

Figure V.23: (A) Ondulation périodique à la surface des fascicules du LR humain (X 100). (B) A plus fort grossissement, le fascicule ondulé est formé de trois sous-fascicules qui ondulent en phase (X 350).

La microphotographie V.24A montre plusieurs fascicules adjacents présentant une morphologie ondulée périodiquement. La figure V.25 montre clairement que cette topologie de surface ondulée est due à un phénomène de collabage périodique du fascicule. On peut remarquer que les fibrilles périphériques du fascicule ondulent dans un plan (forme d'onde planaire) vertical. En d'autres termes, les maxima et les minima des fibrilles adjacentes sont alignés perpendiculairement à l'axe du fascicule. La figure V.26 montre également que les ventres et les creux des ondes sont perpendiculaires à l'axe du fascicule.

La présence des gaines entourant les fascicules et leurs subdivisions, c'est-à-dire l'épitendineum et l'endotendineum masque l'arrangement interne des fibrilles. Des sections longitudinales de fascicules ondulés permettent de révéler la morphologie des fibrilles inter-fasciculaires. La plaque V.27 montre des fibrilles internes ayant une forme d'onde planaire. On peut remarquer que l'amplitude de l'ondulation décroît de la périphérie vers le centre du



A



B

Figure V.24: (A) Ondulation périodique de plusieurs fascicules adjacents du LCA humain (X 75). (B) La morphologie ondulée semble être due à un affaissement périodique de la surface des fascicules (X 350).

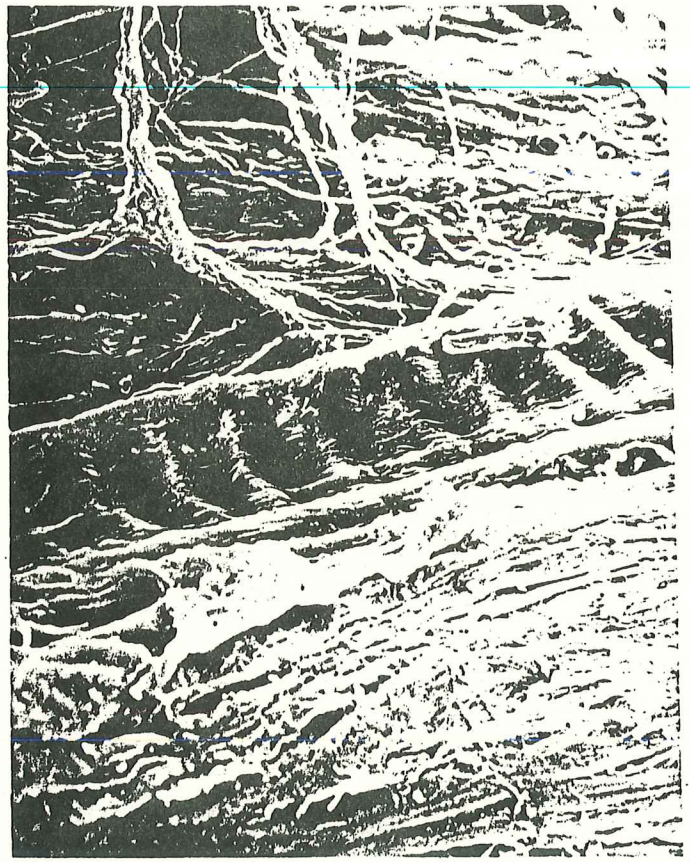


Figure V.25: Ondulation périodique d'un fascicule du LR humain. L'ondulation est planaire, c'est-à-dire les maxima et minima des fibrilles adjacentes du fascicule sont alignés perpendiculairement à l'axe du fascicule (X 200).

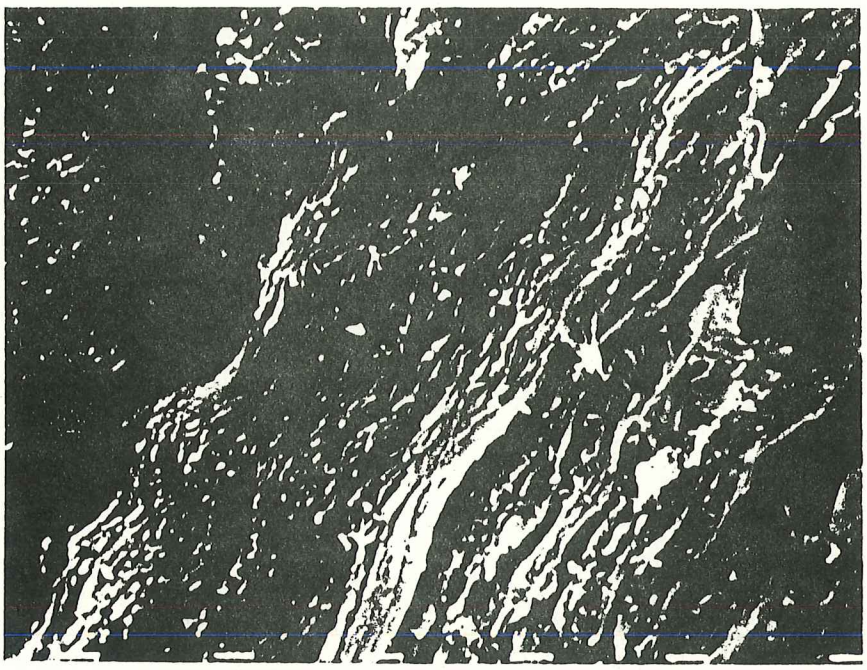
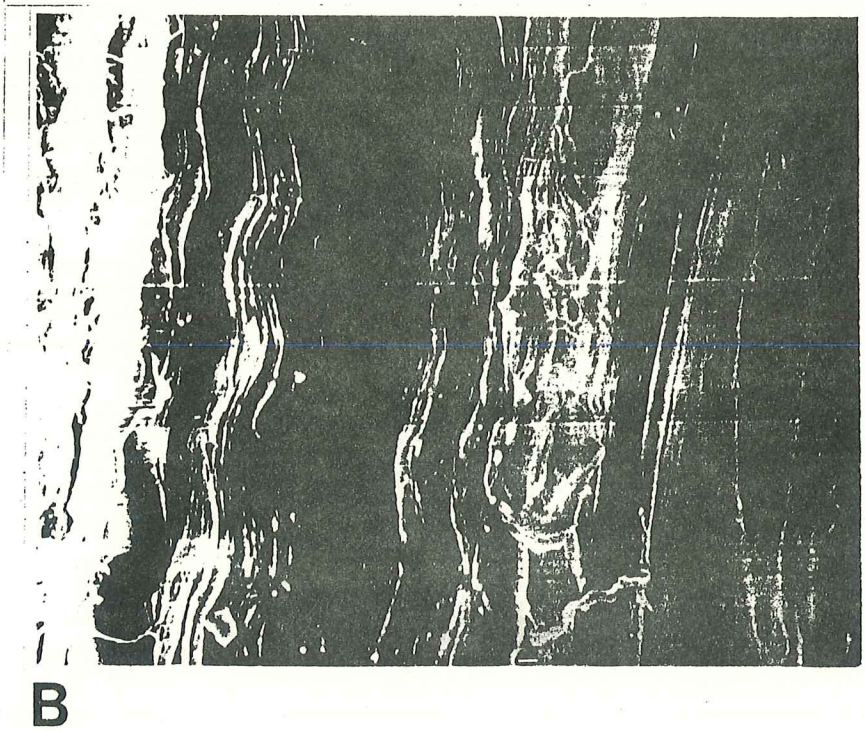


Figure V.26: Ondulation planaire d'un fascicule du LCA canin. Les fibrilles constitutives ondulent dans un plan (X 2000).



A



B

Figure V.27: (A) et (B) Sections longitudinales de fascicules ondulés du LR humain. L'amplitude d'ondulation décroît de la périphérie vers le centre du fascicule (respect. X 1000 et X 500).

fascicule. La figure V.28 illustre clairement que dans le cas de forme d'onde planaire, les fibrilles centrales sont redressées alors que les fibrilles périphériques présentent une amplitude maximale. Une digestion enzymatique révèle clairement la morphologie ondulée des fibrilles périphériques (figure V.29).

(ii) Forme d'onde hélicoïdale

Une controverse subsiste quant à la forme d'onde observée dans les unités structurales du collagène. Pour certains auteurs, notamment ceux qui ont investigué le TQR, la forme d'onde est planaire [DIAMANT et coll., 1972; VIIDIK, 1980(b)], alors que pour d'autres, l'onde apparente est due à une torsion tridimensionnelle des fibrilles de collagène composants le fascicule [VERZAR, 1957; EVANS et coll., 1975].

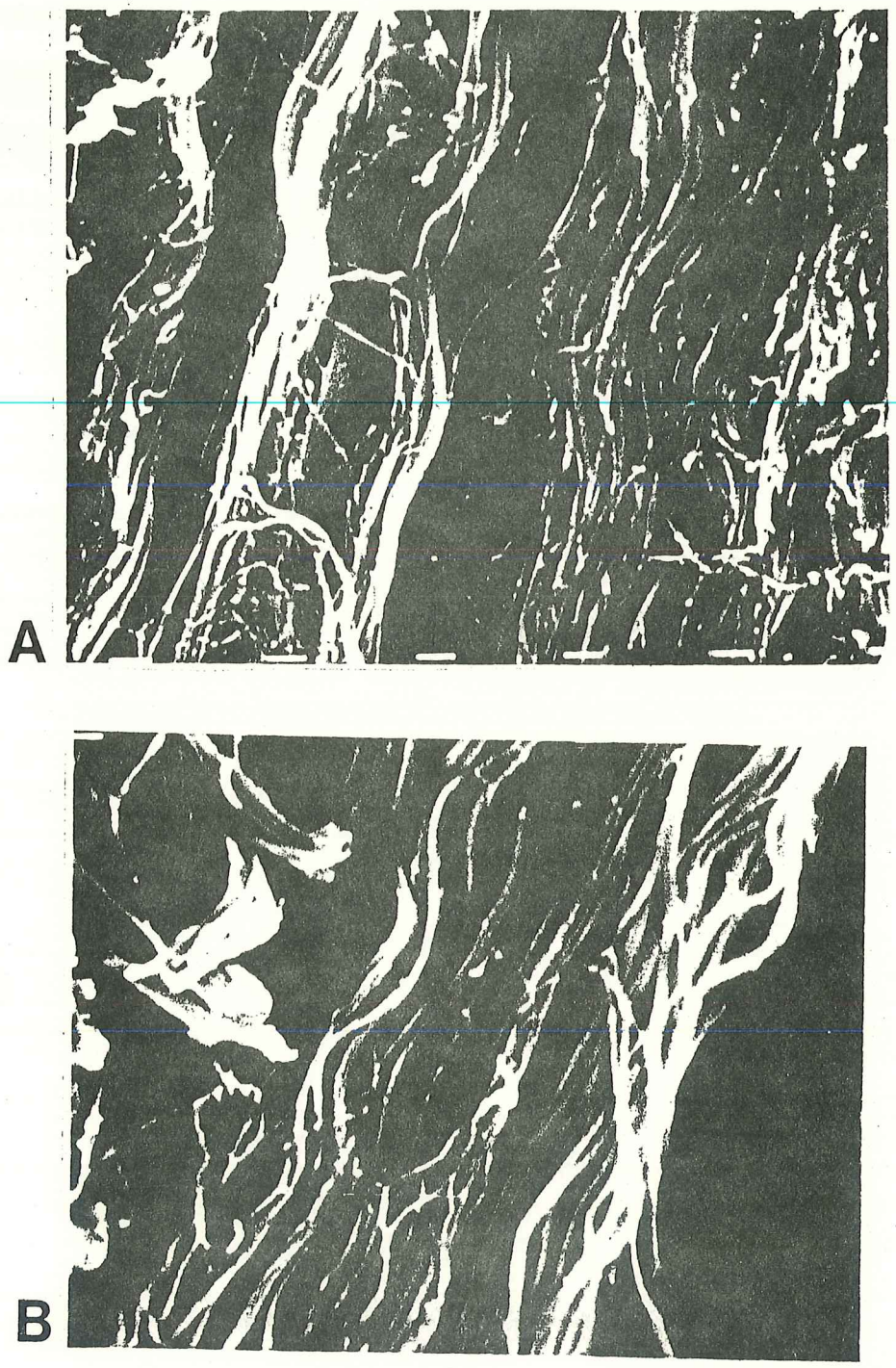


Figure V.28: Ondulation planaire de fascicules du LCA canin. (A) Fibrilles périphériques ondulées (X 2000). (B) Fibrilles centrales droites (X 350).

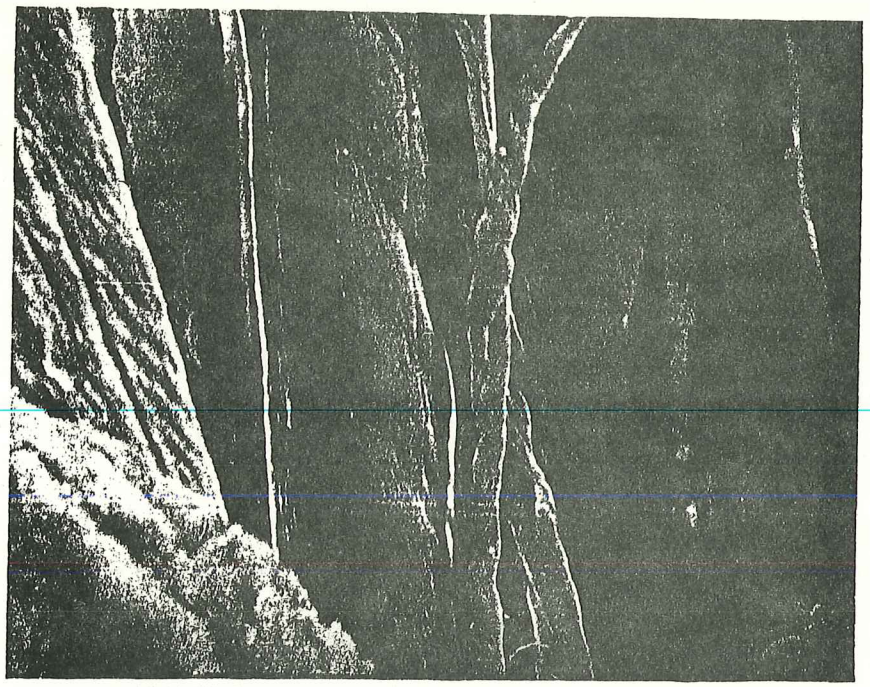


Figure V.29: Ondulation des fibrilles périphériques du LCA canin. Après digestion enzymatique (élastase & hyaluronidase), l'ondulation planaire est mise en évidence sur les fibrilles périphériques (X 1500).

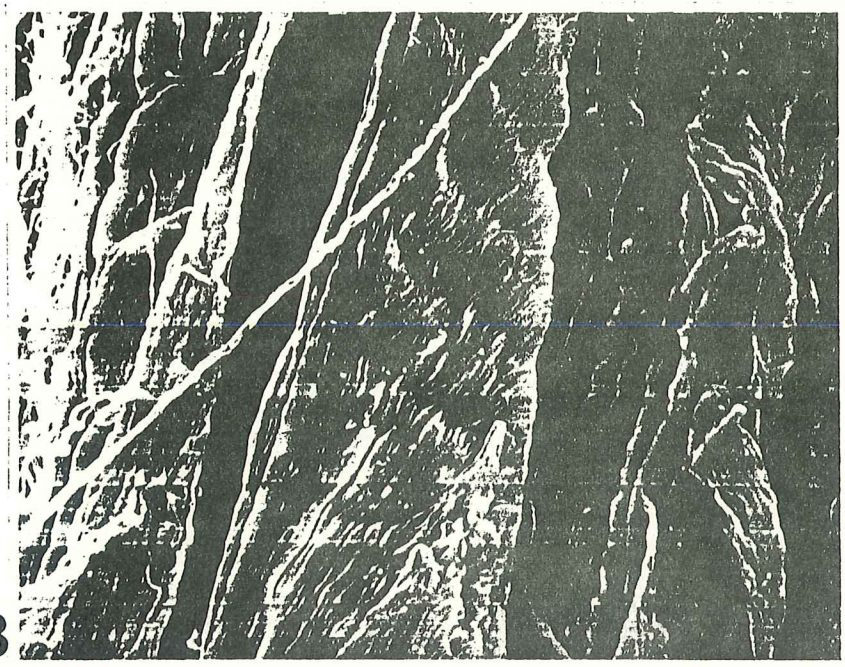
La figure V.30A montre un fascicule présentant une forme d'onde hélicoïdale sur sa surface. La morphologie du fascicule rappelle celle d'un câble. On observe également deux fibres entrelacées à droite du fascicule.

Un retrait enzymatique (hyaluronidase) de l'épitendineum révèle que les fibrilles périphériques suivent une trajectoire en hélice ondulée, c'est-à-dire ont une forme d'onde hélicoïdale (figure V.30).

On peut noter que, dans ce cas également, la topologie de surface ondulée semble être due à un phénomène de collabage périodique du fascicule. Toutefois, les maxima et les minima des fibrilles adjacentes sont alignés obliquement par rapport à l'axe du fascicule. On remarque que pour ce ligament (LR humain) les fibrilles en hélice sont orientées à droite, alors que le collabage de surface est incliné à gauche.



A



B

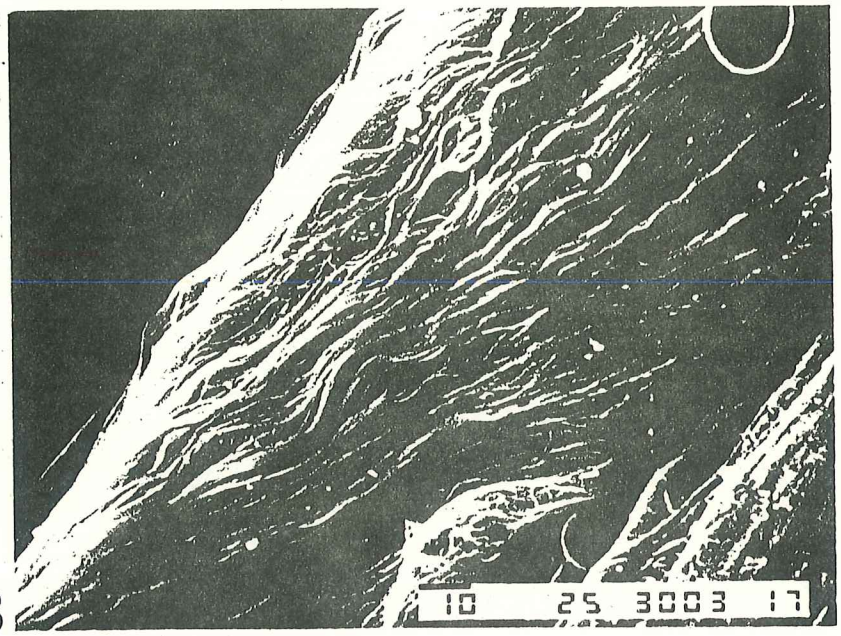
Figure V.30: Ondulation hélicoïdale de fascicules du LR humain. (A) La morphologie du fascicule ressemble à celle d'un câble (X 500). (B) Un retrait enzymatique de l'épitendineum révèle la trajectoire en hélice ondulée des fibrilles périphériques (X 500).

Les figures V.32 A et B montrent une inclinaison à gauche des fibrilles en hélice, et un collabage à droite dans un LCA canin. Cependant, nous avons observé des fibrilles ondulées et disposées aussi bien en hélice à gauche, qu'en hélice à droite (figures V.31 et V.33). Par ailleurs, il n'est pas clair si l'orientation de l'hélice est la même pour toutes les fibrilles d'un ligament donné, et si cette orientation dépend du tissu, du site et de l'espèce.

Les figures V.33 et V.34 montrent des fascicules coupés longitudinalement. On constate que les fibrilles centrales sont droites (pas d'ondulation) et disposées obliquement par rapport à l'axe du fascicule. Ces observations suggèrent que les fibrilles centrales sont des hélices non ondulées, alors que les fibrilles périphériques sont des hélices ondulées. En d'autres termes, l'ondulation des fibrilles en hélice est une morphologie qui caractérise les fibrilles périphériques. Ceci est une évidence que l'ondulation surfacique est un phénomène de collabage périodique du fascicule dans deux-dimensions.



A



B

Figure V.31:

Sens de l'hélice dans le LCA humain. (A)
Fibrilles en hélice à gauche (X 1500). (B)
Fibrilles en hélice à droite (X 750).

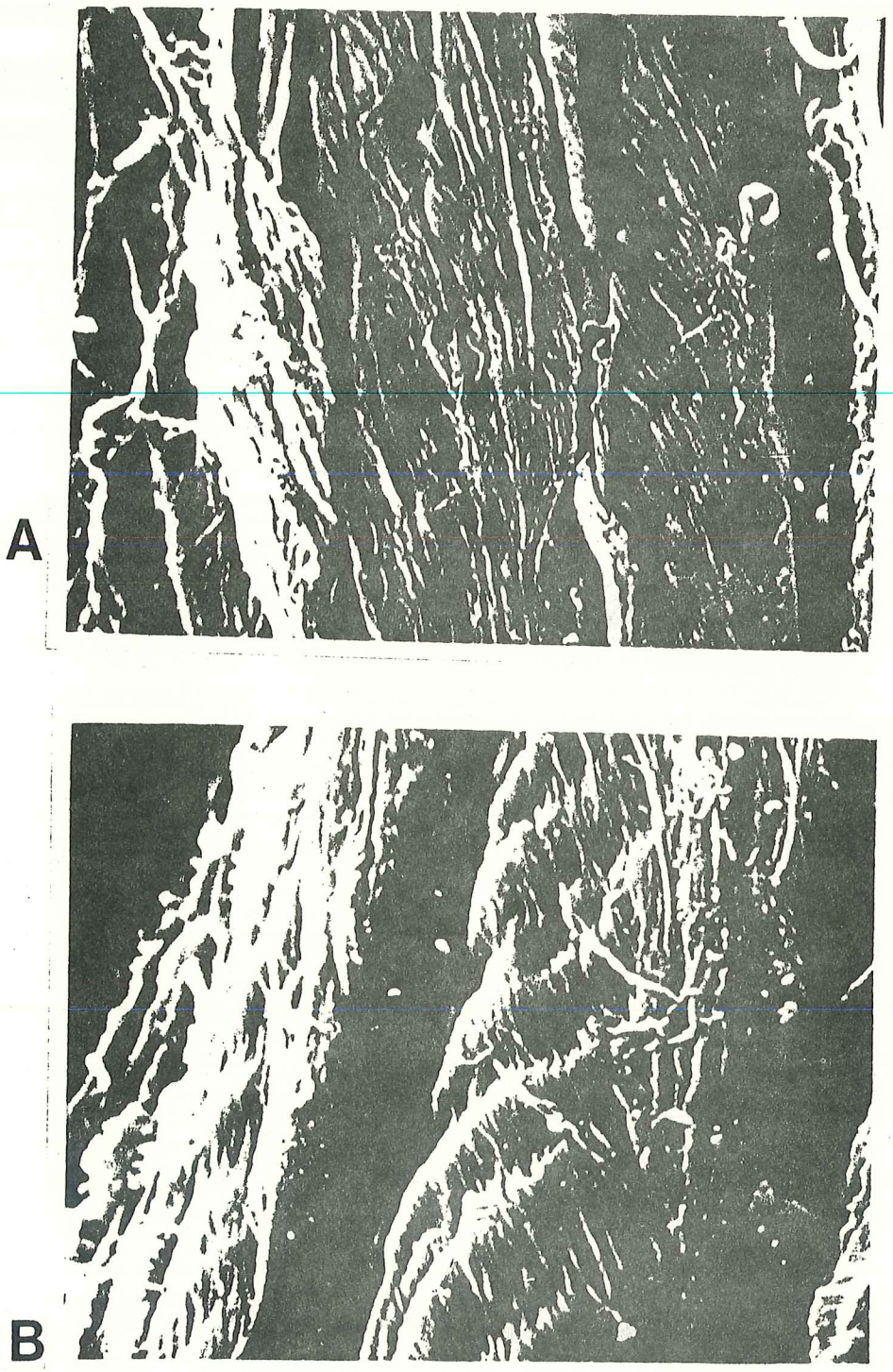


Figure V.32:

Ondulation hélicoïdale de fascicules du LCA canin. (A) et (B) L'hélice peut être à gauche ou à droite (X 1000).

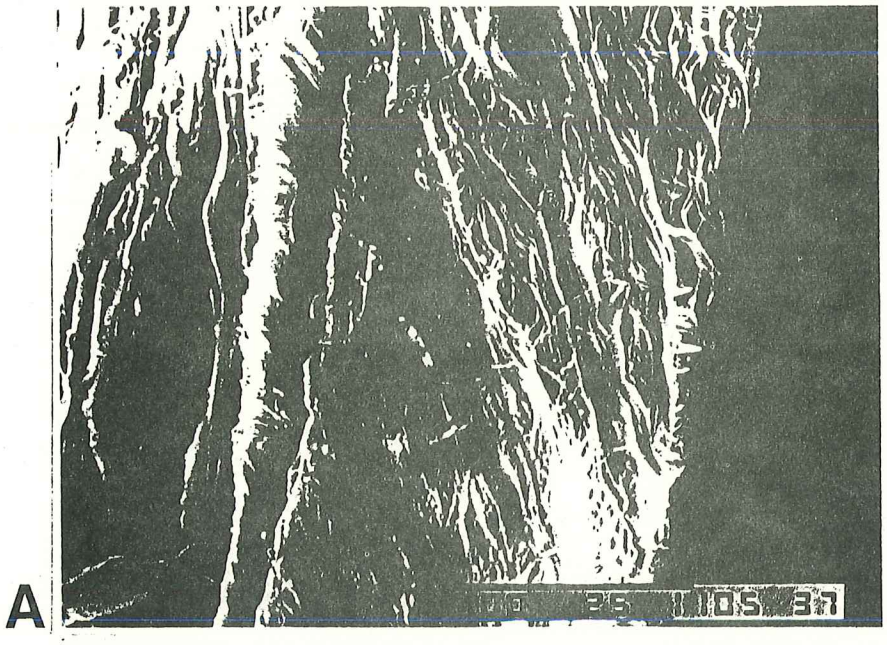
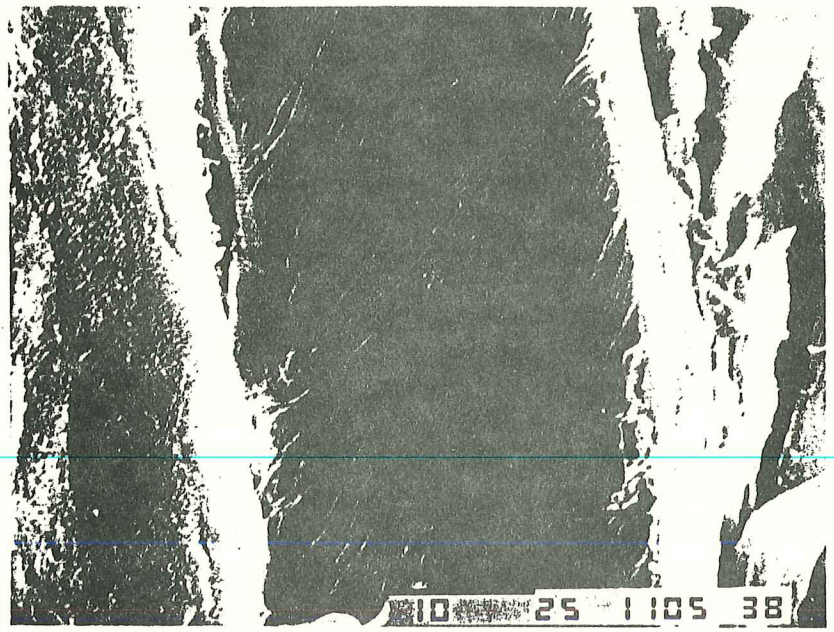


Figure V.33: (A) et (B) Arrangement en hélice à gauche des fibrilles du LR canin. (C) Ou en hélice à droite (respect. X 350, X 2000, X 7500).


B
10 25 1105 38


C

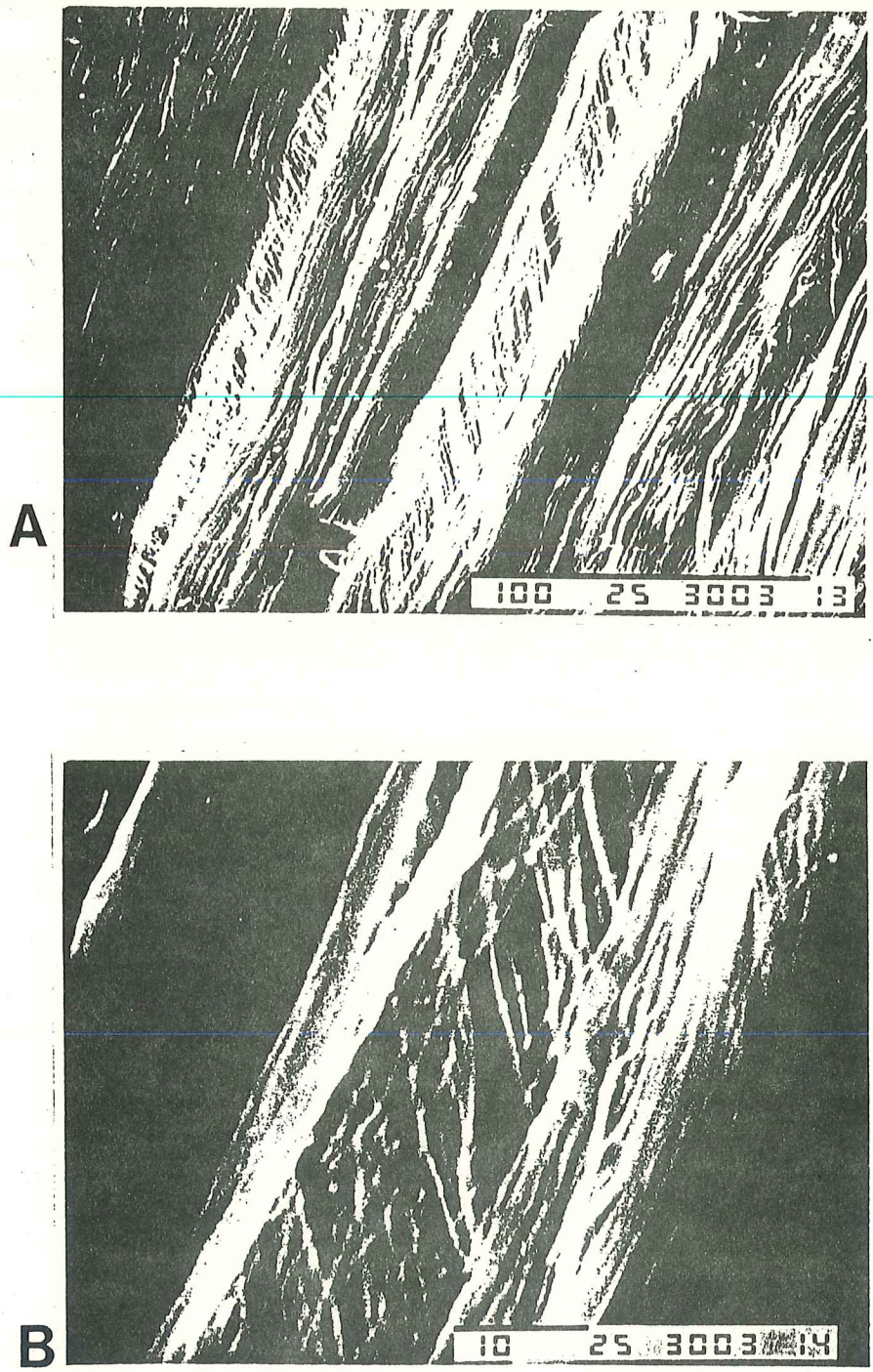


Figure V.34: (A) et (B) Fibrilles centrales d'un fascicule du LR humain. Leur direction oblique par rapport à l'axe du fascicule suggère un arrangement en hélice (respect. X-500 et X 5000).

Il semblerait que lorsque l'arrangement interne des fibrilles est hélicoïdal, la direction du collabage est oblique par rapport à l'axe du fascicule (figures V.30 et V.32). Par contre, pour un arrangement parallèle, le collabage est perpendiculaire à l'axe du fascicule. Ces considérations suggèrent que les ondulations de surface des fascicules seraient reliées à l'arrangement interne des fibrilles.

Notons par ailleurs, que les fascicules et leurs subdivisions ne présentent pas tous une morphologie ondulée d'une façon systématique. Dans une section longitudinale donnée, des fascicules ayant une surface lisse peuvent être observés (figure V.35).

Dans le cas du LCA humain, certains fascicules eux-mêmes, suivent une trajectoire hélicoïdale de l'insertion fémorale à l'insertion tibiale. La figure V.36 montre des fascicules coupés dans une section longitudinale, et qui suggère leur arrangement en hélice.

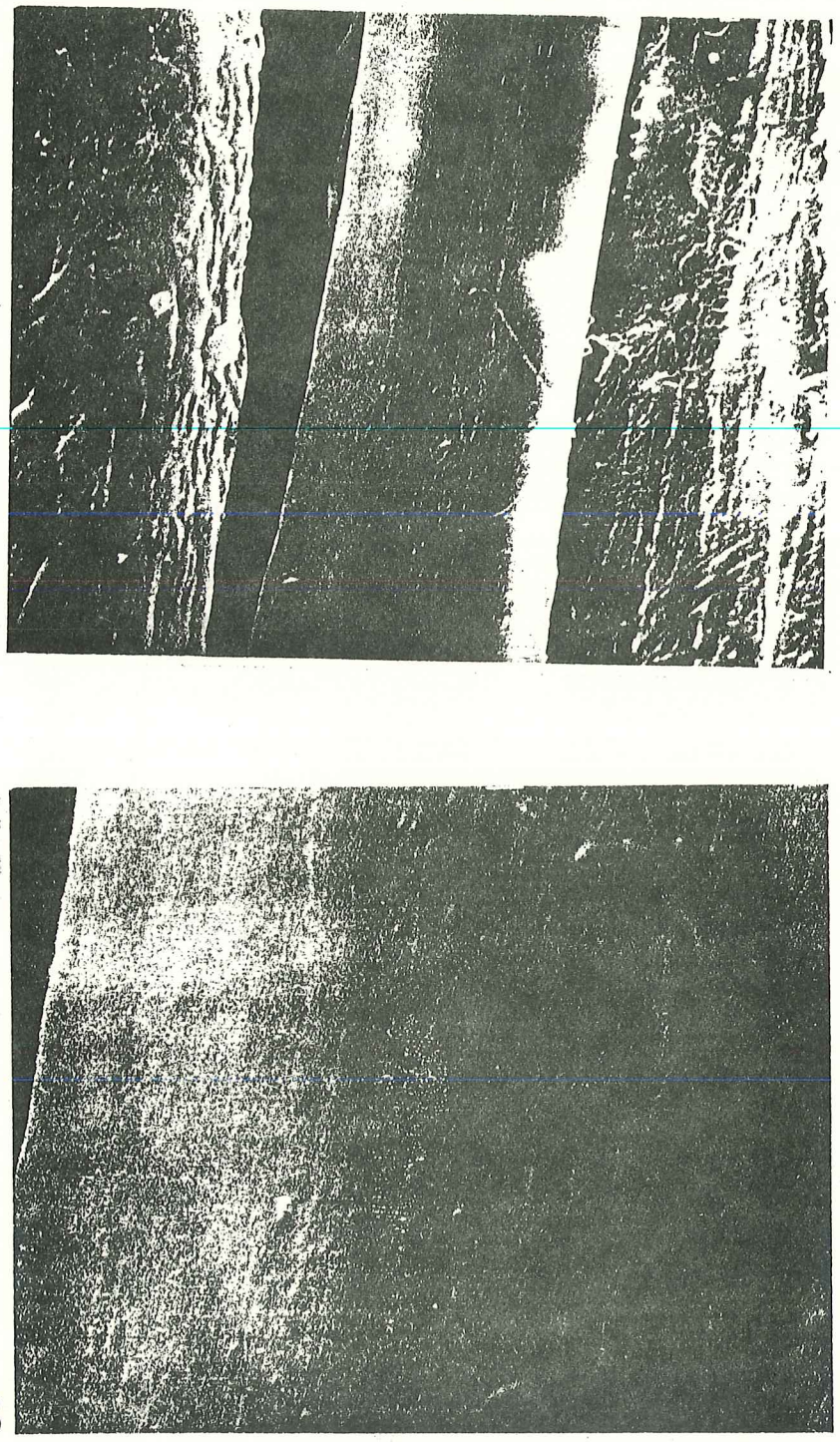


Figure V.35:

(A) Fascicule non ondulé du LR humain. (B) A plus fort grossissement, la surface du fascicule apparaît très lisse (X 3500).

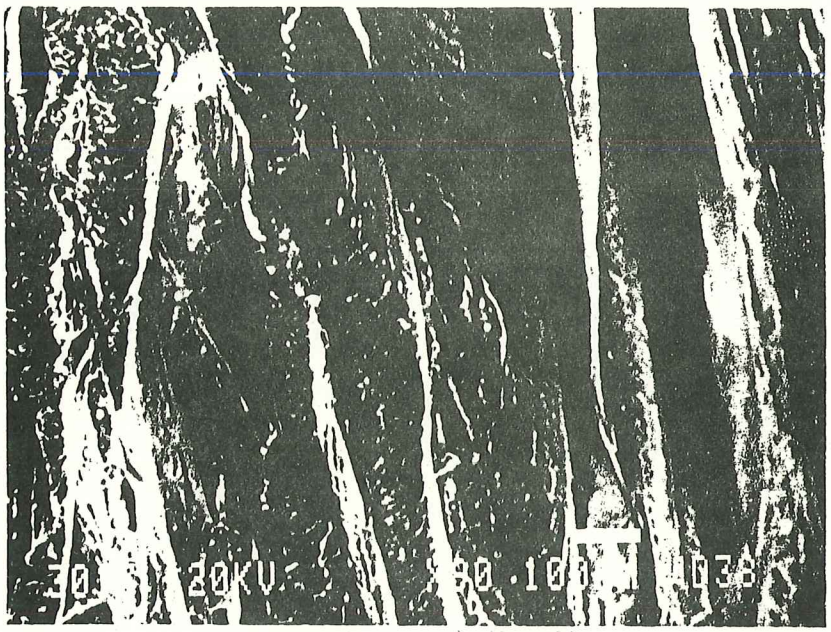


Figure V.36: Section longitudinale d'un LCA humain montrant des fascicules coupés suggérant un arrangement hélicoïdal (X 90).

V.1.3 Fibrilles transversales

Nos observations ont permis la mise en évidence de fibrilles perpendiculaires à l'axe longitudinal des ligaments. Ces fibrilles établissent une liaison structurale entre les fibres, les sous-fascicules et les fascicules.

La figure V.37 montre des fibres longitudinales de collagène type I d'un LCA humain avec des fibrilles de liaison transversale. Ces fibrilles transversales ne présentent pas de striation au MEB, même à des grossissements de 40 000 fois (figure V.39). On peut remarquer que ces fibrilles de liaison sont directement attachées aux gaines entourants les fibres, les sous-fascicules et les fascicules.

Des unités sous-fasciculaires et fasciculaires sont également liées par de telles fibrilles transversales (figures V.38 et V.40).



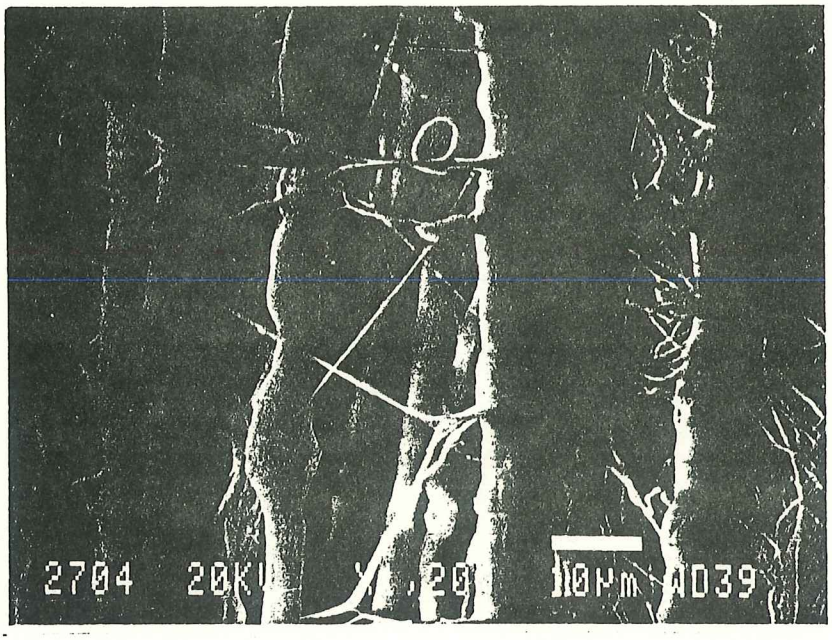
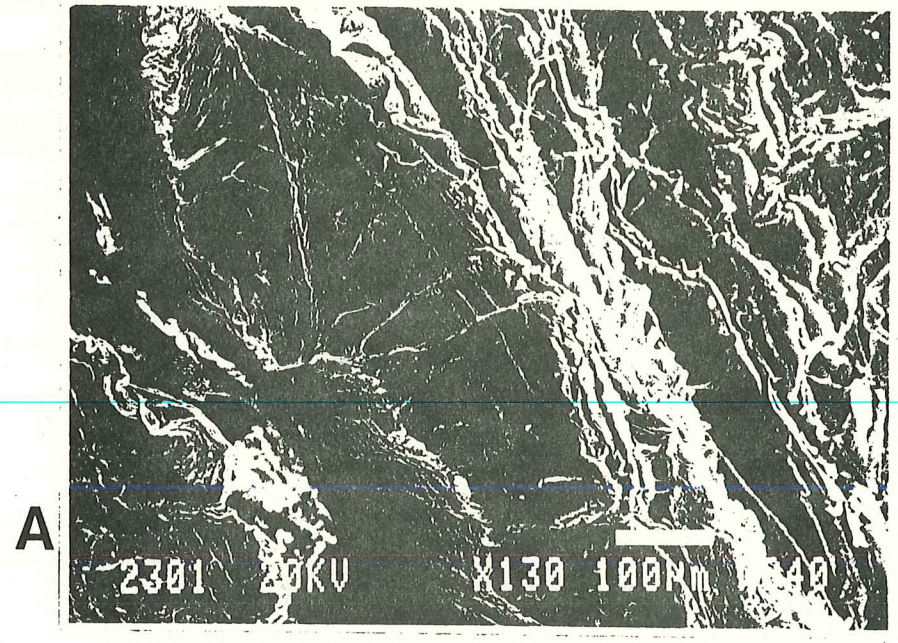


Figure V.37: Fibrilles transversales du LCA humain. (A) Les fibres longitudinales de collagène Type I sont reliées par des fibrilles transversales (X 450). (B) Fort grossissement montrant le site d'ancrage de ces fibrilles de liaison (X 1200).



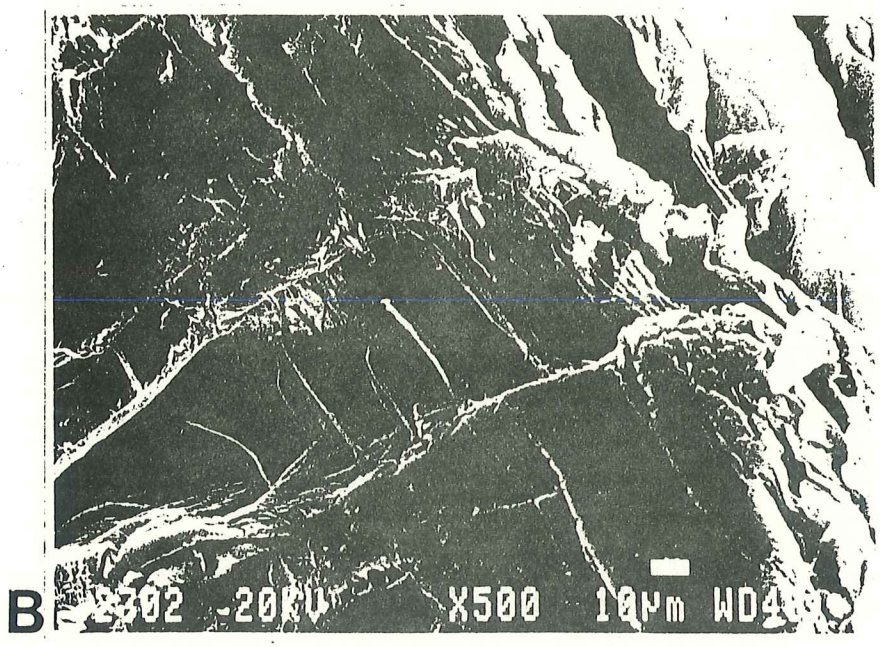
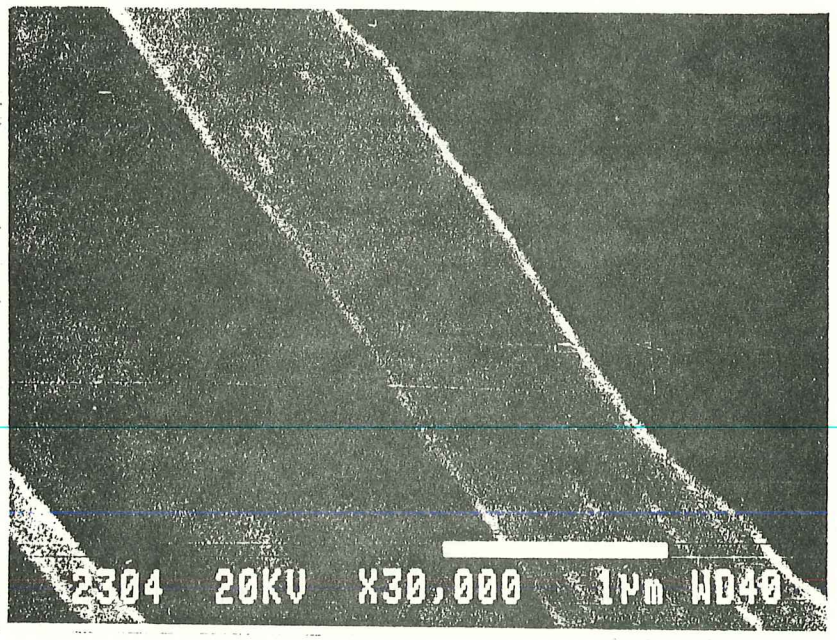


Figure V.38:

Fibrilles transversales du LCA humain. (A) et (B) Les sous-fascicules également sont reliés par des fibrilles transversales (respect. X 130 et X 500).



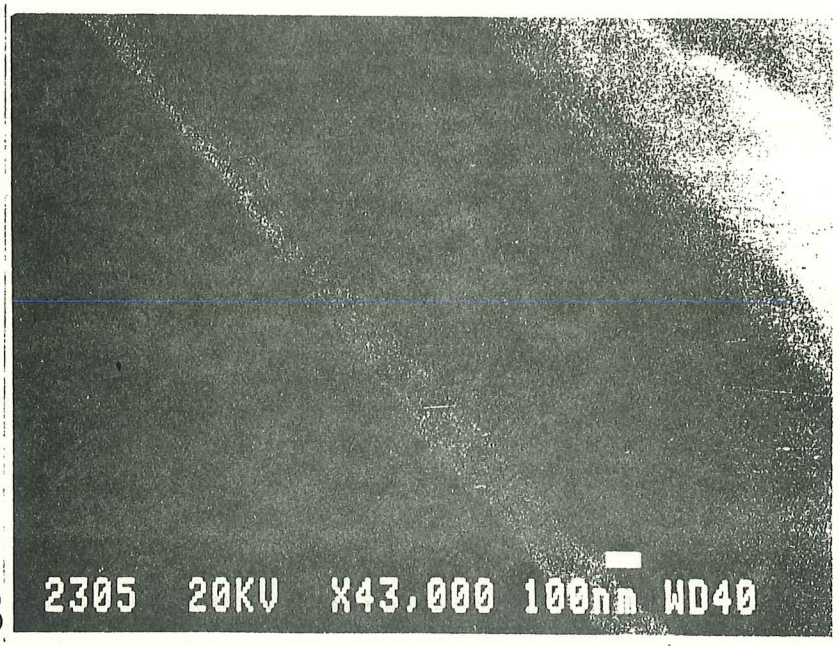


Figure V.39:

A plus fort grossissement (X 40.000), ces fibrilles transversales ne présentent pas de striation au MEB (X 40000).

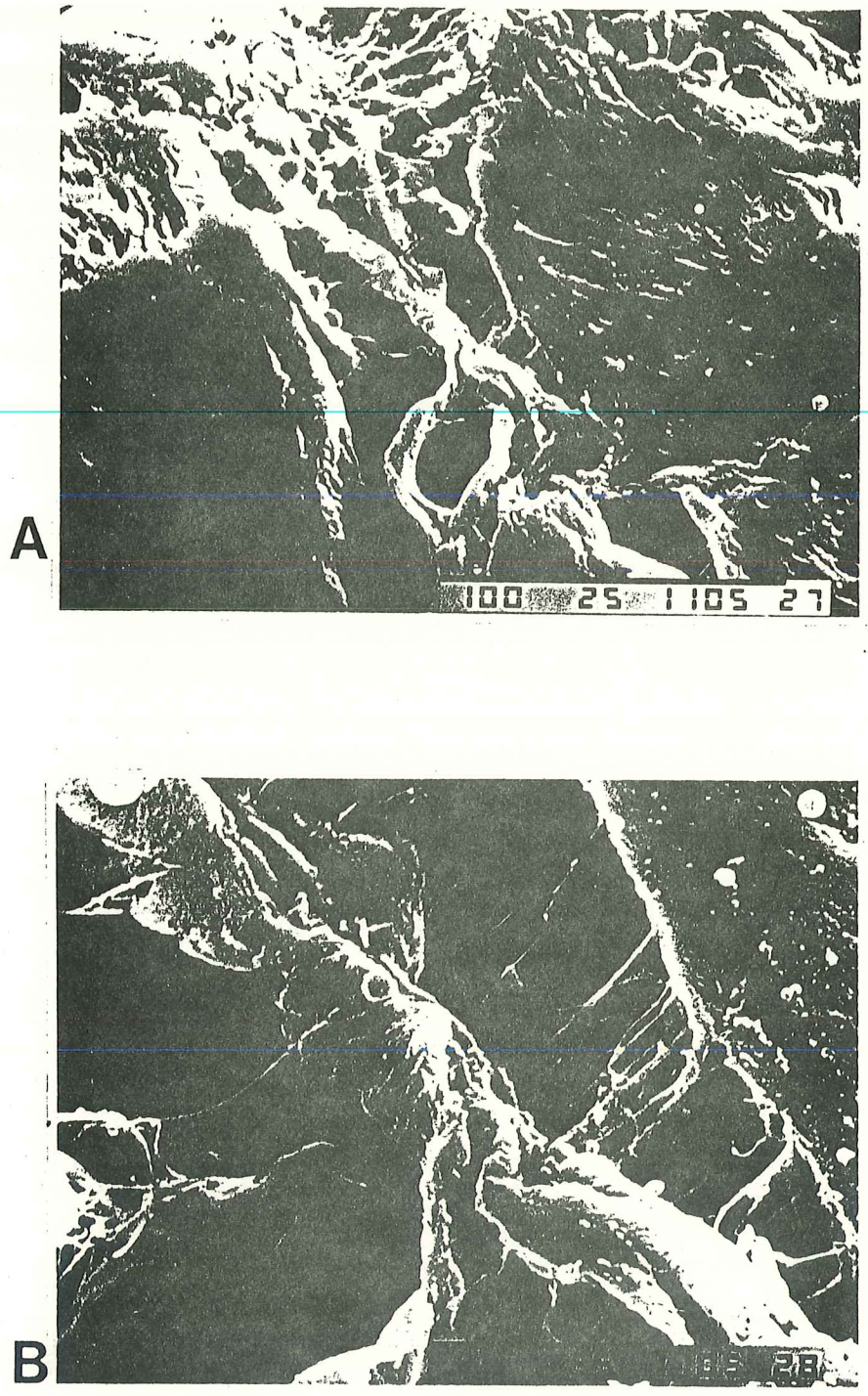
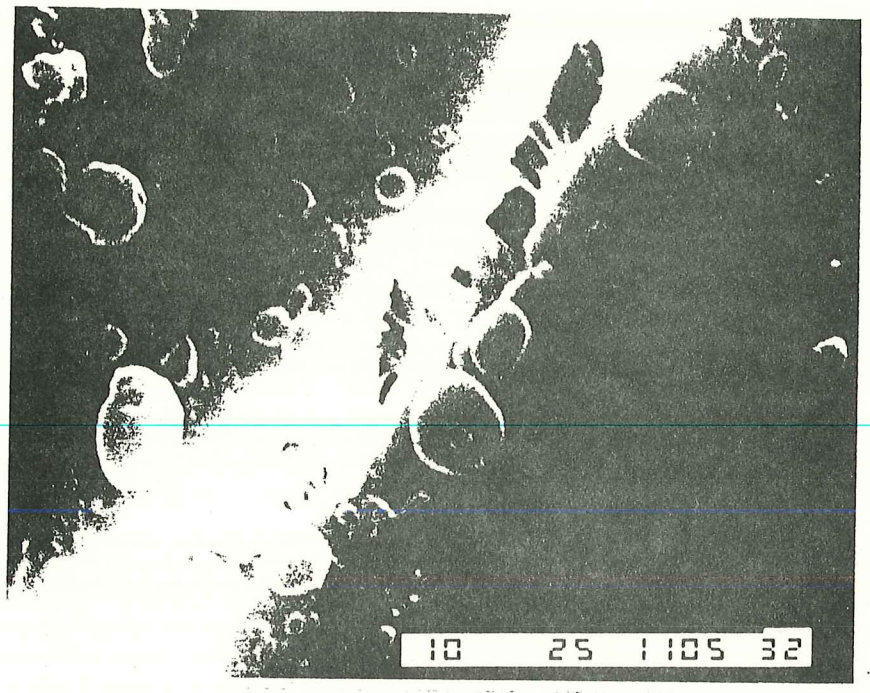


Figure V.40: Digestion enzymatique des fibrilles de liaison du LCA humain. (A) et (B) montrent que ces fibrilles résistent à un traitement à l'élastase et à l'hyaluronidase (respect. X 500 et X 2000).



A



B

Figure V.41:

Idem que V.40. (A) Fibrilles de LCA canin (X 5000). (B) Fibrilles de LR canin (X 1500).

Par ailleurs, ce type de fibrilles a été observé sur des spécimens ayant subis un traitement de digestion à l'élastase et à l'hyaluronidase (figures V.40 et V.41).

V.1.4 Interprétation

Nous avons vu qu'au delà du niveau de la fibrille, l'organisation hiérarchique du collagène varie d'un tissu à l'autre. A partir de nos observations sur les ligaments humains et canins, nous proposons une représentation schématique de cette hiérarchie du collagène.

Par ailleurs, nous avons signalé des contradictions au niveau des différents modèles proposés pour l'arrangement des unités fibrillaires de collagène. Nos résultats nous amènent à suggérer deux modèles d'arrangement de ces entités fibreuses. Ces modèles intégrent les principaux éléments des précédents modèles, mais des détails nouveaux sont introduits pour tenir compte de l'évidence microscopique présentée ci-dessus.

Représentation schématique de la hiérarchie du collagène

Il apparait d'après nos observations microscopiques, que le collagène ligamentaire possède une organisation fibreuse assez complexe. Une organisation hiérarchique du collagène, du niveau supramoléculaire au niveau macroscopique, est proposée à la figure V.42. Il n'y a pas de différence inter-espèces (ligament humain et canin) ou inter-tissulaire (LCA et LR) quant au nombre de niveaux de la hiérarchie. La plus petite unité structurale est la sub-fibrille de collagène. Plusieurs sub-fibrilles s'assemblent pour former l'unité suivante, appelée la fibrille. On distingue ensuite les fibres qui sont formées de plusieurs fibrilles. On retrouve finalement les sous-fascicules et les fascicules composants le ligament. Il est à noter que, par rapport au collagène du TQR, deux niveaux supplémentaires (fibre et sous-fascicule) sont introduits. Nous verrons au paragraphe suivant les dimensions de chaque niveau structural de cette hiérarchie. Du point de vue dimensionnelle, il est difficile d'établir

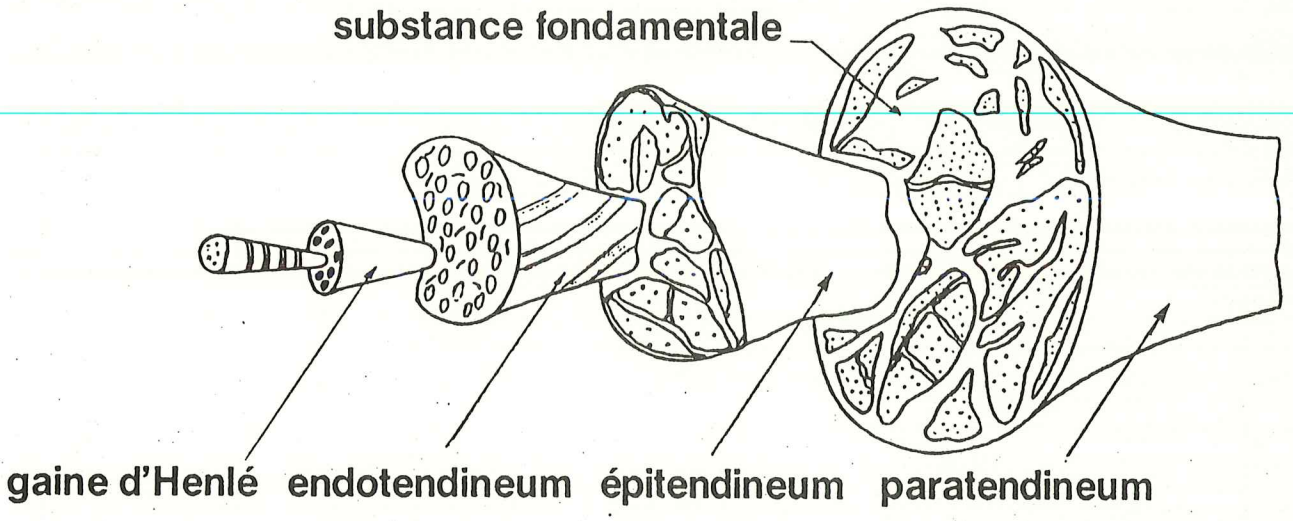


Figure V-42 Représentation schématique de l'organisation hiérarchique du collagène.

(Modifié d'après Kastelic et al. 1978)

une frontière entre tous les niveaux successifs. Toutefois, morphologiquement, on peut les distinguer clairement. Ainsi, les fibrilles apparaissent souvent composées de sub-fibrilles, avec à certains endroits une fusion des sub-fibrilles, et à d'autres une séparation de celles-ci. Les sous-fascicules sont caractérisés par une section droite de forme allongée et une gaine de tissu conjonctif relativement épaisse (endotendineum), alors que les fibres sont plutôt de section circulaire et entourées d'une mince gaine de Henlé. Quant aux fascicules, on peut les distinguer facilement. Ils sont formés par des sous-fascicules entourés par une gaine plus épaisse que l'endotendineum, appelée le péritendineum.

Il est important de souligner que des fibres et des sous-fascicules isolés, c'est-à-dire non intégrés dans un fascicule, ont été observés dans la région postéro-latérale du LCA et postérieure du LR. On ignore encore les mécanismes de formation des différentes unités de la hiérarchie du

collagène. Il est probable que les différents niveaux soient formés par croissance, c'est-à-dire par fusion des différentes unités.

Modèles d'arrangement du collagène:
micro-architecture et ondulation

A partir de nos observations microscopiques, nous proposons deux modèles de la micro-architecture des fibrilles de collagène pour former des unités plus grandes.

a) Modèle I

Dans ce modèle, le fascicule de section droite en forme d'ellipse allongée est collabé périodiquement dans deux dimensions. Les fibrilles de collagène des fibres constituantes sont disposées parallèlement à l'axe longitudinal du fascicule (figure V.43a). Dans la partie centrale de la fibre, les fibrilles sont droites, alors que les fibrilles périphériques sont ondulées avec une période p (figure V.43b). Cette ondulation augmente du centre vers la

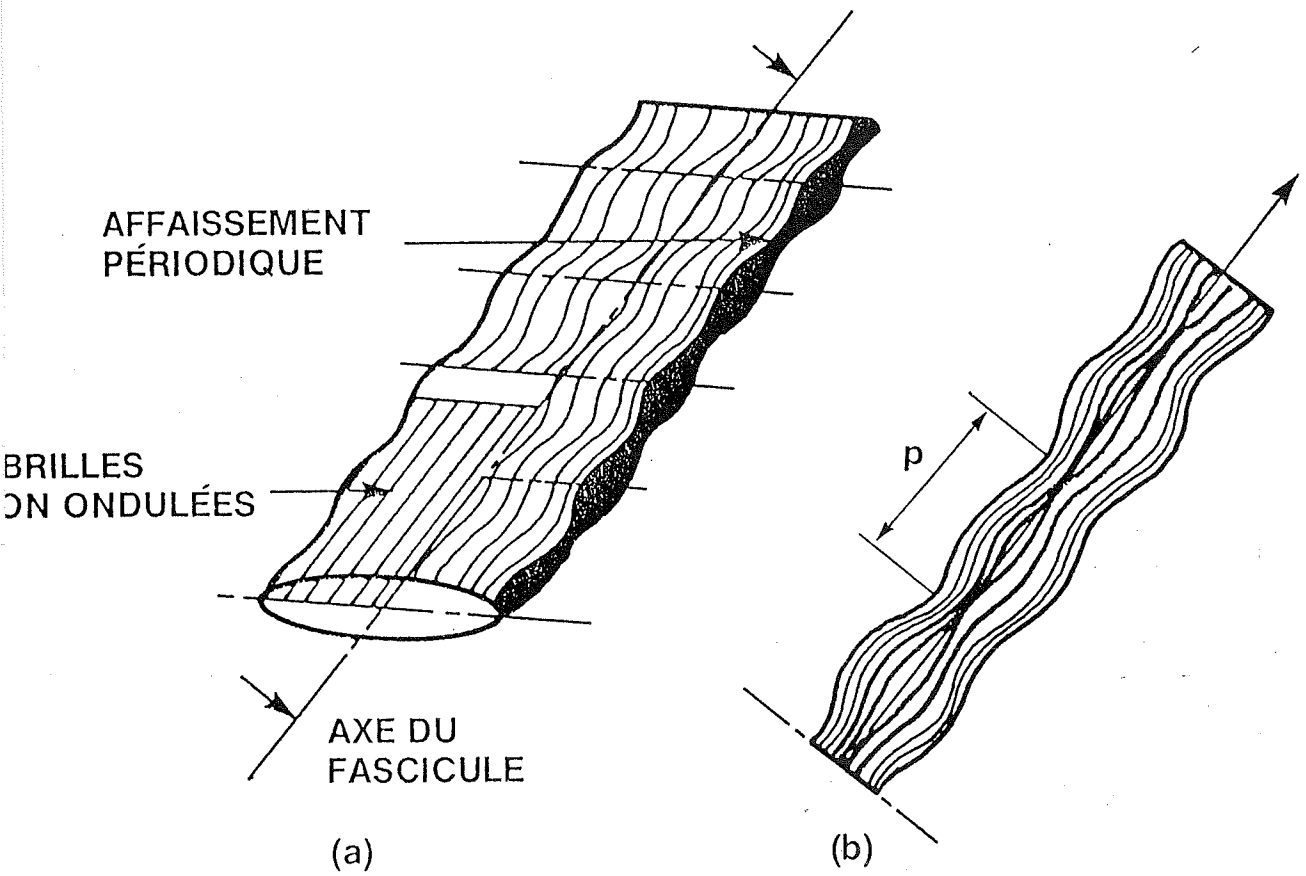


Figure V-43 Modèle I: ondulation planaire

périphérie. Ce modèle est en accord avec le modèle à structure symmétrique suggéré par KASTELIC (1978).

Les fibrilles possèdent alors une configuration d'onde planaire, avec un plan d'ondulation perpendiculaire aux côtés aplatis de la fibre. En d'autres termes, la direction des bandes d'écrasement (maxima et minima des ondes) est perpendiculaire à l'axe de la fibre.

Cette représentation schématique de la micro-architecture des fibrilles s'accorde également avec les résultats de DIAMANT (1972), dans le sens que même si on tournait la fibre autour de son axe longitudinal, les creux et les ventres de l'ondulation périphérique ne se déplaceraient pas comme dans une ondulation en hélice.

b) Modèle II

Dans ce second modèle, la fibre de collagène est également l'unité structurale de base du ligament. Les fibrilles internes composant la fibre sont considérées

comme étant organisées en hélice d'angle θ , et de demi-pas apparent h (figure 5.44a). Comme dans le modèle I, la fibre entière est aplatie périodiquement dans deux dimensions, mais les maxima et minima des fibrilles consécutives sont inclinés d'un angle α par rapport à l'axe longitudinal. Cet arrangement donne une morphologie de surface ondulée de période p. Ce phénomène d'aplatissement de la surface latérale de la fibre se produit vers le centre de sorte que les fibrilles en hélice présentent une forme d'onde hélicoïdale. La figure 5.44b illustre la micro-architecture des fibrilles. Les fibrilles périphériques sont des hélices ondulées avec une amplitude maximale, alors que les fibrilles centrales sont des hélices redressées.

V.1.5 Microscopie quantitative

L'examen quantitatif de la microstructure s'appelle la microscopie quantitative. L'une des tâches importantes, qui s'imposent d'ores et déjà à la biomécanique des tissus biologiques est la collecte systématique des données sur la morphologie et la micro-architecture. La revue de

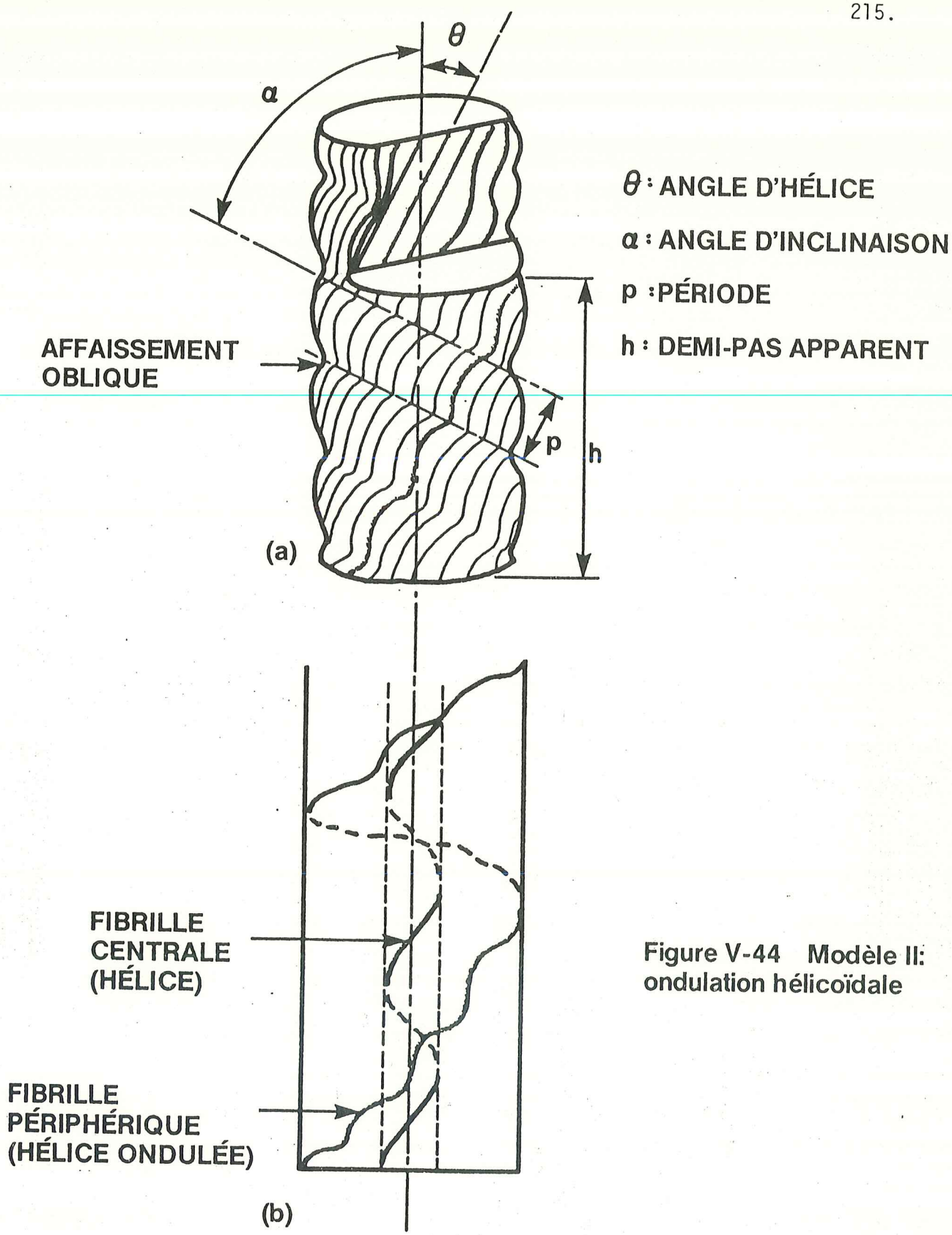


Figure V-44 Modèle II: ondulation hélicoïdale

littérature du chapitre II, nous révèle que la caractérisation quantitative de la micro-anatomie des ligaments est encore à ses débuts. Les données disponibles concernent les paramètres anatomiques du TQR [KASTELIC, 1979].

Dans cette partie, nous présenterons les résultats de l'analyse morphométrique effectuée sur des ligaments canins et humains. Nous examinerons successivement l'évaluation du rétrécissement des tissus, les dimensions des différentes unités du collagène, et les valeurs des paramètres structuraux définis au paragraphe V.1.4.

Rétrécissement du tissu

Toute étude des propriétés métriques d'un spécimen requièrt des méthodes de préparation qui assurent la fidélité des angles, des distances et des aires impliqués. On a vu que la méthode de séchage au point critique des tissus biologiques provoque un rétrécissement. Il est donc nécessaire d'évaluer et de réduire le degré du

rétrécissement pour assurer la précison des mesures morphométriques.

Des mesures de rétrécissement linéaire ont été effectuées à la surface de coupes longitudinales de ligaments canins. Les rétrécissements dans le sens axial et transversal sont donnés respectivement par:

$$r_a = \frac{d - do}{do} \times 100, \quad \text{et} \quad r_t = \frac{h - ho}{ho} \times 100$$

où do et d sont les distances entre 2 repères longitudinaux avant et après traitement pour séchage au point critique; ho et h représentent les distances entre 2 repères transversaux avant et après SPC (figure IV.4).

Pour chaque spécimen, nous avons effectué une dizaine de mesures de r_a et de r_t. Le tableau V.1 résume les valeurs moyennes obtenues sur cinq ligaments en

Tableau V.1: Rétrécissement linéaire des spécimens.

MÉTHODE I			MÉTHODE II		
No Spécimen	Rétrécissement (%) Axial ra	Transversal rt	No Spécimen	Rétrécissement (%) Axial ra	Transversal rt
1	4,5 ± 0,4	26,4 ± 4,1	6	3,4 ± 0,5	12,7 ± 2,8
2	6 ± 1,2	22,6 ± 5	7	6,2 ± 1,3	14,2 ± 4,1
3	4 ± 0,6	13,1 ± 2,3	8	2,8 ± 0,3	16,1 ± 4,6
4	5,3 ± 1,8	23 ± 4,6	9	5,4 ± 0,8	16,5 ± 5,3
5	7,2 ± 2,4	31,3 ± 7,5	10	4,8 ± 1,2	13,6 ± 3,6

utilisant la méthode de préparation conventionnelle (méthode I), et sur cinq autres ligaments en utilisant un traitement à l'acide tannique (méthode II).

On peut remarquer que dans les deux cas, le rétrécissement linéaire dans le sens transversal est plus important que dans le sens axial. On constate, toutefois, que la méthode II réduit presque de moitié la valeur mesurée du rétrécissement transversal.

Ce rétrécissement anisotrope du tissu peut être attribué au retrait de la substance fondamentale contenant des GAG-s liées à l'eau lors de la déshydratation. En effet, les complexes de protéines de polysaccharide aussi bien que les GAG-s, non attachés au collagène, peuvent se dissoudre dans les fluides de transition ou intermédiaires (éthanol, anyl acétate, dioxyde de carbone).

Comme la substance fondamentale se trouve en majeure partie localisée entre les fascicules et les sous-fascicules de collagène, son extraction peut provoquer un affaissement,

relativement important dans le sens transversal, des unités fibreuses. Ce phénomène de "flambage" des entités de collagène a été observé par d'autres auteurs, et suggéré comme étant le mécanisme d'ondulation du collagène [DALE et coll., 1974].

Par ailleurs, les cellules (fibroblastes et érythrocytes) sont beaucoup plus sensibles au rétrécissement. LEE et coll. (1979) ont observé une réduction de 25 à 30% du diamètre des globules rouges après SPC. Quant aux lipides, qui peuvent également être solubles dans les fluides intermédiaires, ils ne représentent qu'environ 0,24% des ligaments articulaires du genou [RABINOWITZ et coll., 1979].

Le rétrécissement ne doit pas modifier d'une façon importante les dimensions des unités structurales du collagène, étant donné que la substance fondamentale et les cellules responsables du rétrécissement, sont principalement localisées dans l'espace inter-fasciculaire ou inter-sousfasciculaire. La méthode II réduit l'anisotropie

du rétrécissement et, par conséquent, préserve mieux la morphologie des unités structurales. Ces considérations nous ont amenés à adopter cette méthode de préparation pour nos expériences de microscopie quantitative.

Dimensions des différentes unités structurales du collagène

Pour les unités de section droite circulaire, c'est-à-dire les sub-fibrilles, les fibrilles et les fibres, nous avons mesuré leur diamètre sur des microphotographies prises à des grossissements de 10 000 à 100 000 fois. Quant aux dimensions des sous-fascicules, fascicules et ligaments, dont la forme de la section droite est tout à fait aléatoire, nous avons fait appel aux mesures de surface. Une série de 10 à 30 mesures a été effectuée pour chaque unité structurale et ceci pour chacun des spécimens.

Les figures V.45 et V.46 montrent la variation du diamètre des unités cylindriques en fonction de l'âge, pour les ligaments humains. On peut remarquer que, pour la

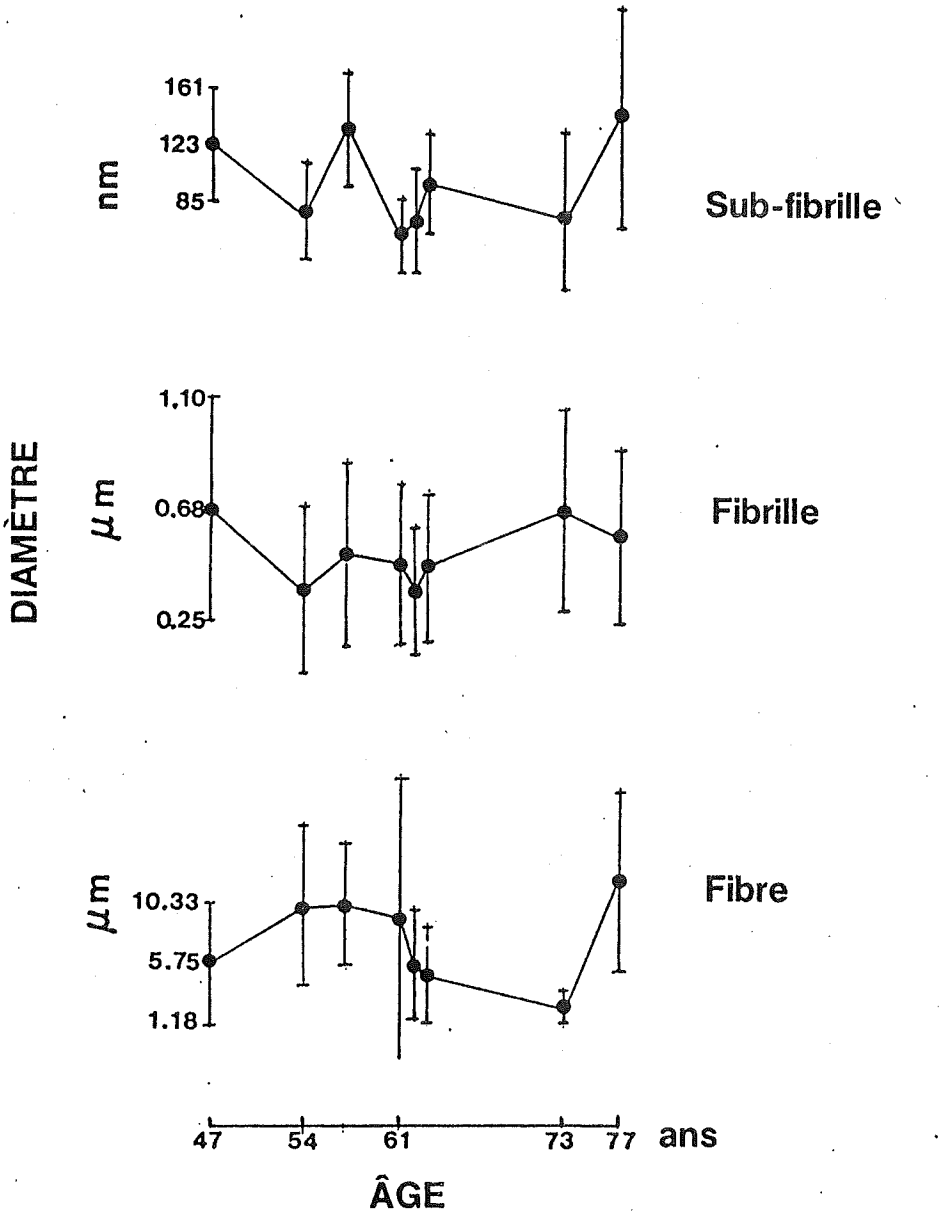


Figure V-45 Diamètre des unités de collagène du LCA humain en fonction de l'âge.

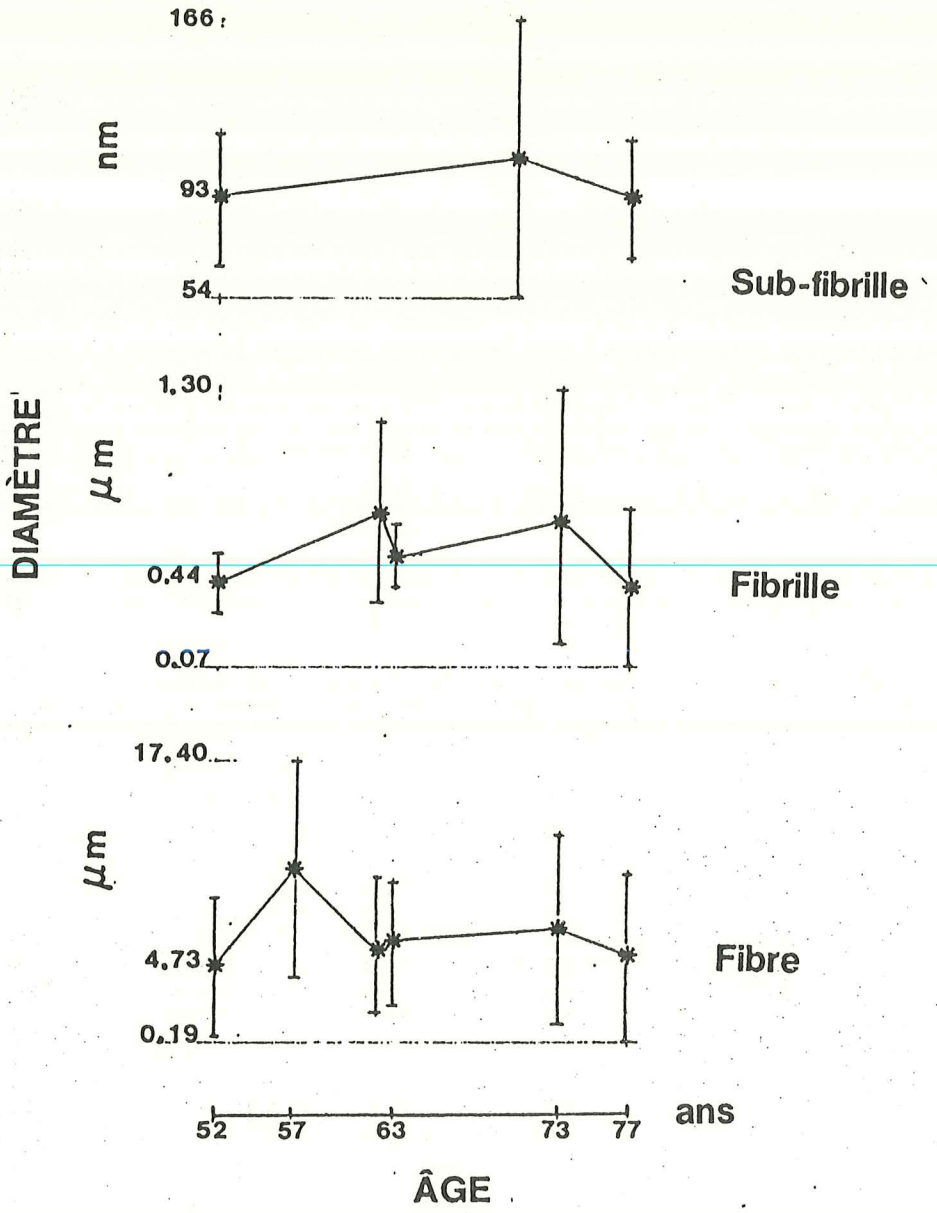


Figure V-46 Diamètre des unités de collagène du LR humain en fonction de l'âge.

population considérée, il y a très peu de variation du diamètre avec l'âge.

Le tableau V.2 donne les valeurs moyennes et les écarts types du diamètre des unités structurales obtenues sur une dizaine de spécimens humains et canins. Etant donné que le nombre de spécimens est limité, nous avons utilisé des tests de signification basés sur la distribution de Student. Pour un test bilatéral, au niveau 0,01, les différences inter-espèces du diamètre de ces unités sont significatives. On remarque une grande variabilité du diamètre des fibres de collagène. Quant aux fibrilles transversales, leur diamètre est du même ordre de grandeur que celui des fibrilles longitudinales de collagène type I.

Le tableau V.3 résume les valeurs moyennes de l'aire de la section droite des fascicules, des sous-fascicules, et du ligament, obtenues sur une dizaine de spécimens. La surface des fascicules et des sous-fascicules a été mesurée sur des sections aléatoires, quant à celle des ligaments

		Sub-Fibrille (μm)	Fibrille (μm)	Fibre (μm)	Fibrille transversale (μm)
LCA	Humain	0.09 ± 0.05	0.49 ± 0.34	7.63 ± 5.80	0.38 ± 0.30
	Canin	0.12 ± 0.04	0.33 ± 0.20	9.62 ± 5.70	0.65 ± 0.38
LR	Humain	0.13 ± 0.07	0.56 ± 0.35	6.53 ± 5.36	0.22 ± 0.07
	Canin	0.08 ± 0.02	0.51 ± 0.30	6.71 ± 4.27	0.18 ± 0.06

Tableau V-2 Diamètre des unités de collagène.

		Sous-fascicule ($\times 10^{-1}$mm^2)	Fascicule (mm^2)	Ligament ($\times 10^{1}$mm^2)
LCA	Humain	0.29 ± 0.22	0.50 ± 0.47	6.021 ± 0.489 (tibial) 2.918 ± 0.542 (médial) 4.858 ± 0.621 (fémoral)
	Canin	0.19 ± 0.16	0.25 ± 0.12	1.018 ± 0.19 (tibial) 0.554 ± 0.70 (médial) 0.801 ± 0.13 (fémoral)
LR	Humain	0.28 ± 0.28	0.29 ± 0.22	
	Canin	0.08 ± 0.07	0.40 ± 0.09	

Tableau V-3 Aire de la section droite des unités supérieures de la hiérarchie du collagène.

nous l'avons mesuré au niveau tibiale, médiale et fémorale à cause d'une grande variation topographique.

Ces résultats montrent un écart-type important de l'aire de la section droite des fascicules et des sous-fascicules, et qui est relié au fait que la taille de ces unités varie beaucoup d'une région à l'autre. On peut noter, par ailleurs, que l'aire de la section droite des fascicules et des sous-fascicules du LCA humain est à peu près le double de celle du LCA canin. Quant à l'aire de la section droite du LCA lui-même, elle varie de l'insertion tibiale à l'insertion fémorale chez les deux espèces. Elle a une valeur minimale au niveau de la section médiale du ligament.

Paramètres de l'ondulation

(i) Ondulation planaire

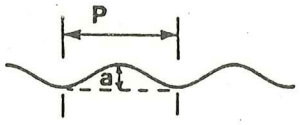
Nous avons mesuré les paramètres de l'ondulation planaire de surface, définis à la figure V.43, pour les

ligaments (LCA et LR) humains et canins. Pour chaque type de ligament, la période d'ondulation planaire (p) est déterminée à partir d'une dizaine de spécimens. Le tableau V.4 résume les valeurs de la période de l'ondulation de surface, ainsi que la largeur des unités à la surface desquelles ces périodes ont été mesurées. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives inter-espèces ou inter-tissulaires de la période. Par ailleurs, on peut noter que ce type d'ondulation se produit sur des unités structurales de largeur variant de 20 à 640 µm; c'est-à-dire que l'ondulation planaire peut se produire aussi bien sur les fibres que sur les fascicules et les sous-fascicules.

Les paramètres de l'ondulation planaire ont également été mesurés directement sur les fibrilles internes à partir de fascicules coupés longitudinalement. Dans ce cas, en plus de la période (p), nous avons pu mesurer l'amplitude (a) correspondante de l'ondulation. Par contre, seule la largeur des petits fascicules ondulés a pu être déterminée aux grossissements utilisés. Le tableau V.5

		Période p (μm)	Largeur des unités l (μm)
LCA	Humain	23.52 ± 7.38	90 - 640
	Canine	14.54 ± 1.11	20 - 80
LR	Humain	27.45 ± 7.80	70 - 220

Tableau V-4 Période de l'ondulation planaire de surface (p), et largeur des unités ondulées de collagène (l).



		Période p (μm)	Amplitude a (μm)	Largeur des unités l (μm)
LCA	Humain	19.60 ± 7.22	2.75 ± 0.83	4 - 50
	Canin	22.44 ± 6.22	4.86 ± 2.74	5 - 12
LR	Humain	25.43 ± 11.69	3.89 ± 1.88	4 - 10

Tableau V-5 Paramètres de l'ondulation planaire des fibrilles internes, et largeur des unités ondulées.

regroupe les valeurs de ces paramètres structuraux. On déduit que la période d'ondulation des fibrilles internes est sensiblement la même que celle de l'ondulation de surface des fascicules. Quant à l'amplitude, bien qu'elle décroît de la périphérie vers le centre du fascicule, nous n'avons pas mesuré la variation radiale. Les valeurs de l'amplitude du tableau V.5 ont été mesurées sur des fibrilles proches de la périphérie, c'est-à-dire là où l'ondulation est plus marquée.

(ii) Ondulation hélicoïdale

Les paramètres de l'ondulation hélicoïdale, définis à la figure 5.44, ont été également déterminés.

Les paramètres de l'ondulation hélicoïdale de surface tels que l'angle d'inclinaison (α) de la dépression par rapport à l'axe longitudinal, la période (p) de l'ondulation et la largeur de l'unité structurale correspondante ont été déterminés sur des unités structurales intacts (tableau V.6). Les résultats révèlent

		Angle d'inclinaison α°C /	Période p (μm)	Largeur des unités l (μm)
LCA	Humain	43.5 ± 3.04	41.30 ± 5.2	100 - 250
	Canin	40	15.33	40 - 150
LR	Humain	38 ± 9.89	30.50 ± 16.60	35 - 100

Tableau V-6 Paramètres de l'ondulation hélicoïdale de surface.

		Angle d'hélice θ (°)	1/2 pas apparent h (μm)	Largeur des unités (μm)
LCA	Humain	36.30 ± 4.20	92.42 ± 10.7	12,12 - 200
	Canin	41.66 ± 16.07	41 ± 25	20 - 80
LR	Humain	30.49 ± 6.58	78.93 ± 56.45	22 - 90
	Canin	32.25 ± 0.35	118.75 ± 114.90	6 - 143

Tableau V-7 Paramètres de l'ondulation hélicoïdale des fibrilles centrales et périphériques.

que ce type d'ondulation caractérise des unités de largeur variant de 35 à 250 µm.

Les paramètres de l'hélice tels que l'angle d'hélice (θ) et le demi-pas apparent (h) ont été mesurés aussi bien sur des fibrilles périphériques après retrait des gaines entourants les unités par digestion enzymatique, que sur des fibrilles centrales d'unités coupées longitudinalement. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau V.7 où nous avons également indiqué le sens des hélices. On constate qu'il y a très peu de variations inter-espèces et inter-tissulaires des paramètres θ, α et p; alors que le demi-pas apparent h de l'hélice varie beaucoup. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le diamètre des unités structurales varie beaucoup (6 à 200 µm). En effet, le demi-pas d'une hélice dépend du diamètre de l'unité et de l'angle d'hélice. Pour un fascicule cylindrique de diamètre d, le pas d'une hélice d'angle θ est donné par:

$$\text{pas} = \frac{\pi d}{\text{tg}\theta}$$

On remarque, par ailleurs, que dans le cas du LCA le sens de l'hélice est souvent à gauche, alors que dans le LR on observe des hélices à droite et des hélices à gauche.

V.1.6 Discussion

L'évaluation du rétrécissement des ligaments, lors de la préparation pour l'observation microscopique, suggère que l'ondulation sporadique pourrait être due au rétrécissement anisotrope du tissu. Ce type d'ondulation se produit d'ailleurs souvent sur des fibres isolées, après retrait de la substance fondamentale environnante. Cette ondulation sporadique, observée et décrite par ORBERG et coll. (1983) comme étant une configuration d'onde "inclinée", est donc probablement un artéfact de préparation et non une propriété morphologique intrinsèque des unités structurales du collagène. Toutefois, ce mécanisme dit de "flambage des fibres" ne peut expliquer la morphologie d'ondulation périodique caractérisant les fascicules et

leurs sub-divisions. En effet, celle-ci est trop régulière pour être reliée au phénomène de flambage aléatoire.

Les mesures morphométriques peuvent également être influencées par ce phénomène de rétrécissement. Cependant, eu égard au fait que le retrait de la substance fondamentale est le principal mécanisme de rétrécissement, celui-ci ne devrait pas réduire d'une façon importante les dimensions et les paramètres d'hélice et d'ondulation des unités structurales de collagène. Il peut, par contre, modifier l'aire totale de la section droite des ligaments.

Les dimensions des différentes unités de collagène du LCA humain s'accordent avec les résultats de DANYLCHUK et coll. (1978). Cependant, le niveau sub-fibrillaire n'a pas été mesuré par cet auteur. De même, les fibrilles transversales de liaison n'ont pas été décrites par les précédents auteurs. Ces fibrilles ont un diamètre du même ordre de grandeur que celui des fibrilles longitudinales de collagène type I. Nos observations montrent qu'elles

résistent à des digestions enzymatiques par l'élastase et l'hyaluronidase. et pourraient bien être constituées de collagène.

On observe une grande variabilité de l'aire de la section droite des fascicules et des sous-fascicules, notamment dans les ligaments humains. Cette variabilité dimensionnelle s'explique par la présence d'une hétérogénéité topographo-anatomique du tissu. En effet, la taille et la densité des fascicules varie à travers la section droite du ligament. Dans le LCA, la bande antéro-médiale est constituée de gros fascicules assez denses, alors que la bande postéro-latérale est formée de petits fascicules entourés de substance fondamentale. Notons que l'aire des fascicules du LR canin reste à peu près constante.

Cette caractérisation quantitative suggère la possibilité que les différentes unités de collagène soient formées par croissance successive des différents niveaux de la hiérarchie structurale. En effet, ITOH et coll. (1982)

ont observé que le rapport des diamètres de la fibrille et de la sub-fibrille ne change pas durant la croissance, la maturation et le vieillissement, et ont suggéré que la sub-fibrille était l'unité de croissance de la fibrille. En d'autres termes, le niveau sub-fibrillaire ne serait qu'un niveau transitoire, et qu'une sub-fibrille ne serait rien d'autre qu'une fibrille non encore développée. Toutefois, on ignore si ce processus de développement de la sub-fibrille s'effectue par addition de molécules de tropocollagène et/ou de microfibrilles pour former des fibrilles matures. On ne sait pas non plus si ce processus peut se généraliser aux niveaux supérieurs de la hiérarchie structurale du collagène.

Par ailleurs, le nombre d'unités formant l'unité supérieure est variable; ainsi 3 à 20 sous-fascicules peuvent s'assembler dans un fascicule. On ne sait pas si une taille optimale existe pour chaque niveau et si oui par quel mécanisme celle-ci serait-elle réglée. On sait qu'au niveau moléculaire, 3 chaines α s'enroulent en hélice à droite pour former la molécule de tropocollagène de 1,4 nm de diamètre;

et que 4 ou 5 molécules s'enroulent en une super-hélice à gauche pour former la microfibrille de 4 nm de diamètre [PIEZ, 1982]. Ensuite, plusieurs auteurs ont observé que les microfibrilles (2 à 500) sont arrangées en hélice à droite pour former la fibrille de collagène [PARRY et coll., 1978; PIEZ, 1982; ITOH et coll., 1982; GOTOH et coll., 1983]. On constate que, dans ce modèle, le sens de l'hélice change d'un niveau à l'autre. Un tel assemblage avec un sens alterné des hélices suit les règles de tressage des câbles et permet de convertir une contrainte axiale en une compression latérale stabilisant ainsi la structure.

Nos résultats montrent que du niveau fibrillaire au niveau fasciculaire, cette micro-architecture en hélice n'est pas systématique, bien qu'elle caractérise l'arrangement de certaines unités structurales. Si la logique de l'arrangement, en hélice à sens alterné à chaque niveau, se poursuivait au-delà du niveau sub-microscopique [VERZAR, 1957], on devrait s'attendre à ce que les fibrilles soient disposées en hélice à droite, les fibres en hélices à gauche et ainsi de suite jusqu'au niveau fasciculaire.

Cependant, nous avons observé des fibrilles disposées parallèlement à l'axe longitudinal des fibres, des sous-fascicules et des fascicules (modèle I). De plus, dans le cas d'arrangement des fibrilles en hélice (modèle II), nous avons vu que, dans le LR notamment, le sens des hélices était aussi bien à gauche qu'à droite. Quant à l'arrangement des fibres, des sous-fascicules et des fascicules, il n'est pas encore clair, bien que sur certaines coupes, il est difficile de suivre ces unités sur toute la longueur de leur trajectoire, suggérant ainsi un arrangement hélicoïdal. KENNEDY et coll. (1974) ont remarqué que certains fascicules du LCA humain sont disposés en hélice pour former le ligament. Par ailleurs, nous avons montré que le péritendineum présentait également une morphologie hélicoïdale. Par conséquent, cette micro-architecture en hélice (modèle II) est plus cohérente avec la présente évidence microscopique et également du point de vue biochimique. Cependant, nous avons observé aussi un arrangement parallèle des fibrilles (modèle I) notamment dans le LCA et que, par ailleurs, une vive controverse existe (paragraphe II.2.1.3) quant à la forme d'ondulation.

Pour certains auteurs, elle serait planaire (arrangement parallèle) et pour d'autres, elle est plutôt tridimensionnelle (arrangement hélicoïdal)

Ces considérations nous amènent à formuler quelques hypothèses pour justifier les deux modèles proposés.

(i) L'arrangement des fibrilles dépend du type du tissu, c'est-à-dire de la fonction. En effet, nous avons observé le modèle hélicoïdal (modèle II) plus souvent dans le LR que dans le LCA où l'arrangement parallèle (modèle I) se produit également. Rappelons que le LR est en réalité un tendon et que le modèle hélicoïdal est plus attesté dans les tendons [VERZAR, 1957; EVANS et coll., 1975]. Du point de vue fonctionnel, les tendons jouent un rôle important dans l'économie d'énergie métabolique durant la locomotion. Ils sont allongés à chaque pas, et emmagasinent une certaine quantité d'énergie de déformation élastique qu'ils libèrent ensuite lors du rappel élastique subséquent [ALEXANDER, 1981]. De plus, les tendons subissent des vitesses de chargements très rapides (dynamiques) et doivent avoir des

facteurs d'amortissement élevés. Du point de vue mécanique, la configuration hélicoïdale permettrait aux tendons d'assumer ces fonctions. Le mécanisme de relaxation des fibrilles hélicoïdales serait le suivant: l'énergie dépensée durant la déformation est transformée en énergie potentielle de déformation élastique. Après l'allongement du tendon, cette énergie de déformation élastique est utilisée pour ramener les fibrilles à leur état initial.

Quant aux ligaments, ce sont des tissus "passifs" qui travaillent à déplacement imposé.

(ii) L'arrangement parallèle des fibrilles serait un état intermédiaire. VERZAR (1957) a suggéré que la liaison entre les hélices serait maintenue par des liaisons pontiques, hydrogènes et ioniques. Cet auteur a montré que l'arrangement en hélice des fibrilles du TGR disparait après incubation du tissu dans l'acide acétique ou du collagènase, c'est-à-dire après rupture des liaisons. Toutefois, la structure en hélice réapparait après incubation dans une solution de Ringer, c'est-à-dire après relaxation des

fibrilles et reformation des liaisons. Selon VERZAR (1957), cette structure en hélice serait due à une interaction hydrogène entre les fibrilles de collagène et les GAG-s. Durant le vieillissement, la production des GAG-s décroit [VOGEL, 1980(a); ROBERT, 1983], par suite la régénération continuelle du facteur stabilisateur (c'est-à-dire les interactions GAG-collagène) de la fibre décroît également, et la fibre est alors "vieillie" et perd sa stabilité. Ceci suggère que la perte de l'arrangement hélicoïdal serait due à la rupture des liaisons et constitue un signe de vieillissement. Il est donc possible que l'arrangement parallèle (modèle I) soit dû à la rupture des liaisons durant la préparation des spécimens, notamment la perte des GAG-s. A noter également que les ligaments humains étudiés proviennent de sujets adultes (45 à 77 ans), et il est possible que des unités arrangées selon le modèle I soient des unités "vieillies".

(iii) Le modèle hélicoïdal II pourrait expliquer la controverse sur la forme de l'ondulation. La morphologie ondulée de la surface des fibres, des sous-fascicules et des

fascicules apparaît comme un phénomène d'affaissement périodique de la surface dans 2 dimensions. Il est probable que cette morphologie ondulée ne soit pas reliée à l'arrangement interne des fibrilles étant donné que nous l'avons observé aussi dans le cas d'arrangement parallèle des fibrilles (ondulation planaire). La confusion pourrait être due au fait que les auteurs suggèrant que l'ondulation soit un phénomène d'optique de fibrilles en hélice (tridimensionnelle) aient utilisé la microscopie à lumière transmise. Or, celle-ci ne peut révéler l'ondulation de surface mise ici en évidence par MEB. Localement, les fibrilles peuvent apparaître à fort grossissement comme onduler dans un plan, mais à faible grossissement les fibrilles sont des hélices ondulées.

Nos résultats révèlent que la taille des sub-fibrilles, des fibrilles et des fibres ne varie pas d'une façon notable avec l'âge chez une population adulte. La taille de ces unités reste donc constante lors du processus de vieillissement. Il en est de même des paramètres de l'ondulation planaire qui corrèlent bien avec

les données de la littérature (tableau 2.1). Quant aux paramètres de l'hélice, il n'existe pas à notre connaissance de données disponibles.

Nous avons vu qu'il n'existe pas de ligne de démarcation claire entre les 3 derniers niveaux de la hiérarchie structurale du collagène. Un fascicule peut être soit composé de sous-fascicules et de fibres discrets, soit formé simplement de fibrilles sans niveau intermédiaire. Dans ce dernier cas, les 2 modèles s'appliquent au fascicule et dans le cas de présence de subdivision discrète , ils s'appliquent au niveau des fibres constitutives.

L'incompréhension du mécanisme de l'origine de l'ondulation est due en partie aux manques de connaissance sur la croissance des tendons et des ligaments. GATHERCOLE et coll. (1978) ont remarqué que le tissu foetal présente une ondulation plus marquée que le tissu mature.

Par ailleurs, nous avons vu que ces tissus comportent d'autres éléments tels que l'élastine, les GAG-s,

l'eau..., dont l'organisation structurale n'a pas encore été étudiée. La compréhension des interactions entre ces divers constituants, aux différents niveaux de la hiérarchie globale, pourrait contribuer à l'élucidation du mécanisme d'ondulation.

V.2 Localisation ultrastructurale de l'élastine

V.2.1 Ligament canin

Nos résultats révèlent que des temps d'incubation de 5 à 10 minutes, de coupes minces, dans le complexe élastase-or, permettent d'obtenir un marquage de l'élastine suffisamment intense. Après 7 minutes d'incubation, on observe que les fibrilles de collagène de 40 à 100 nm de diamètre ne présentent que très peu de particules d'or (figures V.47 et V.52). De même, le tissu inter-fibrillaire, c'est-à-dire la substance de la matrice dans laquelle baignent les fibrilles de collagène, ne réagit pas avec le complexe (figure V.52). Par contre, on observe un marquage très intense, de la substance fondamentale entourant les

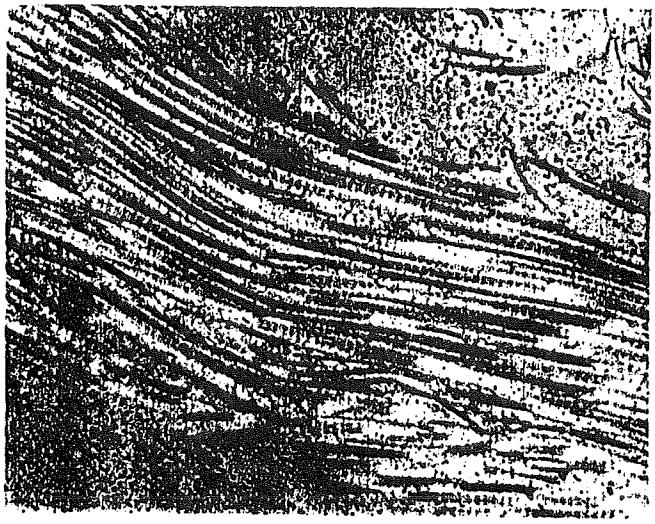


Figure V.47: Localisation ultrastructurale de l'élastine du LCA canin. Après 5 minutes d'incubation dans le complexe élastase-or, un marquage intense de l'élastine apparait autour de la fibre de collagène de diamètre 2,8 µm. On n'observe que très peu de particules d'or (marqueurs) sur les fibrilles constitutives d'apparence striées et de diamètre d'environ 100 nm (X 20520).



Figure V.48: Après 5 minutes d'incubation dans le complexe, les fibrilles striées de collagène du LCA canin ne sont pas marquées (X 33000).

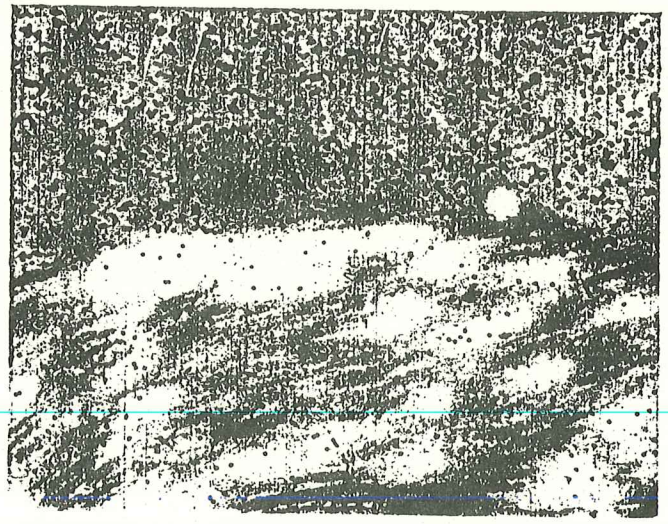


Figure V.49: LCA canin, 5 minutes d'incubation. On observe seulement quelques particules (un faible bruit de fond) sur le faisceau de fibrilles de collagène, alors que le matériel élastique est intensément marqué (X 33000).

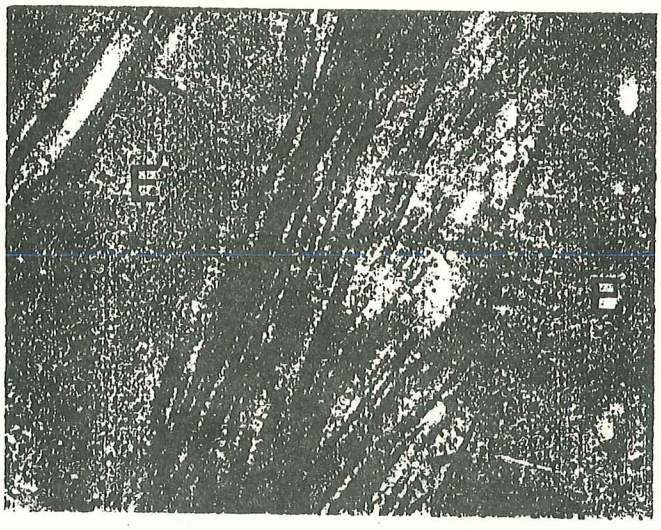


Figure V.50: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Un marquage intense (E) apparait entre les fibres de collagène. Les flèches indiquent des microfibrilles de 12 nm de diamètre, et qui ne réagissent pas avec le complexe (X 26000).

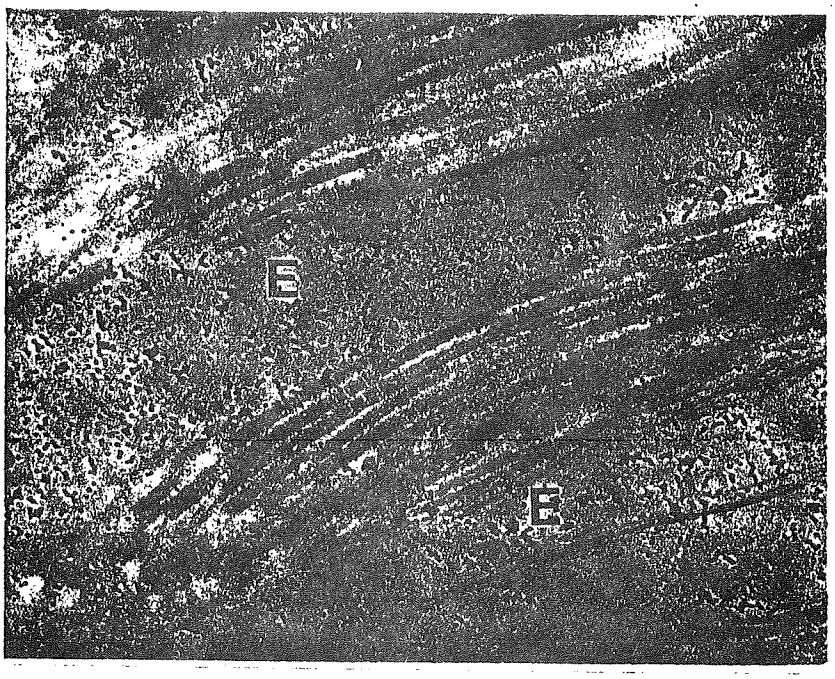


Figure V.51: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Les marqueurs d'or, donc l'élastine amorphe (E), sont principalement localisés entre les fibres de collagène (X 26000).

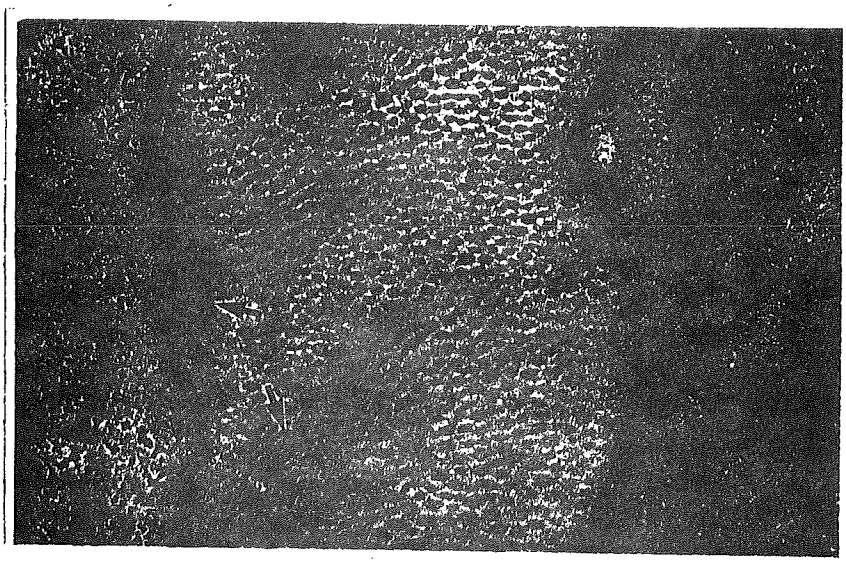


Figure V.52: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Fibrilles de collagène en coupe transversale ne réagissant pas avec le complexe. Les microfibrilles (flèches) ne sont pas marquées (X 26000).

faisceaux de fibrilles de collagène, c'est-à-dire les fibres (figures V.48, V.49 et V.50).

Si on diminue le temps d'incubation des coupes dans le complexe, le bruit de fond (marquage non spécifique) diminue également. Ainsi, après 5 minutes d'incubation, on n'observe pratiquement plus de particules d'or ni sur les fibrilles de collagène, ni dans la substance inter-fibrillaire (figures V.47 et V.48).

L'observation des coupes longitudinales du ligament suggère que l'élastine est plutôt située au niveau supérieur de la hiérarchie du collagène. En effet, les figures V.50 et V.51 démontrent clairement que les marqueurs d'élastine sont principalement localisés dans la substance fondamentale située entre les fibres de collagène.

On peut remarquer que les particules d'or ne présentent aucun arrangement particulier et paraissent s'agglutiner par petits groupes d'une façon aléatoire.

Des microfibrilles de 11 à 15 nm de diamètre ont été observées à proximité de la substance fortement marquée avec les particules. Ces microfibrilles ne réagissent pas avec le complexe (figures V.50, V.52 et V.55).

Par ailleurs, les fibroblastes qui synthétisent l'élastine et le collagène, ne semblent par réagir avec le complexe élastase-or. Seul le matériel dans lequel baignent ces fibroblastes est marqué avec les particules. Les figures V.53 et V.54 montrent des fibroblastes à l'état de "repos" et qui restent largement incolorés. La figure V.55 montre un fibroblaste actif et on n'observe aucun marqueur d'or ni sur le noyau, ni sur le réticulum endoplasmique de la cellule. Les fibrilles de collagène fraîchement synthétisées sont également non marquées.

V.2.2 Aorte canine (contrôle)

Les spécimens aortiques de contrôle ont été traités et marqués parallèlement aux coupes des ligaments sous les mêmes conditions.

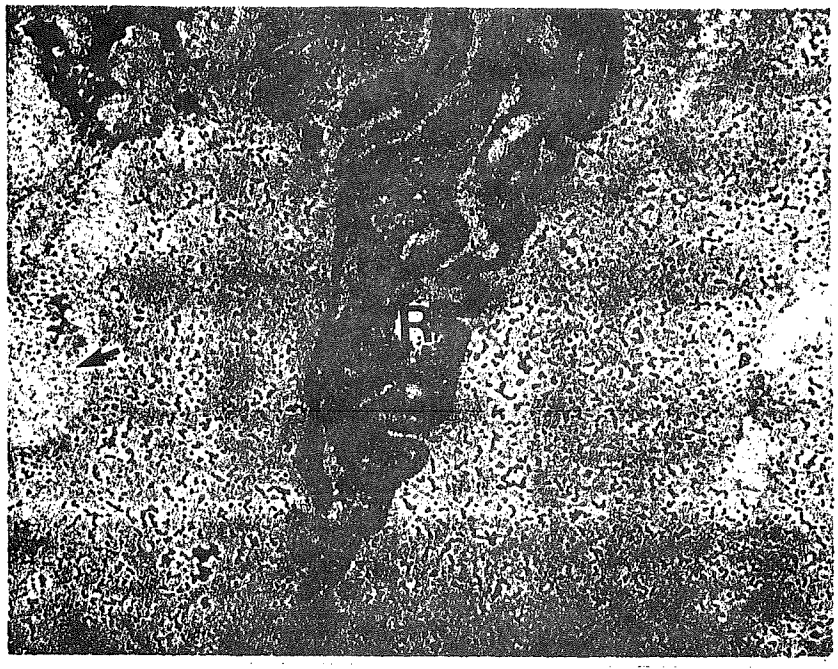


Figure V.53: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Le reticulum endoplasmique (ER) du fibroblaste "au repos" n'est pas marqué, de même que les microfibrilles (flèches) (X 16000).

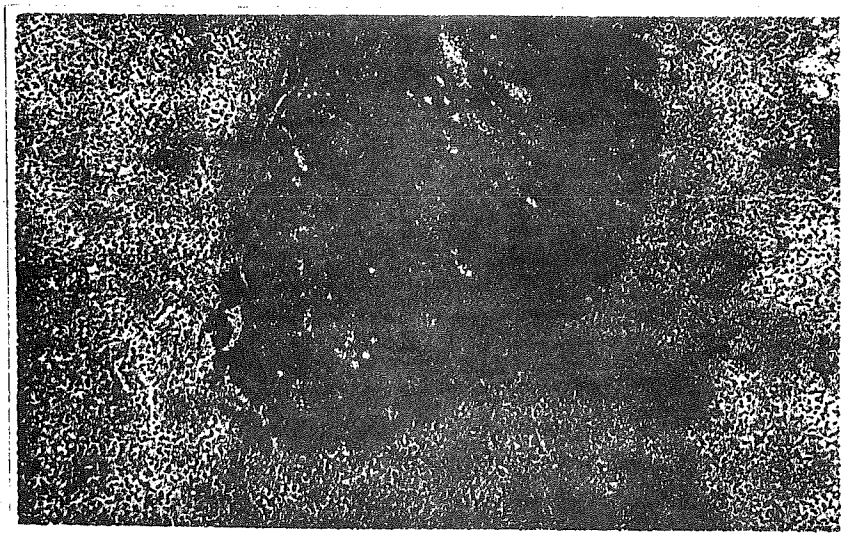


Figure V.54: LCA canin, 5 minutes d'incubation. Le fibroblaste n'est pas marqué alors que la substance fondamentale autour est intensément marquée (X 16000).

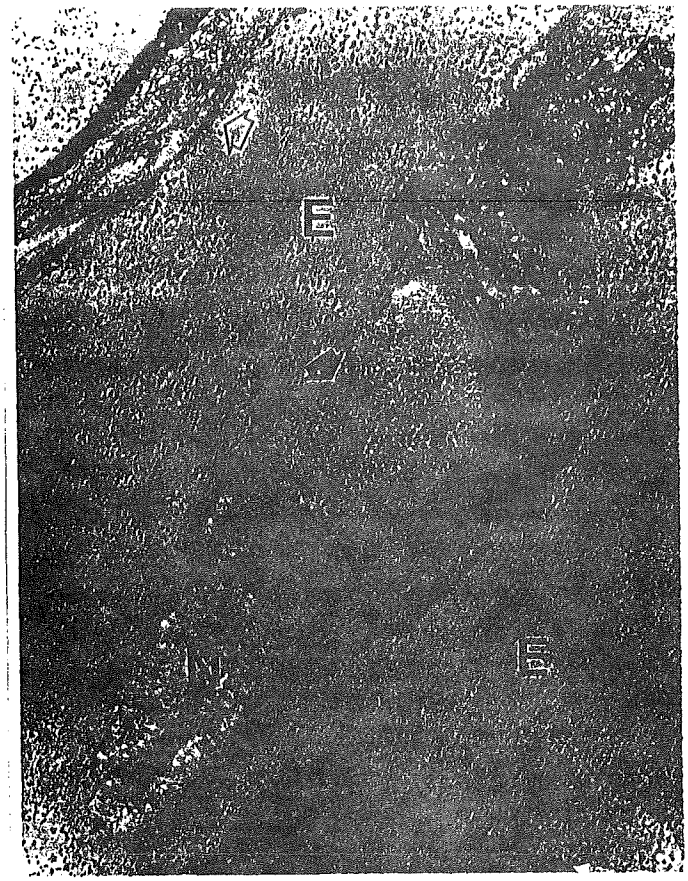


Figure V.55:

LCA canin, 7 minutes d'incubation. Le fibroblaste actif (N), les fibrilles de collagène fraîchement synthétisées (flèches pleines), et les microfibrilles (flèches claires) ne réagissent pas au complexe (X 12540).

Les résultats montrent qu'après une période d'incubation de 7 minutes, les lamelles élastiques de la média présentent un marquage intense à l'aide des particules d'or (figure V.56). On n'observe que quelques particules (bruit de fond) sur le muscle lisse. La figure V.57 montre qu'une diminution du temps d'incubation permet de réduire les particules non spécifiques. On constate également que les cellules du muscle lisse, ainsi que l'endothélium, ne sont pas marqués. La figure V.58 montre qu'après 30 minutes d'incubation, le marquage est surtout concentré sur la lamelle élastique de l'aorte. Au delà de 30 minutes, le complexe sèche et les particules non spécifiques ne peuvent être éliminées lors du rinçage des coupes minces.

On remarque que, dans le cas de l'aorte également, les traceurs d'or colloïdal ne présentent pas d'arrangement particulier dans les structures colorées.

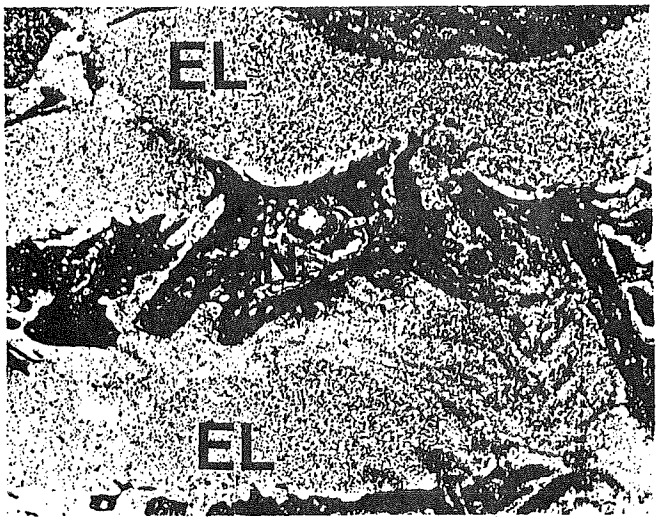


Figure V.56: Aorte canine (contrôle), 7 minutes d'incubation. La membrane élastique (EL) de la média est intensément marquée avec des particules d'or. Seul un faible bruit de fond apparaît sur le noyau (N) des cellules du muscle lisse (X 3876).

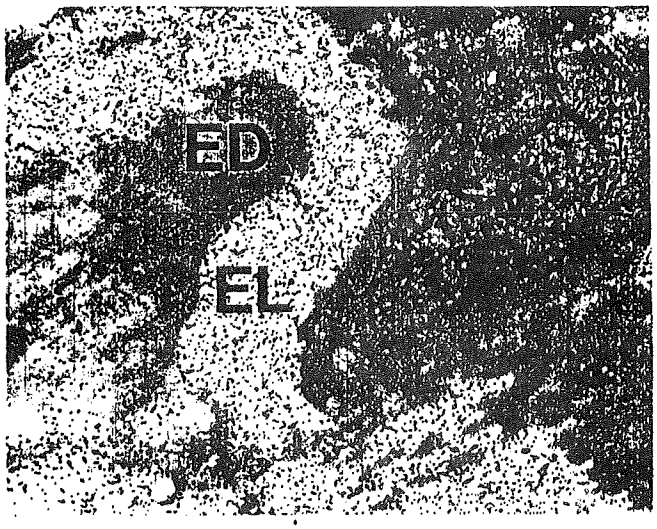


Figure V.57: Aorte canine, 30 minutes d'incubation. Marquage intense et spécifique de l'élastica interna, et absence de particules sur l'endothelium (ED) et sur le muscle lisse (SM) (X 13000).

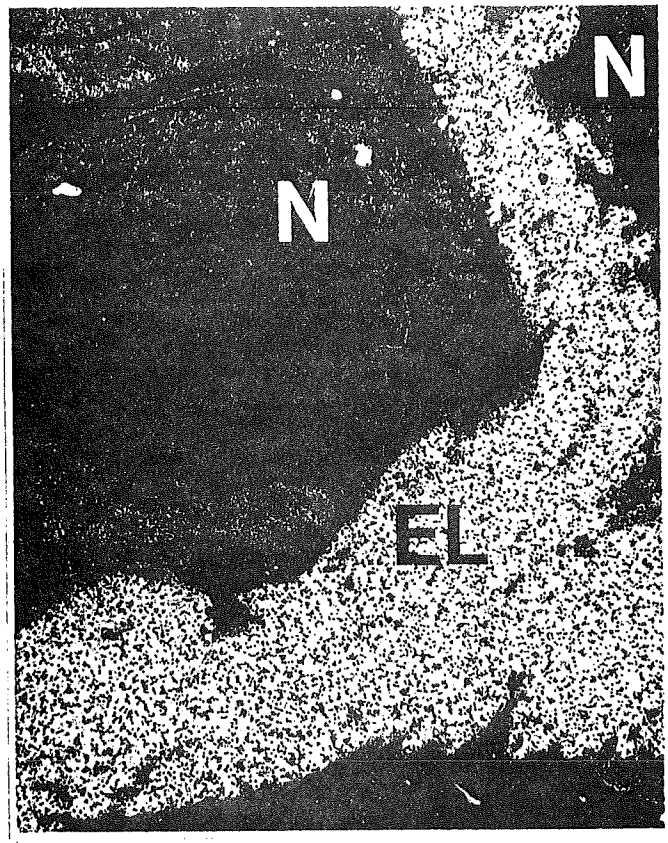


Figure V.58: Aorte canine, 5 minutes d'incubation. Idem que la figure V.57 (X 10000).

V.2.3 Ligament humain

Des coupes minces de LCA humain ont été préparées en suivant exactement la même procédure de fixation et de marquage cytochimique que précédemment.

Les résultats ont démontré que sur la plupart des coupes observées, il est impossible de distinguer les détails microstructuraux du tissu. La figure V.59 montre que les particules d'or sont localisées spécifiquement dans des plages claires du tissu. Le contrôle aortique montre la spécificité du marquage (figure V.60). Toutefois, le manque de contraste ne permet pas d'identifier la nature des structures environnantes et qui est probablement du collagène.

V.2.4 Discussion

La spécificité du marquage est démontrée par le fait que les lamelles élastiques de l'aorte, constituées

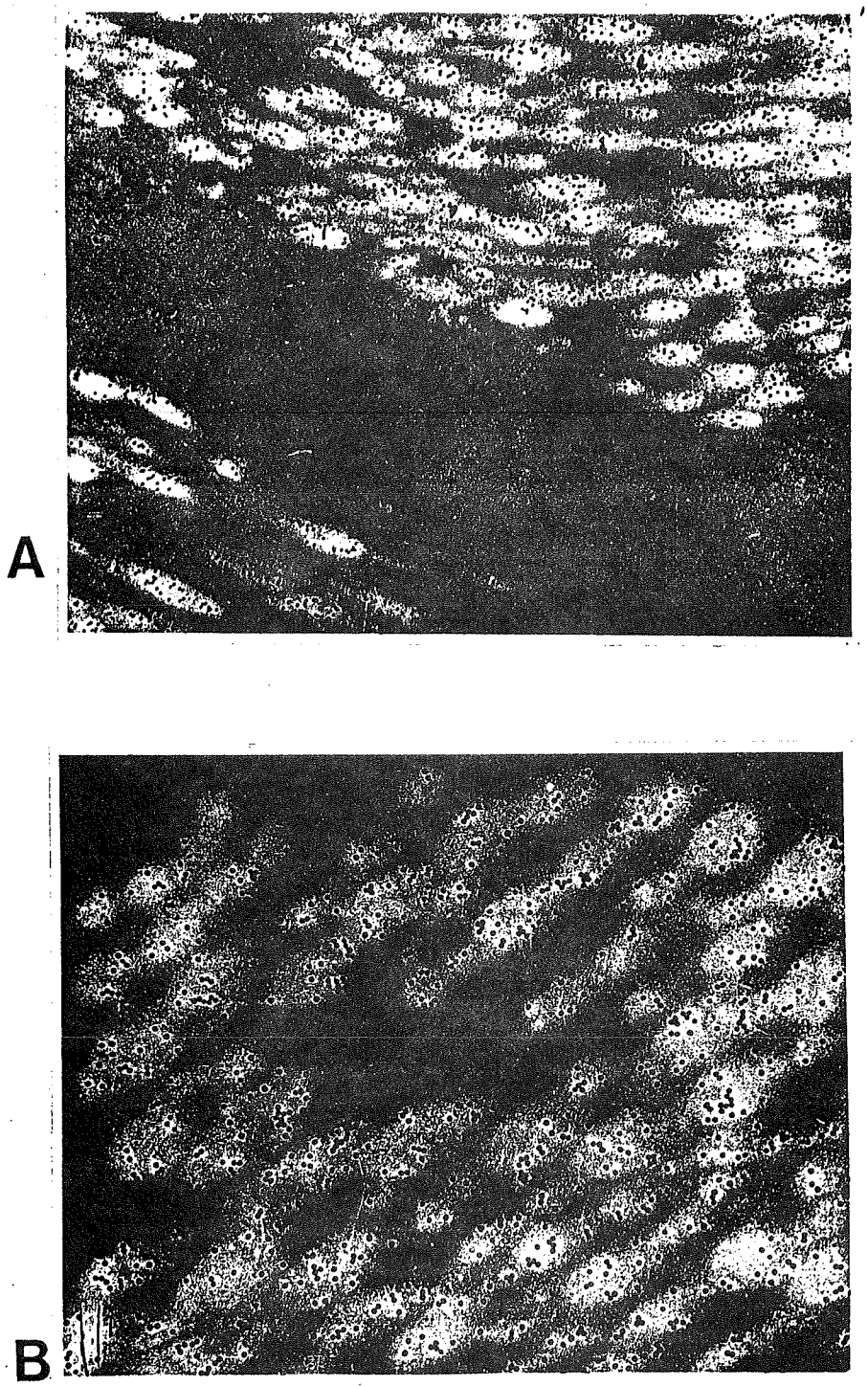


Figure V.59: LCA humain, 7 minutes d'incubation. Les particules d'or sont localisées spécifiquement dans des plages claires du tissu. Manque de contraste des structures environnantes (respect. X 16000 et X 33000).

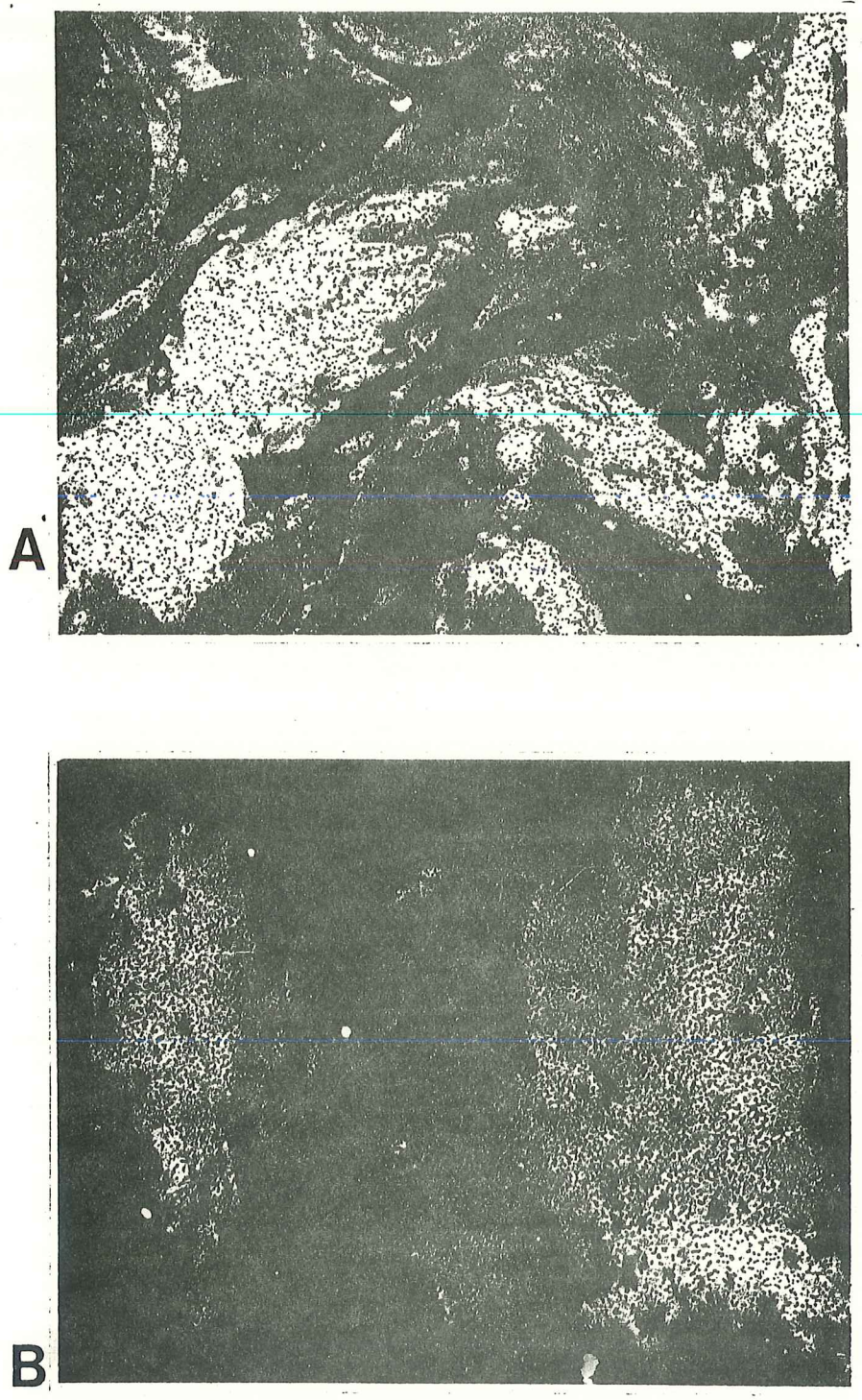


Figure V.60: Aorte canine, 7 minutes d'incubation. Le tissu de contrôle montre le spécificité du complexe utilisé pour le marquage du LCA humain (X 10000).

principalement d'élastine, réagissent fortement avec le complexe. Cette spécificité est confirmée par l'absence de particules d'or (ou très peu) sur le muscle lisse et l'endothélium du tissu aortique. Par ailleurs, les fibrilles de collagène, les fibroblastes et la composante microfibrillaire du LCA canin ne présentent pas de marquage.

Nos observations montrent que les marqueurs d'élastine sont essentiellement localisés dans la substance fondamentale située entre les fibres de collagène du LCA canin. Ces résultats suggèrent que le substrat de l'enzyme, c'est-à-dire l'élastine, est localisée dans cette substance, contenant également de l'eau et des GAG-s, et qui se trouve entre les fibres de collagène.

Par contre, à l'intérieur même des fibres de collagène, il n'y aurait pas d'élastine contrairement à l'hypothèse selon laquelle les fibrilles de collagène sont attachées aux fibres d'élastine [LANIR, 1978 et 1980; THIRY et coll., 1981].

Cette localisation de l'élastine est confirmée topographiquement par le fait que la matrice entourant les fibroblastes soit intensément marquée. En effet, la microscopie optique nous révèle que dans le LCA canin, ces cellules sont alignées et localisées dans la substance fondamentale séparant les fibres et les fascicules de collagène (figures V.61 et V.62). Il est, par conséquent, possible que l'élastine se trouve également entre les fascicules et les subdivisions fasciculaires du collagène.

Les microfibrilles d'environ 12 nm de diamètre ne réagissent pas avec le complexe et ne contiennent donc pas d'élastine. D'ailleurs, comme l'a montré KADAR (1979), ces microfibrilles résistent à la digestion par élastase. Elles sont probablement des glycoprotéines microfibrillaires qui accompagnent souvent l'élastine amorphe [SEAR et coll., 1978 et 1981].

Par ailleurs, bien que certains auteurs aient signalé un arrangement fibrillaire de l'élastine, nos

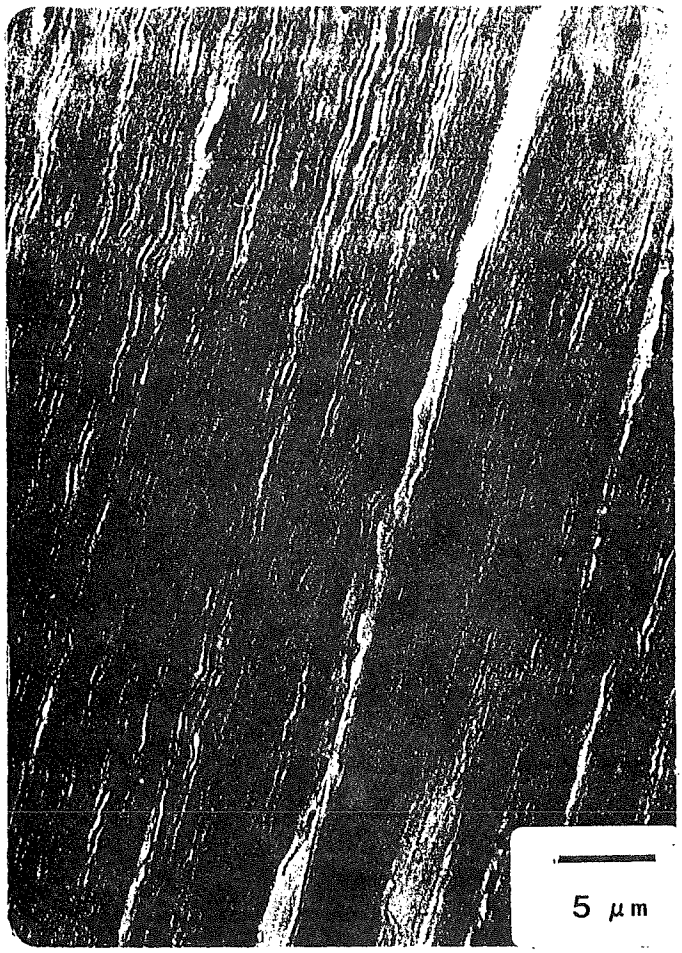


Figure V.61:

LCA canin. Coupe longitudinale montrant l'arrangement des fibroblastes dans la portion centrale du ligament (méthode de coloration hemalum phoxin-safran et Van Gieson) (X 2650).

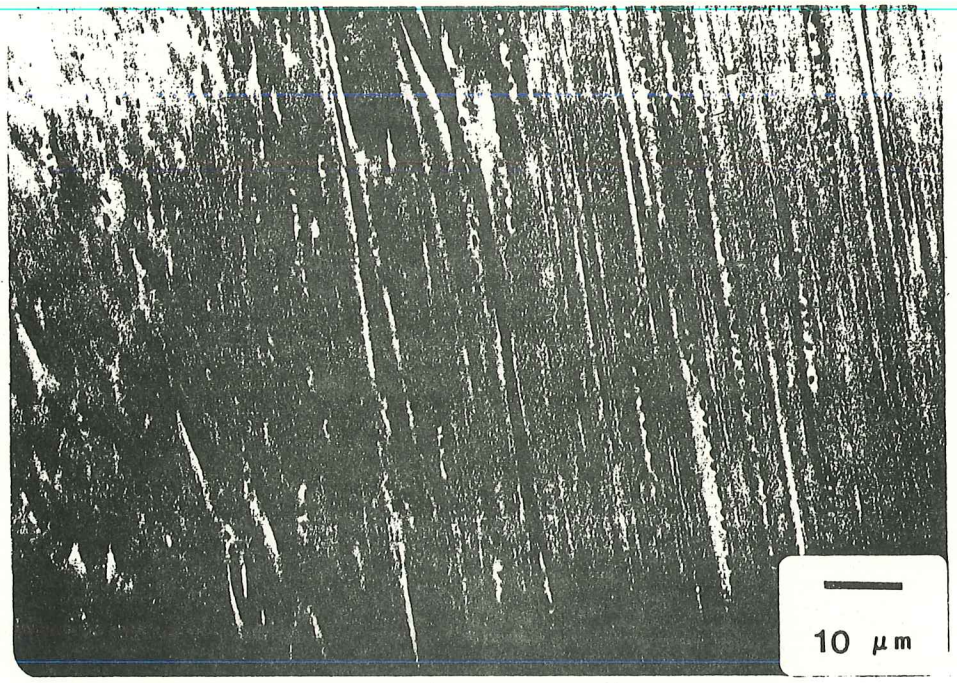


Figure V.62:

LCA canin (idem que V.61). On remarque l'arrangement des fibroblastes dans l'espace inter-fasciculaire (X 1062).

résultats ne montrent aucun alignement des particules d'or ni dans le LCA, ni dans l'aorte canine. Toutefois, les particules d'or utilisées ont un diamètre moyen de 14,5 nm, alors que celui des fibres d'élastine serait de 2 à 5 nm (tableaux II.4 et II.5). Il se pourrait donc que la substructure de l'élastine soit masquée par les marqueurs d'or. L'utilisation de particules de diamètre voisin de celui des fibres d'élastine permettrait de mettre en évidence l'ultrastructure de l'élastine. Toutefois, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode d'obtention de particules d'une telle dimension [HORISBERGER, 1981].

Le manque de contraste et la difficulté de coloration des coupes minces du ligament humain sont probablement dus à une mauvaise fixation du tissu. En effet, le temps post-mortem des spécimens humains utilisés varie de 3 à 19 heures. Il est bien connu que la structure fine des tissus biologiques subit des altérations assez rapides après la mort de l'organisme. Une mauvaise fixation du tissu peut entraîner, par ailleurs, des pertes de macromolécules telles que les PG-s ou l'élastine, lors de la préparation des

spécimens. Une post-fixation au tétroxyde d'osmiun améliore généralement la qualité de la fixation. Toutefois, comme l'a montré BENDAYAN (1981), le tétroxyde d'osmium abolit le marquage cytochimique. Les raisons ne sont pas claires, mais il est possible qu'après un tel traitement l'enzyme ne reconnait plus son substrat, par suite d'une réduction de l'interaction biochimique entre l'enzyme et le substrat.

L'étude ultrastructurale de l'élastine requiert, par conséquent, des spécimens fixés in-situ, c'est-à-dire un temps post-mortem très court. Cette fixation, in-vivo peut être réalisée sur des spécimens humains prélevés lors d'une biopsie ou d'une amputation.

V.3 Vascularisation du LCA

V.3.1 Introduction

Il est important, du point de vue fonctionnel et clinique, de comprendre la vascularisation des ligaments articulaires. En effet, les différents modes de rupture

auxquels sont soumis ces ligaments peuvent endommager les vaisseaux sanguins. Par ailleurs, la position intra-articulaire des ligaments croisés et la présente du fluide synoviale empêchent la formation d'un hématome (caillot sanguin) nécessaire à la guérison.

Les études de vascularisation des ligaments utilisent généralement des techniques d'injection de suspension radioopaque à base de sulfate de barium [SCAPINELLI, 1968; AML et STROMBERG, 1974; ARNOCZKY et coll., 1979]. Ces travaux ont montré que la membrane synoviale, qui forme une enveloppe autour du LCA est richement vascularisée avec des vaisseaux qui originent surtout de l'artère géniculée moyenne. Ces vaisseaux se ramifient pour former un réseau de vaisseaux périligamentaires, qui entourent la longueur entière du ligament. Des vaisseaux endoligamentaires ont été observés également [ARNOCZKY et coll., 1979].

Toutefois, ces techniques angiographiques ne permettent pas d'étudier la structure tridimensionnelle du

réseau vasculaire des ligaments. Nous avons utilisé la méthode de Batson, décrite au chapitre IV, et la MEB pour étudier la vascularisation du LCA humain.

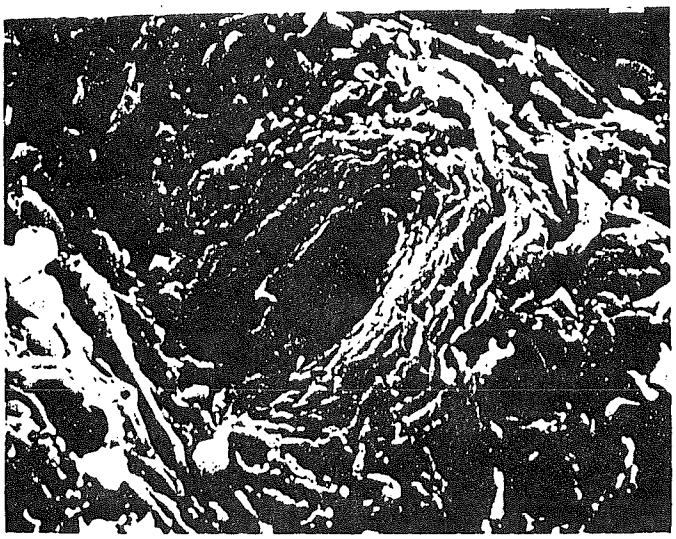
V.3.2 Résultats

Après des digestions à l'hydroxyde de potassium (KOH) de complexes os-ligament-os, nous n'avons observé que très peu de vaisseaux sanguins reliant l'os (tibia ou fémur) au ligament. Les jonctions ne contribuent pas d'une façon importante au schéma vasculaire du LCA. Par contre, des vaisseaux macroscopiques entourent le ligament.

L'observation au MEB de sections longitudinales du LCA canin, révèle l'existence de vaisseaux transversaux pénétrant dans la substance ligamentaire (figure V.63). Ces vaisseaux émanants de la périphérie sont plus souvent observés dans la partie postérieure du LCA. Leur diamètre varie de 1 à 200 µm.



A



B

Figure V.63:

Vascularisation du LCA canin.
(A) Ensemble de vaisseaux sanguins transversaux (régicn postérieure du LCA) (X 350). (B) Plus fort grossissement d'un vaisseau transversal de diamètre extérieure d'environ 30 µm (X 2000).

La digestion au KOH de LCA injecté au polymère de Batson, met en évidence l'existence des vaisseaux endoligamentaires. Ceux-ci sont orientés principalement dans la direction longitudinale du ligament (figure V.64). Ils seraient donc disposés parallèlement aux fascicules de collagène, et leur diamètre varie de 30 à 160 µm.

On observe, par ailleurs, l'existence d'anastomoses entre ces vaisseaux endoligamentaires et des vaisseaux transversaux de plus petit diamètre (figure V.65).

On remarque que le polymère coulée dans les gros vaisseaux présente des dépressions à la surface. La figure V.66 montre que la forme de ces dépressions est variable (fusiformes ou rondes).

V.3.3 Discussion

Nos résultats montrent que l'irrigation sanguine du LCA s'effectue principalement à partir des vaisseaux transversaux. Ce résultat ne s'accorde pas avec

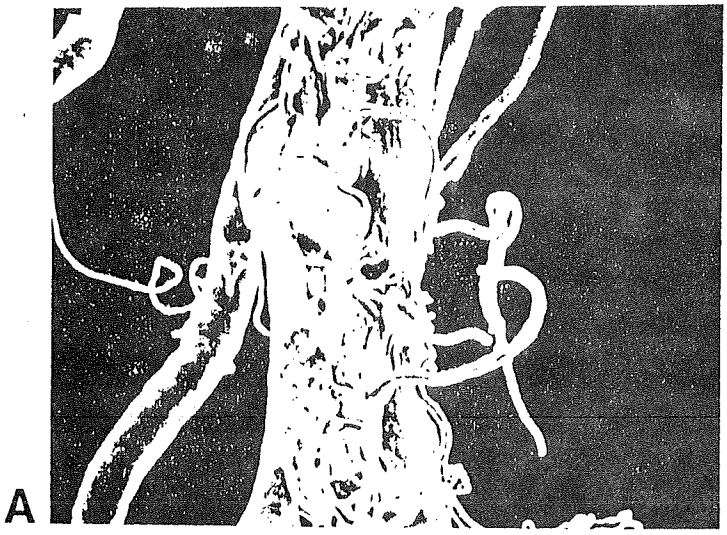


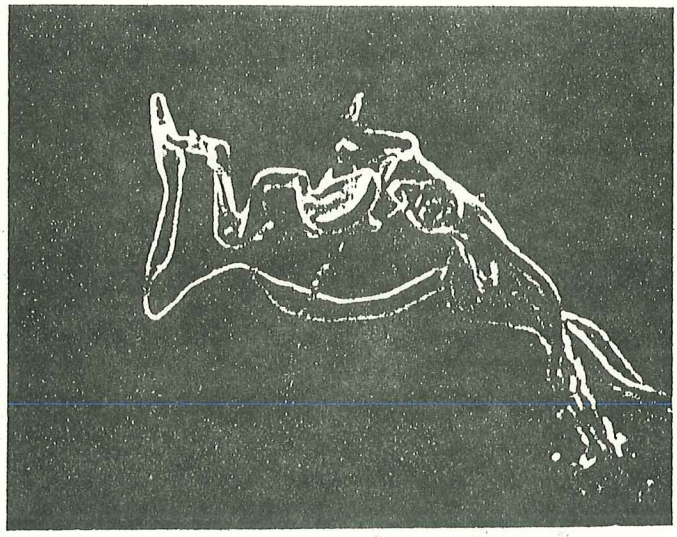


Figure V.64:

Méthode de Batson.
(A) Vaisseau endoligamentaire, de 80 µm de diamètre, orienté longitudinalement (X 100).
(B) Vaisseaux endoligamentaires, de 130 à 160 µm, disposés longitudinalement et s'anastomosant avec de petits vaisseaux transversaux d'environ 20 µm (X 100).



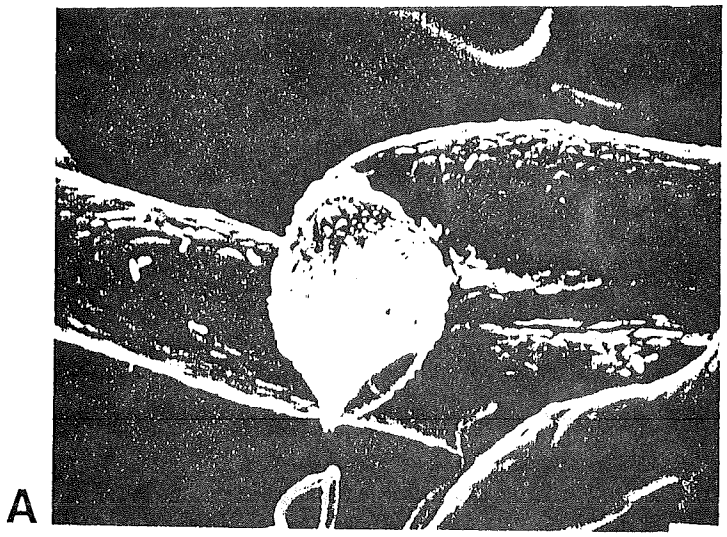
A



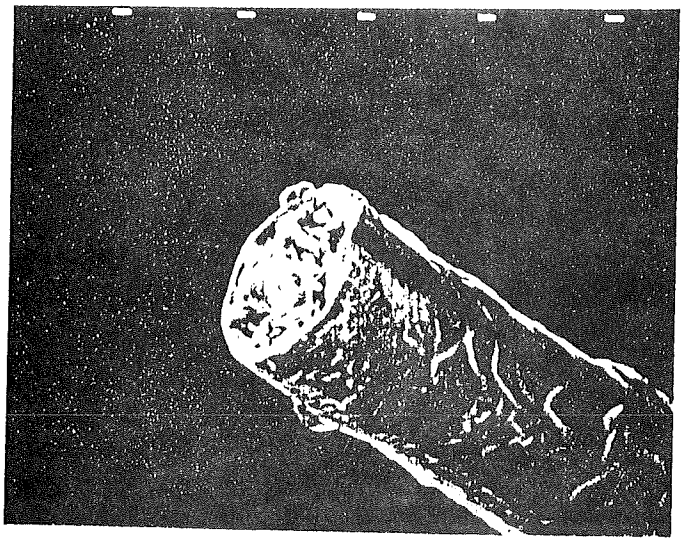
B

Figure V.65:

Méthode de Batson.
(A) Arbre vasculaire endoligamentaire mettant en évidence les anastomoses entre les vaisseaux longitudinaux et transversaux (X 350).
(B) Anastomose de petits vaisseaux (Ø = 18 40 µm) (X 75).



A



B

Figure V.66:

Méthode de Batson.
(A) Artériole de 160 µm de diamètre présentant des dépressions de surface (X 350). (B) Artère coupée de 80 µm avec également des dépressions à la surface latérale (X 200).

l'observation clinique selon laquelle une avulsion de l'attache tibiale ou fémorale peut compromettre l'alimentation sanguine du LCA [BALKFORS, 1982].

Par contre, conformément aux observations d'ALM et STROMBERG (1974), la portion antéromédiale est moins vascularisée que la bande postéro-latérale. Nous avons montré, par ailleurs, que la bande antéromédiale est constituée essentiellement de collagène. Ceci suggère que la bande postéro-latérale joue un rôle plus métabolique que mécanique.

Les dépressions à la surface du polymère coulée pourraient être des empreintes dues aux sphincters qui contrôlent l'écoulement sanguin. Ces résultats préliminaires montrent que la technique de Batson est particulièrement adaptée à l'étude de la structure vasculaire tridimensionnelle des ligaments. Il serait intéressant de diviser le ligament, avant la digestion au KOH, en portions

identifiées topographiquement. On pourrait ainsi mettre en évidence la vascularisation relative des différentes régions du LCA.

Cette technique ne peut être cependant utilisée pour l'étude des ligaments humains, car elle nécessite de procéder à l'injection du polymère, immédiatement après l'arrêt de la circulation sanguine.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Parmi les différentes approches, visant à caractériser les propriétés mécaniques des ligaments et des tendons, les plus récentes visent à l'interprétation du comportement macroscopique à partir des propriétés structurales et mécaniques des différents constituants à l'échelon microscopique [THIRY et coll., 1981; LANIR, 1983; STOUFFER et coll., 1983]. Toutefois, cette approche dont l'ambition est de développer des modèles structurels, s'est avérée vite limitée par un manque de connaissances de la microstructure des tissus mous, et constitua le point de départ de ce projet.

A la lumière des résultats présentés dans cette étude et de l'analyse de la littérature (Appendice A), nous discuterons d'abord de certaines hypothèses utilisées en

biomécanique des tissus mous, ensuite nous aborderons la relation entre la microstructure et les propriétés mécaniques, et enfin des directions pour des recherches futures seront proposées.

VI.1 Biomécanique des tissus mous

Les travaux de caractérisation mécanique et de modélisation mathématique des tissus biologiques considèrent généralement ceux-ci comme étant des matériaux inanimés homogènes, isotropes et incompressibles. Ces hypothèses ont conduit plusieurs chercheurs à utiliser, d'une part, les concepts et la terminologie de la physique des milieux continus, et d'autre part, des techniques d'essais mécaniques développées pour des matériaux artificiels. Ainsi, les essais mécaniques visant à obtenir les propriétés des tendons et des ligaments sont souvent effectués sous des conditions de chargement et d'environnement non physiologiques (Appendice A).

Les résultats des essais de traction, permettant de déduire les paramètres mécaniques, sont généralement présentés sous forme de courbes contrainte-déformation. Or la contrainte, qu'elle soit lagrangienne ou eulérienne, nécessite la connaissance exacte de l'aire de la section droite du spécimen d'essai. Celle-ci n'est obtenue que d'une façon approchée à cause, d'une part, de la difficulté de mesure d'une section très déformable, et, d'autre part, en supposant que la section droite du ligament est homogène (c'est-à-dire une distribution uniforme de la contrainte). Toutefois, nos résultats démontrent clairement l'existence de variations topographo-anatomiques de composition (collagène, substance fondamentale) et des dimensions des unités de collagène (figure V.8, tableau V.3). Ces variations se produisent aussi bien dans la direction radiale que dans la direction axiale du ligament. Comme la substance fondamentale ne supporte pas de contrainte de traction, lors de l'application d'une charge, seules les unités redressées de collagène seront chargées. Il est, par conséquent, difficile d'estimer l'aire de la section droite de référence ou déformée du spécimen.

La notion de contrainte n'est donc pas un concept aussi bien défini que dans le cas de matériau homogène. Les ligaments et les tendons doivent plutôt être traités comme des milieux polymériques inhomogènes, de structure composite fibreuse.

La seconde incertitude dans la caractérisation mécanique des tissus mous réside dans la détermination de la longueur initiale, et donc de la déformation. La morphologie d'ondulation planaire et/ou hélicoïdale des unités de collagène, à l'état relaxé, rend extrêmement délicat la détermination de la longueur à partir de laquelle le tissu commence à se déformer. Quant aux récentes méthodes de mesure de la déformation locale [BUTLER et coll., 1983; LAMONTAGNE et coll., 1984], elles ont l'avantage d'éviter la mesure de la longueur initiale du tissu, mais d'un autre côté, elles soulèvent le problème de savoir si la déformation superficielle est la même que la déformation interne du ligament. En effet, nous avons montré que les fibrilles internes des fascicules de collagène ne

présentaient pas d'ondulation, et que celle-ci croît vers la périphérie. On s'attendrait donc, à ce que les fibrilles centrales subissent une certaine déformation avant que les fibrilles périphériques ne commencent à se déformer.

Par conséquent, tous les autres paramètres mécaniques déduits des courbes contrainte-déformation, tels que la contrainte de rupture, la rigidité élastique et l'énergie relative de rupture sont à prendre avec certaines précautions.

Par ailleurs, les ligaments et les tendons sont souvent considérés comme des matériaux isotropes. Si cette hypothèse est à la limite vraie pour des tissus à l'état relaxé, il n'en demeure pas moins qu'une anisotropie est induite lorsqu'une force leur est appliquée.

Mentionnons enfin qu'une controverse existe quant à la compressibilité des ligaments. Certains auteurs les considèrent comme des matériaux incompressibles à cause de

déplacement local ou l'exudation du fluide interstitiel par les fibres sous contrainte peut introduire une compression locale du tissu.

En dépit de ces considérations, certaines corrélations ont pu, néanmoins, être établies entre la microstructure et les propriétés mécaniques de ces tissus (Appendice A).

VI.2 Relation structure - propriétés: tissulographie

La relation structure - propriétés des tendons et des ligaments n'est pas bien comprise. Une revue critique de l'état de la question est présentée à l'appendice A. Il ressort que les propriétés mécaniques des tissus biologiques vivants dépendent, non seulement de la micro et macro-structure, mais aussi de la composition et des interactions entre les différents constituants. Ainsi, toute modification de l'une de ces variables (morphologie, micro-architecture, composition, liaisons) entraîne des

changements de propriétés mécaniques (comportement macroscopique) du tissu.

Notons toutefois que les mécanismes physiques de certaines caractéristiques du comportement macroscopique ne sont pas encore élucidés.

Non-linéarité initiale

Plusieurs auteurs s'accordent pour attribuer la non-linéarité de la région initiale de la courbe force-allongement au redressement (ou recrutement séquentiel) des fibres de collagène et à leur alignement dans la direction de la charge [KASTELIC, 1979]. D'autres auteurs attribuent ce comportement non-linéaire de la phase initiale plutôt aux fibres d'élastine. Ce rôle de l'élastine, notamment dans la peau, est mis en évidence par des digestions du tissu à l'élastase (figure A-18). WIJN (1980) a montré que la non-linéarité est, d'une part, indépendante de l'épaisseur du tissu (peau), et donc de la quantité de fibres et de leur recrutement, mais d'un autre

côté, elle dépend des propriétés des fibres qui doivent être de l'élastine puisque le collagène est trop rigide pour être impliqué.

Mécanisme de rupture

Les mécanismes mutuels de la microdéformation et des microruptures, ainsi que le rôle des composantes individuelles dans la déformation des ligaments n'ont pas été clarifiés.

La nature des microruptures observées dans la région de déformation plastique du LCA pourrait être reliée à la rupture des fibrilles transversales de liaison mises en évidence par la présente étude.

Variation de la déformation locale

Des travaux récents ont montré des variations de la déformation axiale dans le sens longitudinal et transversal des ligaments du genou [WOO et coll., 1983; BUTLER et coll.,

1983]. Cette variation spatiale de la déformation locale pourrait être correlée aux variations topographo-anatomiques des différents paramètres structuraux, tels que l'aire de la section droite, l'ondulation, la concentration des unités collagéniques et la morphologie.

Comportement dépendant du temps

La vitesse de déformation a une influence importante sur les paramètres mécaniques tels que la résistance à la rupture, la déformation maximale, la rigidité, etc.. Cette sensibilité des tissus conjonctifs à la vitesse de déformation pourrait être reliée aux interactions entre les différentes composantes du tissu, notamment à l'interaction GAG-fibrilles de collagène [HAUT, 1983].

Le comportement viscoélastique des tendons est supposé être le résultat d'un cisaillement de la matrice de GAG durant la phase initiale de redressement des fibrilles ondulées. Dans la région linéaire de la courbe force-allongement, certains auteurs supposent que seules les

fibres de collagène contribuent au processus viscoélastique [COHEN et coll., 1976; HOOLEY et COHEN, 1979; HOOLEY et coll., 1980].

Par ailleurs, LANIR (1980) suppose que les fibres d'élastine sont purement élastiques et que le collagène est linéairement viscoélastique, contrairement à DECRAEMER et coll. (1980) qui considèrent que toutes les fibres sont viscoélastiques non-linéaires.

L'amortissement (ou frottement) interne des tissus biologiques, mis en évidence par la boucle d'hystérésis, est supposé être indépendant de la fréquence [FUNG, 1981]. Cette hypothèse, bien qu'elle soit vérifiée pour le mésentère de lapin et permet d'utiliser le concept de viscoélasticité quasi-linéaire, ne peut être généralisée à tous les tissus mous, notamment aux ligaments et tendons [ARNOLD, 1974; YOTSUZUKA et coll., 1982; HAUT, 1983].

Par ailleurs, ce frottement interne a un comportement dépendant du temps (figure A-6).

La diminution de l'aire de la boucle d'hystérésis lorsque le nombre de cycles augmente (préconditionnement), serait due à un réarrangement de la microstructure [FUNG, 1981]. Ce phénomène pourrait également être dû à une rupture ou une modification de liaisons entre les composantes du tissu.

Cette dernière hypothèse serait plus probable, étant donné que l'hystérésis tend à reprendre sa valeur initiale après une certaine période de relaxation du tissu (résultat non publié). Toutefois, ce phénomène de préconditionnement a été observé généralement sous des conditions de force imposée. Il serait intéressant d'étudier l'évolution de la boucle d'hystérésis en fonction du nombre de cycles et de la vitesse de déformation sous des conditions de déformation contrôlée, d'autant plus que physiologiquement les ligaments travaillent à déplacement imposé. Ceci pourrait contribuer à la compréhension du mécanisme physique du préconditionnement.

Tissulographie

Ces considérations nous amènent à suggérer d'orienter les recherches futures vers ce que l'on pourrait appeler, à l'image de la métallographie, la tissulographie pour comprendre la relation structure - propriétés des tissus biologiques.

La tissulographie serait une branche de la biomécanique qui s'orienterait vers l'étude, d'une part, de la relation entre la structure, la composition et les propriétés mécaniques et, d'autre part, des principes qui régissent leur modification sous l'action de facteurs exogènes (le pH, la température, la vitesse de congélation, les drogues, etc.) et de facteurs biologiques (vieillissement et âge, sexe, activité physique, maladies, etc.).

VI.3 Perspectives

Les données morphologiques et micro-architecturales obtenues lors de cette étude constituent, en fait, une base de départ pour la formulation de modèles structuraux. Pour obtenir les équations constitutives des ligaments, on doit ajouter à ces données géométriques les propriétés mécaniques de leurs constituants individuels et les conditions aux limites appropriées. Enfin, les paramètres anatomiques quantitatifs permettront la résolution analytique ou numérique de ces équations de comportement.

Se basant sur cette démarche et sur les résultats de la présente étude, plusieurs directions de recherche s'offrent en perspective.

Une étude systématique de la morphologie, de la micro-architecture et des paramètres quantitatifs devrait être effectuée sur un plus grand nombre de sujets et sur différents types de ligaments. On pourrait, ainsi, mieux

cerner l'évolution de la microstructure avec l'âge et les différences inter-tissulaires.

Il convient notamment d'établir lequel des deux modèles d'arrangement des fibrilles de collagène se produit dans un ligament spécifique. Les techniques de fixation des tissus peuvent être améliorer afin de préserver les GAG-s, c'est-à-dire l'interaction GAG-collagène laquelle serait à l'origine de l'arrangement hélicoïdal [VERZAR, 1957].

La localisation ultrastructurale de l'élastine devra être effectuée sur des spécimens humains prélevés lors d'une biopsie ou d'une amputation. En effet, des différences inter-espèces pourraient exister.

Par ailleurs, une évaluation quantitative de l'élastine pourrait être envisagée en se basant sur la densité de marquage, c'est-à-dire du nombre de particules d'or.

La technique enzyme-or pourrait être utilisée pour localiser ultrastructurellement les GAG-s qui représentent environ 0,98% du poids séché du LCA humain [AMIEL et coll., 1984]. Par la suite, un double marquage de l'élastine et des GAG-s, en utilisant des particules d'or de diamètre différent, pourrait mettre en évidence les interactions morphologiques (physiques) entre le collagène, les GAG-s et l'élastine.

Quant aux interactions biochimiques, on ignore encore la nature des liaisons aux interfaces des différentes unités de collagène (fibre-fibre; fibre-gaine de Henlé; sous-fascicule - sous-fascicule; sous-fascicule-endotendineum; fascicule-fascicule, fascicule-épitendineum). De même, la nature des liaisons inter-moléculaires et intra-moléculaires stables du collagène demeure incomprise in vivo. L'étude de ces liaisons connaît actuellement de grands développements, et pourrait contribuer à la compréhension du mécanisme de l'ondulation du collagène et du comportement mécanique du tissu.

Cette étude a montré qu'il est possible de caractériser les ligaments et les tendons à l'aide d'un ensemble de paramètres morphologiques et quantitatifs. Eu égard que, sous certaines conditions physio-pathologiques ces paramètres anatomiques se modifient, ils peuvent être très utiles en pratique clinique pour la caractérisation de condition normale ou pathologique.

Les travaux de recherche envisagés en collaboration entre l'Ecole Polytechnique et l'Hôpital Royal Victoria d'une part, et Sainte-Justine d'autre part, s'inscrivent dans cette perspective. Ils devraient permettre d'obtenir des données quantitatives, avec un traitement statistique incluant les effets de l'âge, du sexe et de l'état de santé des sujets. Une quantification biochimique de l'élastine et des GAG-s, ainsi qu'une étude de la structure des GAG-s sont envisagées. Les résultats escomptés constitueront une base de référence pour l'interprétation du comportement pathologique des ligaments de sujets scoliotiques et arthritiques.

Enfin, on a déjà mentionné que la modélisation des ligaments nécessite la connaissance des propriétés mécaniques des constituants individuels.

La caractérisation mécanique avec des techniques de digestion enzymatique, actuellement en développement dans notre laboratoire, permettra d'investiguer les contributions de chaque composante biochimique à la réponse globale du tissu et de mieux comprendre les interactions chimiques entre les constituants. Cette technique permettra aussi de modifier volontairement tel ou tel paramètre structural, et de comparer ensuite la réponse expérimentale aux prédictions de modèles théoriques.

Notons qu'il est possible que la contribution des composantes non-collagéniques ne soit pas évidente sous des conditions de chargement statique. HAUT (1983a) a montré que la rigidité initiale est très sensible à la vitesse de déformation. Par conséquent, le rôle de l'élastine et/ou des PG-s, postulé dans la région initiale de la courbe

contrainte-déformation, pourra être mis en évidence par des essais dynamiques.

Par ailleurs, des recherches se poursuivent à l'heure actuelle pour obtenir des enzymes suffisamment spécifiques et des conditions optimales de digestion. Des observations microscopiques, couplées aux essais mécaniques après enzymolyse, pourraient contribuer à l'élucidation des relations structure-propriétés mécaniques. De même, la technologie de reconstruction in vitro de tissus biologiques est une nouvelle approche intéressante pour l'étude des interactions entre les divers éléments des tendons et des ligaments [DANIELSEN, 1981]. Cette technique a déjà permis d'étudier l'influence des GAG-s, notamment du DS, sur les propriétés mécaniques de tissu collagénique reconstitué in vitro [DANIELSEN, 1982].

Mentionnons finalement que le phénomène de préconditionnement, relié probablement aux modifications de microstructure et de liaisons, devrait être investigué davantage. Des observations microscopiques de tissus

préconditionnés et des essais mécaniques sur des tissus, incubés au préalable dans des substances chimiques qui peuvent briser des liaisons spécifiques, pourraient contribuer à la détermination du mécanisme de ce préconditionnement.

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS

Au terme de cette étude, il convient d'en tirer les principales conclusions quant aux objectifs énoncés au chapitre III.

1. L'organisation hiérarchique du collagène type I du LCA et du LR a été établie. Elle présente, par rapport aux autres tissus conjonctifs, notamment le TQR, deux niveaux supplémentaires: la fibre et le sous-fascicule.

2. Deux modèles structuraux sont proposés pour décrire la morphologie et la micro-architecture des fibrilles de collagène: un modèle d'onde planaire et un modèle d'onde hélicoïdale. Dans ces deux modèles, l'amplitude d'ondulation décroît de la périphérie vers le centre du fascicule.

3. Des fibrilles transversales assurant une liaison structurale des unités longitudinales du collagène type I, ont été mises en évidence. La nature de ces fibrilles, décrites pour la première fois à notre connaissance, n'est pas encore bien comprise.

4. Une caractérisation quantitative de la microstructure du LCA et du LR a été effectuée. Des paramètres morphométriques tels que le diamètre et l'aire de la section droite des différentes entités collagéniques, l'amplitude et la période d'ondulation, l'angle et le pas de l'hélice, ont été obtenus pour les deux types de ligaments et d'espèces étudiés.

5. Il existe des différences inter-espèces significatives, du diamètre et de l'aire de la section droite des unités collagéniques. Pour une population humaine adulte, ces dimensions ne varient pas beaucoup avec l'âge.

6. Des variations topographo-anatomiques de la taille des différentes entités collagéniques ont été observées pour un même ligament.

7. Des vaisseaux sanguins endoligamentaires, orientés dans l'axe longitudinal du LCA ont été mis en évidence. Ils sont reliés à de petits vaisseaux qui pénètrent transversalement dans le ligament.

8. La technique enzyme-or a permis de localiser ultrastructuralement l'élastine du LCA. Cette protéine est observée principalement dans la substance fondamentale située entre les fibres de collagène, et également autour des fibroblastes.

BIBLIOGRAPHIE

AARON, B.B., GOSLINE, J.M., "Optical Properties of Single Elastin Fibers Indicate Random Protein Conformation", Nature, vol. 287, pp. 865-867, 1980.

AARON, B.B., GOSLINE, J.M., "Elastin as a Random-Network Elastomer: A Mechanical and Optical Analysis of Single Elastin Fibers", Biopolymers, vol. 20, pp. 1247-1260, 1981.

ABRAHAMS, M., "Mechanical Behaviour of Tendon in Vitro", Med. Biol. Engng, vol. 5, pp. 433-443, 1967.

AKESON, W.H., AMIEL, D., WOO, S. L-Y., "Immobility Effects on Synovial Joints. The Pathomechanics of Joint Contracture", Biorhelogy, vol. 17, pp. 95-110, 1980.

ALEXANDER, R.M., "Factors of Safety in the Structure of Animals", Sci. Prog. Oxf. 67, pp. 109-130, 1981.

ALFREY, T., GURNEE, E.F., "Molecular Structure and Mechanical Behaviour of Macromolecules", In "Tissu Elasticity" ed. J.W. REMINGTON, pp. 12-32, 1957.

ALM, A., STROMBERG, B., "Vascular Anatomy of the Patellar and Cruciate Ligaments", Acta Chir. Scandinavica, Supplementum 445, pp. 25-35, 1974 (a).

ALM, A., EKSTROM, H., STROMBERG, B., "Tensile Strength of the Anterior Cruciate Ligament in the Dog", Acta Chir. Scand., Suppl. 445, pp. 15-23, 1974 (b).

AMIEL, D., HARWOOD, F.L., WOO, S. L-Y., AKESON, W.H., "Immobilization Effect on Collagen Turnover in the Medial Collateral Ligament: A Comparison Between a 9 and 12 Week Immobilization Period", 28 th. Annual ORS, New Orleans, Louisiana, p. 226, 1982 (a).

AMIEL, D., WOO, S. L-Y., HARWOOD, F.L., AKESON, W.H., "The Effect of Immobilization on Collagen Turnover in Connective Tissue: A Biochemical Biomechanical Correlation", Acta Orthop. Scand., 53, pp. 325-332, 1982 (b).

AMIEL, D., AKESON, W.H., HARWOOD, F.L., FRANK, C.B., "Stress Deprivation Effect on Metabolic Turnover of the Medial Collateral Ligament Collagen", Clin. Orthop. and Related Res. no 172, pp. 265-270, 1983.

AMIEL, D., FRANK, C., HARWOOD, F.L., FRONEK, J., AKESON, W., "Tendons and Ligaments: A Morphological and Biochemical Comparison", J. of Orthopaedic Research, no. 1, pp. 257-265, 1984.

ARNOCZKY, S.P., MARSHALL, J.L., "The Cruciate Ligaments of the Canine Stifle: An Anatomical and Functional Analysis", Am. J. Vet. Res., vol. 38, no. 11, pp. 1807-1814, 1977.

ARNOCZKY, S.P., RUBIN, R.M., MARSHALL, J.L., "Microvasculature of the Cruciate Ligaments and its Response to Injury", J.B.J.S., vol. 61-A, no. 8, pp. 1221-1229, 1979.

ARNOCZKY, S.P., "Anatomy of the Anterior Cruciate Ligament", Clinical Orthop. and Related Res., no. 172, pp. 19-25, 1983.

ARNOLD, G., "Biomechanische und Rheologische Eigenschaften Menschlicher Sehnen", Z. Anat. Entwickl. Gesch, vol. 143, pp. 263-300, 1974.

BADER, D.L., KEMPSON, G.E., BARRETT, A.J., WEBB, W., "The Effects of Leucocyte Elastase on the Mechanical Properties of Adult Human Articular Cartilage in Tension", Biochimica et Biophysica Acta, 677, pp. 103-108, 1981.

BAER, E., GATHERCOLE, L.J., KELLER, A., "Structure Hierarchies in Tendon Collagen: An Interim Summary", Proced. of Colston Confer., Dept of Physics, University of Bristol, U.K., pp. 189-195, 1974.

BAILEY, A.J., "Intermediate Labile Intermolecular Crosslinks in Collagen Fibres", Biochimica et Biophysica Acta, vol. 160, pp. 447-453, 1968.

BALKFORS, B., "The Course of Knee-Ligament Injuries", Acta Orthop. Scand., suppl. no. 198, vol. 53, 1982.

BARENBERG, S.A., FILISKO, F.E., GEIL, P.H., "Ultrastructural Deformation of Collagen", Conn. Tiss. Res., vol. 6, pp. 25-35, 1978.

BATSON, O.V., "A New Material for Corrosion Preparations", Science, 81, p. 519, 1935.

BENDAYAN, M., "Ultrastructural Localization of Nuclei Acids by the Use of Enzyme - Gold Complexes", the J. of Histochem. and Cytochemistry, vol. 29, no. 4, pp. 531-541, 1981 (a).

BENDAYAN, M., "Electron Microscopical Localization of Nucleic Acids by Means of Nuclease - Gold Complexes", Histochem. Journal, 13, pp. 699-710, 1981 (b).

BETSCH, D.F., BAER, E., "Structure and Mechanical Properties of Rat Tail Tendon", Biorheology, vol. 17, pp. 83-94, 1980.

BINGHAM, D.N., DEHOFF, P.H., "A Constitutive Equation for the Canine Anterior Cruciate Ligament", J. of Biomech. Eng., vol. 101, pp. 15-22, 1979.

BROOM, N.D., "Simultaneous Morphological and Stress-Strain Studies of the Fibrous Components in Wet Heart Valve LeaFlet Tissue", Conn. Tis. Res., vol. 6, pp. 37-50, 1978.

BUCKWALTER, J.A., "Proteoglycan Structure in Calcifying Cartilage", Clinical Orthop. and Related Res., no. 172, pp. 207-232, 1983.

BUTLER, D.L., GROOD, E.S., NOYES, F.R., "Biomechanics of Ligaments and Tendons", In Exercices and Sports Science Review (eds): R. Hutton Franklin Institute Press, vol. 6, pp. 125-181, 1978.

BUTLER, D.L., GROOD, E.S., ZERNICKE, R.F., HEFZY, M.S., NOYES, F.R., "Nonumform Surface Strains in Young Human Tendon and Fascia", 29th Annual ORS, Anaheim, California, 1983 (a).

BUTLER, D.L., STOUFFER, D.C., "Tension-Torsion Characteristics of the Canine Anterior Cruciate Ligament - Part II: Experimental Observations, J. of Biomechanical Engineering, vol. 105, pp. 160-165, 1983 (b).

CABAUD, H.E., CHATTY, A., GILDENGORIN, V., FELTMAN, R.J., "Exercise Effects on the Strength of the Rat Anterior Cruciate Ligament", Am. J. Sports Med., vol. 8, no. 2, pp. 79-86, 1980.

CANOSO, J.J., "Bursae, Tendons and Ligaments", Clinics in Rheumatic Diseases, vol. 7, no. 1, pp. 189-221, 1981.

CLEARY, E.G., CLIFF, W.J., "The Substructure of Elastin", Exp. and Mol. Pathology No. 28, pp. 227-246, 1978.

CLEARY, E.G., FANNING, J.C., PROSSER, I., "Possible Roles of Microfibrils in Elastogenesis", Conn. Tis. Res., vol. 8, pp. 161-166, 1981.

CLIFF, W.J., "The Ultrastructure of Aortic Elastica as Revealed by Prolonged Treatment with O_3O_4", Exp. Mol. Pathol., vol. 15, pp. 220-229, 1971.

COHEN, A.L., "Critical Point Drying - Principles and Procedures", SEM, p. 303, II, 1979.

COHEN, R.E., HOOLEY, C.J., McCRUM, N.G., "Viscoelastic Creep of Collagenous Tissue", J. Biomechanics, vol. 9, pp. 175-184, 1976.

COLEMAN, J.R., "Biological Applications: Sample Preparation and Quantitation", in Practical SEM, edit. by GOLDSTEIN, J.I. and YAKOWITZ, H., 1975.

COMNINOU, M., YANNAS, I.V., "Dependance of Stress-Strain Nonlinearity of Connective Tissues on the Geometry of Collagen Fibers", J. Biomechanics, vol. 9, pp. 427-433, 1976.

COMPER, W.D., LAURENT, T.C., "Physiological Function of Connective Tissue Polysaccharides", Physiological Reviews, vol. 58, no. 1, pp. 255-315, 1978.

CRISP, J.D.C., "Properties of Tendon and Skin", In Biomechanics, Its Foundations and Objectives, Edit. by Y.C. Fung, N. Perrone and M. Anliker, pp. 141-179, 1972.

DALE, W.C., BAER, E., "Fibre-Buckling in Composite Systems: A Model for the Ultrastructure of Uncalcified Collagen Tissues", J. of Materials Science, 9, pp. 369-382, 1974.

DAMIANO, V.V., TSANG, A., CHRISTNER, P., ROSENBLOOM, J., WEINBAUM, G., "Immunologic Localization of Elastin by Electron Microscopy", Am. J. of Pathology, vol. 96, no. 2, pp. 439-455, 1979.

DANIELSEN, C.C., "Mechanical Properties of Reconstituted Collagen Fibrils. A Study on Reconstitution Methodology and Influence of in Vitro Maturation", Conn. Tissue Re., 9, pp. 51-57, 1981.

DANIELSEN, C.C., "Mechanical Properties of Reconstituted Collagen Fibrils. Influence of a Glycosaminoglycan: Dermatan Sulfate", Conn. Tissue Res., 9, pp. 219-225, 1982.

DANYLCHUK, K.D., FINLAY, J.B., KRCEK, J.P., "Microstructural Organization of Human and Bovine Cruciate Ligament", Clinical Orthop. and Related Res., no. 131, pp. 294-298, 1978.

DECRAEMER, W.F., MAES, M.A., VANHUYSE, V.J., VANPEPERSTRAETE, P., "A Non Linear Viscoelastic Constitutive Equation for Soft Biological Tissues Based Upon a Structural Model", J. Biomechanics, vol. 13, pp. 559-564, 1980.

DEMIRAY, H., "Large Deformation Analysis of Some Soft Biological Tissues", J. of Biomech. Eng., vol. 103, pp. 74-78, 1981.

DESJARDINS, A., "Etude microstructurale du ligament croisé antérieur chez le chien", rapport présenté à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal et au Conseil de Recherches Médicales du Canada, 1981.

DIAMANT, J., KELLER, A., BAER, E., LITT, M., ARRIDGE, G.C., "Collagen; Ultrastructure and its Relation to Mechanical Properties as a Function of Ageing", Proc. R. Soc. Lond., B., 180, pp. 293-315, 1972.

DLUGOSZ, J., GATHERCOLE, L.J., KELLER, A., "Transmission Electron Microscope Studies and their Relation to Polarizing Optical Microscopy in Rat Tail Tendon", Micron, vol. 9, pp. 71-82, 1978.

DORLOT, J.M., AIT BA SIDI, M., TREMBLAY, G.M., DROUIN, G., "Load Elongation Behaviour of the Canine Anterior Cruciate Ligament", J. of Biomech. Eng., vol. 102, pp. 190-193, 1980.

ELDEN, H.R., "Hydration of Connective Tissue and Tendon Elasticity", Biochim. Biophys. Acta, vol. 79, pp. 592-599, 1964.

ELLIOTT, D.H., "The Biomechanical Properties of Tendon in Relation to Muscular Strength", Annals of Physical Medicine, vol. 9, no. 1, pp. 1-7, 1967.

EVANS, J.H., BARBENEL, J.C., "Structural and Mechanical Properties of Tendon Related to Function", Equine Veterinary Journal, vol. 7, no. 1, pp. 1-8, 1975.

FANNING, J.C., YATES, N.G., CLEARY, E.G., "Elastin - Associated Microfibrils in Aorta: Species Differences in Large Animals", Micron, vol. 12, no. 4, pp. 339-348, 1981.

FARQUHARSON-ROBERTS, M.A., OSBORNE, A.H., "Partial Rupture of the Anterior Cruciate Ligament of the Knee", J.B.J.S., vol. 65-B, no. 1, pp. 32-34, 1983.

FORNIERI, C., PASQUALI RONCHETTI, I., EDMAN, A.C., SJOSTROM, M., "Contribution of Cryotechniques to the Study of Elastin Ultrastructure", J. of Microscopy, vol. 126, no. 1, pp. 87-93, 1982.

FRISEN, M., MAGI, M., SONNERUP, L., VIIDIK, A., "Rheological Analysis of Soft Collagenous Tissue", J. Biomechanics, vol. 2, pp. 13-20 et pp. 21-28, 1969.

FUJI, K., TANZER, M.L., "Age-Related Changes in the Reducible Cross Links of Human Tendon Collagen", FEBS, Lett. 43, pp. 300-302, 1974.

FUNG, Y.C., "Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues", Spinger-Verlag N.Y. Heidelberg Berlin, 1981.

GATHERCOLE, L.J., BOOY, F.P., DLUGOSZ, J., KELLER, A., "Low Temperature Electron Diffraction and Beam Effects in Tendon Collagen", Conn. Tissue Research, vol. 5, pp. 201-204, 1978 (a).

GATHERCOLE, L.J., KELLER, A., "Early Development of Crimping in Rat Tail Tendon Collagen: A Polarizing Optical and SEM Study", Micron, vol. 9, pp. 83-89, 1978 (b).

GATHERCOLE, L.J., KELLER, A., "X-Ray Diffraction Effects Related to Superstructure in Rat Tail Tendon Collagen", Bioch. and Biophysica Acta, 535, pp. 253-271, 1978 (c).

GATHERCOLE, L.J., SHAH, J.S., "Collagenous Tissue Morphology: A Study of a Substructure in Rat Tail Tendons", In Mechanical Factors and the Skeleton, edited by Ian AF Stokes Oxford Orthopaedic Engineering Centre, University of Oxford, 1981, Johni Libbey, London.

GAY, S., MILLER, E.J., "Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue", Gustav Fischer Verlag Stuttgart-New York, 1978.

GILLARD, G.C., MERRILEES, M.J., BELL-BOOTH, P.G., REILLY, H.C., FLINT, M.H., "The Proteoglycan Content and the Axial Periodicity of Collagen in Tendon", Biochem. J., no. 163, pp. 145-151, 1977.

GILLARD, G.C., REILLY, H.C., BELL-BOOTH, P.G., FLINT, M.H., "The Influence of Mechanical Forces on the Glycosaminoglycan Content of the Rabbit Flexor Digitorum Profundus Tendon", Conn. Tiss. Res., vol. 7, pp. 37-46, 1979.

GIRGIS, F.G., MARSHALL, J.L., AL MONAJEM, A.R.S., "The Cruciate Ligaments of the Knee Joint. Anatomical, Functional and Experimental Analysis", Clinical Orthopaedics and Related Research, vol. 106, pp. 216-231, 1975.

GLAUERT, A.M., "Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens", in Pratical Methods in Electron Microscopy, Glauert, A.M. (ed.), vol. 3, pp. 1-198, 1974.

GOLDSTEIN, S.A., "Biomechanical Aspects of Cumulative Trauma to Tendons and Tendon Sheaths", Thesis, Ph.D. University of Michigan, 1981.

GOSLINE, J.M., "The Physical Properties of Elastic Tissue", Int., Rev., Conn. Tis. Res., vol. 7, pp. 211-249, 1976.

GOSLINE, J.M., FRENCH, C.J., "Dynamic Mechanical Properties of Elastin", Biopolymers, vol. 18, pp. 2091-2103, 1979.

GOTOH, T., SUGI, Y., HIRAKOW, R., "Ultrastructural Construction of Collagen Fibrils as Revealed by the Freeze-Fracture Technique", J. Electron Microsc., vol. 32, no. 3, pp. 213-215, 1983.

GOTTE, L., GIRO, M.G., VOLPIN, D., HORNE, R.W., "The Ultrastructural Organization of Elastin", J. Ultras. Res., vol. 46, pp. 23-33, 1974.

GREENBERG, A.R., EYLERS, J.P., "Influence of Ionic Environment on the Stress Relaxation Behavior of an Invertebrate Connective Tissue", J. Biomechanics, vol. 17, no. 3, pp. 161-166, 1984.

GREENLEE, T.K., ROSS, R., "The Development of the Rat Flexor Digital Tendon. A Fine Structure Study", J. Ultrastructure Res., 18, pp. 354-376, 1967.

GRODZINSKY, A.J., "Electromechanical and Physicochemical Properties of Connective Tissue", CRC Critical Reviews in Biomedical Engineering, vol. 9, Issue 2, pp. 133-199, 1983.

GRUT, W., EDWARDS, J., EVANS, E.J., "Scanning Electron Microscopy of Freeze-Dried Aortic Elastin", J. of Microscopy, vol. 110, no. 3, pp. 271-275, 1977.

GUAY, M., LAMY, F., "L'élastine, une protéine fibreuse impliquée dans plusieurs processus pathologiques", l'Union Médicale du Canada, Tome 109, pp. 1280-1285, 1980.

HAUT, R.C., LITTLE, R.W., "Rheological Properties of Canine Anterior Cruciate Ligaments", J. Biomechanics, vol. 2, pp. 289-298, 1969.

HAUT, R.C., LITTLE, R.W., "A Constitutive Equation for Collagen Fibers", J. Biomechanics, vol. 5, pp. 423-430, 1972.

HAUT, R.C., "Correlation Between Strain-Rate-Sensitivity in Rat-Tail Tendon and Tissue Glycosaminoglycans", Biomech. Symp. ASEM, AMD, vol. 56, pp. 113-112, 1983 (a).

HAUT, R.C., "Age-Dependent Influence of Strain Rate on the Tensile Failure of Rat-Tail Tendon", J. of Biomech. Eng., vol. 105, pp. 296-299, 1983 (b).

HEFFRON, L.E., CAMPBELL, J.R., "Morphology, Histology and Functional Anatomy of the Canine Cranial Cruciate Ligament", Veterinay Record, no. 102, pp. 280-283, 1978.

HOEVE, C.A.J., FLORY, P.J., "The Elastic Properties of Elastin", J. Amer. Chem. Soc., vol. 80, pp. 6523-6526, 1958.

HOEVE, C.A.J., FLORY, P.J., "The Elastic Properties of Elastin", Biopolymers, vol. 13, pp. 677-686, 1974.

HOFFMAN, A.S., PARK, J.B., ABRAHAMSON, J., "Sequential Enzymolysis of Ligament and Resultant Stress-Strain Behavior", Biomat. Med. Dev., Art. Org., 1(3), pp. 453-467, 1973.

HOFFMAN, A.S., "Comparaison of Enzyme Probe Technique Used to Investigate Tissue Biomechanics In Vitro", Biorheology, vol. 17, pp. 45-50, 1980 (a).

HOFFMAN, A.S., DALY, C.H., "A Commentary on the Use of Enzyme Probes to Elucidate the Contributions of Individual Components to Soft Tissue Biomechanics In Vitro", Biology of Collagen, pp. 297-311, 1980 (b).

HOFMAN, H., FIETZEK, P.P., KUHN, K., "The Role of Polar and Hydrophobic Interactions for the Molecular Packing of Type I Collagen: A Three Dimensional Evaluation of the Amino Acid Sequence", J. Mol. Biol., vol. 125, pp. 137-165, 1978.

HOOLEY, C.J., COHEN, R.E., "A Model for the Creep Behaviour of Tendon", Int. J. Biolog. Macromolecules, vol. 1, pp-123-132, 1979.

HOOLEY, C.J., McCRUM, N.G., COHEN, R.E., "The Viscoelastic Deformation of Tendon", J. Biomechanics, vol. 13, pp. 521-528, 1980.

HORISBERGER, M., "Colloidal Gold: A Cytochemical Marker for Light and Fluorescent Microscopy and for Transmission and Scanning Electron Microscopy", Scanning Electron Microscopy II, pp. 9-31, 1981.

HUBBARD, R.P., SOUTAS-LITTLE, R.W., "Mechanical Properties of Human Tendon and their Age Dependence", J. of Biomech Eng., vol. 106, pp. 144-150, 1984.

ITOH, T., KLEIN, L., GEIL, P.H., "Age Dependence of Collagen Fibril and Subfibril Diameters Revealed by Transverse Freeze - Fracture and Etching Technique", J. of Microscopy, vol. 125, pt 3, pp. 343-357, 1982.

JENKINS, R.B., LITTLE, R.W., "A Constitutive Equation for Parallel Fibered Elastic Tissue", J. Biomechanics, vol. 7, pp. 397-402, 1974.

JUNQUEIRA, L.C.V., BIGNOLAS, G., MOURAO, P.A.S., BONETTI, S.S., "Quantification of Collagen Proteoglycan Interaction in Tissue Sections", Conn. Tiss. Res., vol. 7, pp. 91-96, 1980.

KADAR, A., "The Elastic Fiber Normal and Pathological Conditions in the Arteries", Exper. Path., Suppl., 5, VEB, Gustav Fischer Verlay Jena, 1979.

KAJIKAWA, K., YAMAGUCHI, T., KATSUDA, S., MIWA, A., "An Improved Electron Stain for Elastic Fibers Using Tannic Acid", J. of Electron Microscopy, vol. 24, no. 4, pp. 287-289, 1975.

KASTELIC, J., GALESKI, A., BAER, E., "The Multicomposite Structure of Tendon", Conn. Tiss. Res., vol. 6, pp. 11-23, 1976.

KASTELIC, J.R., "Structure and Mechanical Deformation of Tendon Collagen", Ph.D. Thesis, Case Western Reserve University, 1979.

KASTELIC, J., PALLEY, I., BAER, E., "A Structural Mechanical Model for Tendon Crimping", J. Biomechanics, vol. 13, pp. 887-893, 1980.

KATSUDA, S., NAKANISHI, I., KAJIKAWA, K., "Elastin Substructure as Revealed by Prolonged Treatment with Periodic Acid", J. Electron Microsc., vol. 31, no. 1, pp. 27-34, 1982.

KATSUMOTO, T., NAGURO, T., IINO, A., TAKAYI, A., "The Effect of Tannic Acid on the Preservation of Tissue Culture Cells for Scanning Electron Microscopy", J. Electron Microsc., vol. 30, no. 3, pp. 177-182, 1981.

KEELEY, F.W., "Identification of Elastin in Developping Aortic Tissue by Immunological Methods", Conn. Tiss. Res., vol. 8, pp. 193-198, 1981.

KEMPSON, G.E., "Relationship Between the Tensile Properties of Articular Cartilage from the Human Knee and Age", Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 41, pp. 508-511, 1982.

KENNEDY, J.C., WEINBERG, H.W., WILSON, A.S., "The Anatomy and Function of the Anterior Cruciate Ligament", J.B.J.S., vol. 56-A, no. 2, pp. 223-235, 1974.

KLEINMAN, H.K., WILKES, C.M., MARTIN, G.R., "Interaction of Fibronectin with Collagen Fibrils", Biochemistry, 20, pp. 2325-2330, 1981.

KLEINMAN, H.K., "Interactions Between Connective Tissue Matrix Macromolecules", Conn. Tiss. Res., vol. 10, pp. 61-72, 1982.

KUHN, K., GLANVILLE, R.W., "Molecular Structure and Higher Organization of Different Collagen Types", Biology of Collagen, pp. 1-14, 1980.

KUHN, K., "Relationship Between Amino Acid Sequence and Higher Structure of Collagen", Conn. Tiss. Res., vol. 10, pp. 5-10, 1982.

LAMONTAGNE, M., DORE, R., YAHIA, H., DORLOT, J.M., "Mechanical Properties (In-Vitro) of Human Patellar and Quadriceps Tendons Measured by Mercury Strain Gages", 4th, ICMB, pp. 17-20, 1984.

LANIR, Y., "Structure-Strength Relations in Mammalian Tendon", Biophys. J., vol. 24, pp. 541-554, 1978 (a).

LANIR, Y., "Structure-Function Relations in Mammalian Tendon: The Effect of Geometrical Nonuniformity", J. of Bioeng., vol. 2, pp. 119-128, 1978 (b).

LANIR, Y., "A Microstructure Model for the Rheology of Mammalian Tendon", J. of Biomech. Eng., vol. 102, pp. 332-339, 1980.

LANIR, Y., "Constitutive Equations for Fibrous Connective Tissues", J. Biomechanics, vol. 16, no. 1, pp. 1-12, 1983.

LANSING, A.I., ROSENTHAL, T.B., ALEX, M., DEMPSEY, E.W., "The Structure and Chemical Characterization of Elastic Fibers as Revealed by Elastase and by Electron Microscopy", Anat. Record, vol. 114, pp. 555-557, 1952.

LAROS, G.S., TIPTON, C.M., COOPER, R.R., "Influence of Physical Activity on Ligament Insertions in the Knees of Dogs", J.B.J.S., vol. 53-A, no. 2, pp. 275-286, 1971.

LEHNINGER, A.L., "Biochimie: Sec. édition", Flammarion Medecine Sciences 1981.

LIGHT, N.D., BAILEY, A.J., "The Chemistry of the Collagen Cross Links", Biochem. J., vol. 185, pp. 373-381, 1980 (a).

LIGHT, N.D., BAILEY, A.J., "Molecular Structure and Stabilization of the Collagen Fiber", Biology of Collagen ed. by A. VIIDIK and J. VUUST Academic Press., pp. 15-38, 1980 (b).

LOWRY, O.H., GILLIGAN, D.R., KATERSKY, E.M., "The Determination of Collagen and Elastin in Tissues, with Results Obtained in Various Normal Tissues from Different Species", J. Biol. Chem., vol. 139, pp. 795-804, 1941.

MAILLET, M., "Les tissus de soutien", Collection histologie et histo-physiologie humaines, tome 3, vigot éditions, Paris, 1979.

MECHAM, R.P., "Elastin Biosynthesis: A Look at the Current Scene", Conn. Tissue Res., vol. 8, pp. 155-160, 1981.

MELVIN, J.W., MOHAN, D., WINEMAN, A.S., "Mechanical Characteristics of Soft Tissues at High Strain Rates", ASME AMD vol. 10, pp. 75-78, 1975, TROY, N.Y.

MILLER, A., "Structural Studies on Connective Tissue", Biology of Collagen, pp. 39-52, 1980.

MINNS, R.J., SODEN, P.D., "The Role of the Fibrous Components and Ground Substance in the Mechanical Properties of Biological Tissues: A Preliminary Investigation", J. Biomechanics, vol. 6, pp. 153-165, 1973.

MISSIRILIS, Y.F., "Use of Enzymolysis Techniques in Studying the Mechanical Properties of Connective Tissue Components", J. of Bioengineering, vol. 1, pp. 215-222, 1977.

NEMETSCHEK, T., JONAK, R., NEMETSCHEK-GANSLER, H., ROSENBAUM, G., RIEDL, H., "Uber Die Bestimmung Von Langperiodenanderungen am Kollagen", Z. Naturforsh, 33c, pp. 928-936, 1978.

NIMNI, M.E., "The Molecular Organization of Collagen and its Role in Determining the Biophysical Properties of the Connective Tissues", Biorheology, vol. 17, pp. 51-82, 1980.

NIVEN, H., BAER, E., HILTNER, A., "Organization of Collagen Fibers in Rat Tail Tendon at the Optical Microscope Level", Collagen Rel. Res., vol. 2, pp. 131-142, 1982.

NOYES, F.R., TORVIK, P.J., HYDE, W.B., DELUCAS, J.L., "Biomechanics of Ligament Failure. An Analysis of Immobilization, Exercise and Reconditioning Effects in Primates", the J.B.J.S., vol. 56-A, no. 7, pp. 1406-1418, 1974 (a).

NOYES, F.R., DELUCAS, J.L., TORVIK, P.J., "Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament Failure: An Analysis of Strain-Rate Sensitivity and Mechanisms of Failure in Primates", J.B.J.S., vol. 56-A, no. 2, pp. 236-253, 1974 (b).

OAKES, B.W., BIALKOWER, B., "Biomechanical and Ultrastructural Studies on the Elastic Wing Tendon from the Domestic Fowl", J. Anat., 123, 2, pp. 369-387, 1977.

OAKES, B.W., PARKER, A.W., NORMAN, J., "Changes in Collagen Fiber Population in Young Rat Cruciate Ligament in Response to a One Month Intensive Exercise Program", Conn. Tiss. Res., vol. 9, pp. 203-216, 1982.

ORBERG, J.W., KLEIN, L., HILTNER, A., "Scanning Electron Microscopy of Collagen Fibers in Intestine", Conn. Tis. Res., vol. 9, pp. 187-193, 1982.

ORBERG, J., BAER, E., HILTNER, A., "Organization of Collagen Fibers in the Intestine", Conn. Tis. Res., vol. 11, pp. 285-297, 1983.

OXLUND, H., "The Influence of a Local Injection of Cortisol on the Mechanical Properties of Tendons and Ligaments and the Indirect Effect on Skin", Acta Orthop. Scand., 51, pp. 231-238, 1980 (a).

OXLUND, H., ANDREASSEN, T.T., "The Roles of Hyaluronic Acid, Collagen and Elastin in the Mechanical Properties of Connective Tissues", J. Anat., 131, 4, pp. 611-620, 1980 (b).

OXLUND, H., MANTHORPE, R., VIIDIK, A., "The Biomechanical Properties of Connective Tissue in Rabbits as Influenced by Short-Term Glucocorticoid Treatment", J. Biomechanics, vol. 14, no. 3, pp. 129-133, 1981.

OXLUND, H., MANTHORPE, R., "The Biomechanical Properties of Tendon and Skin as Influenced by Long Term Glucocorticoid Treatment and Food Restriction", Biorheology, 19, pp. 631-646, 1982.

PARRY, D.A.D., CRAIG, A.S., BARNES, G.R.G., "Tendon and Ligament from the Horse: An Ultrastructural Study of Collagen Fibrils and Elastic Fibers as a Function of Age", Proc. R. Soc. Lond. B, 203, pp. 293-303, 1978.

PARRY, D.A.D., CRAIG, A.S., "Electron Microscope Evidence for an 80A Unit in Collagen Fibrils", Nature, vol. 282, pp. 213-215, 1979.

PASQUALI RONCHETTI, I., FORNIERI, C., BACCARANI CONTRI, M., VOLPIN, D., "The Ultrastructure of Elastin Revealed by Freeze-Fracture Electron Microscopy", Micron, vol. 10, pp. 89-99, 1979.

PEDRINI, V.A., PEDRINI-MILLE, A., VAILAS, A.C., "Proteoglycans of Ligamentous Tissues", Proceeding, 28th Annual ORS, Anaheim, California, March 8-10, p. 324, 1983.

PIEZ, K.A., TRUS, B.L., "Microfibrillar Structure and Packing of Collagen: Hydrophobic Interactions", J. Mol. Biol., vol. 110, pp. 701-704, 1977.

PIEZ, K.A., "Structure and Assembly of the Native Collagen Fibril", Connect. Tissue Res., vol. 10, pp. 25-36, 1982.

PIZIALI, R.L., "The Contribution of the Cruciate Ligaments to the Load-Displacement Characteristics of the Human Knee Joint", J. of Biomech. Eng., vol. 102, pp. 277-283, 1980.

PODRAZKY, V., "Interactions Between Connective Tissue Components", Connective Tissue Res., Chemistry, Biology and Physiology, vol. 54, edits 2, Deyl et M. Adam, pp. 151-162, 1981.

PURINYA, B.A., SLUTSKII, L.I., KAS'YANOV, V.A., TSEDERS, E.E., VILKA, G.L., "Effect of the Biochemical Composition of the Wall of the Vessels of the Human Thigh on its Mechanical Properties", Polym. Mech., vol. 10, no. 2, pp. 266-274, 1975.

RABINOWITZ, J.L., GREGG, J.R., NIXON, J.E., RALPH SCHUMACHER, H., "Lipid Composition of the Tissues of Human Knee Joints", Clin. Orthop. and Rel. Res., no. 143, pp. 260-265, 1979.

ROBERT, L., "Mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement", biologie moléculaire 5, Masson, 1983.

ROSS, R., BORNSTEIN, P., "The Elastic Fiber I. The Separation and Partial Characterization of its Macromolecular Components", the J. of Cell Biology, vol. 40, pp. 366-381, 1969.

RUOSLAHTI, E., ENGVALL, E., HAYMAN, E.G., "Fibronectin: Current Concepts of its Structure and Functions", Coll. Res., vol. 1, pp. 95-128, 1981.

SANDBERG, L.B., "Elastin Structure in Health and Disease", Int. Rev. Conn. Tis. Res., no. 7, pp. 159-210, 1976.

SANDBERG, L.B., SOSKAL, N.T., LOSLIE, J.G., "Elastin Structure, Biosynthesis and Relation to Disease States", the New England Journal of Medecine, vol. 304, no. 10, pp. 566-579, 1981.

SCAPINELLI, R., "Studies on the Vasculature of the Human Knee Joint", Acta Anat., vol. 70, no. 3, pp. 305-331, 1969.

SCHWERDT, H., CONSTANTINESCO, A., CHAMBRON, J., "Dynamic Viscoelastic Behaviour of the Human Tendon In Vitro", J. of Biomech., vol. 13, no. 11, pp. 913-922, 1980.

SCOTT, J.E., "Collagen-Proteoglycan Interaction. Localization of PG-s in Tendon by Electron Microscopy", Biochem. J., no. 187, pp. 887-891, 1980.

SCOTT, J.E., ORFORD, C.R., HUGHES, E.W., "Proteoglycan-Collagen Arrangements in Developing Rat Tail Tendon", Biochem. J., no. 195, pp. 573-581, 1981.

SEAR, C.H.J., KEWLEY, M.A., JONES, C.J.P., GRANT, M.E., JACKSON, D.S., "The Identification of Glycoproteins Associated with Elastic-Tissue Microfibrils", Biochem. J., no. 170, pp. 715-718, 1978.

SEAR, C.H.J., GRANT, M.E., JACKSON, D.S., "The Nature of the Microfibrillar Glycoproteins of Elastic Fibers", Biochem. J., no. 194, pp. 587-598, 1981 (a).

SEAR, C.H.J., JONES, C.J.P., KNIGHT, K.R., GRANT, M.E., "Elastogenesis and Microfibrillar Glycoprotein Synthesis by Bovine Ligamentum Nuchae Cells in Culture", Conn. Tis. Res., vol. 8, pp. 167-170, 1981 (b).

SHAH, J.S., JAYSON, M.I.V., HAMPSON, W.G.J., "Mechanical Implications of Crimping in Collagen Fibers of Human Spinal Ligaments", Engineering in Medecine, I Mech E., vol. 8, no. 2, pp. 95-102, 1979.

SHESTERNINA, L.N., PASHKOV, E.P., YAGODA, L.A., "Comparative Assessment of the Strength of Tendons Preserved by Different Means", Mechanics of Composite Materials, vol. 15, no. 3, pp. 328-329, 1979.

SHIKATA, J., SANADA, H., YAMAMURO, T., TAKEDA, T., "Experimental Studies of the Elastic Fiber of the Capsular Ligament: Influence of Ageing and Sex Hormones on the Hip Joint Capsule of Rats", Conn. Tis. Res., vol. 7, pp. 21-27, 1979.

SONNERUP, L., "Stress and Strain in the Intervertebral Disk in Relation to Spinal Disorders", Osteoarthromechanics edit. par D.N. GHISTA, Hemisphere Publishing Corporation, pp. 315-351, 1982.

STARCHER, B.C., GALIONE, M.J., "Purification and Comparison of Elastins from Different Animal Species", Analytical Biochem. 74, pp. 441-447, 1976.

STEVENS, J.C., JONES, N.B., "A Review of Apparatus for Investigating the Mechanical Properties of Soft Animal Tissue In Vitro", Eng. in Medicine, vol. 6, no. 4, pp. 112-119, 1977.

STOUFFER, D.C., BUTLER, D.L., KIM, H., "Tension-Torsion Characteristics of the Canine Anterior Cruciate Ligament - Part I: Theoretical Framework", J. of Biomechanical Eng., vol. 105, pp. 154-159, 1983.

TAMBURRO, A.M., "Elastin: Molecular and Supramolecular Structure", Program in Clinical and Biological Research, vol. 54, edis., Zdenek Deyl and M. ADAM, 1981, Conn., Tissue Res: Chemistry, Biology and Physiology, pp. 45-62, Alan R. Liss, Inc. 150 Fiffa Av., N.Y. 10011, 1981.

TANZER, M.L., WAITE, J., "Collagen Cross Linking", Collagen Rel. Res., vol. 2, pp. 177-180, 1982.

TARDIEU, C., BLANCHARD, O., TABARY, J.C., LE LOUS, M., "Tendon Adaptation to Bone Shortening", Conn. Tiss. Res., vol. 11, pp. 35-44, 1983.

THIRY, P.S., TABBAL, M., DROUIN, G., LAURIN, C.A., "Structural Composite Model for Large Deformation of the Anterior Cruciate Ligament", ASME Biomech., Symp., vol. 43, pp. 271-273, Boulder, Colorado, USA, 1981 (a).

THIRY, P.S., TABBAL, M., DROUIN, G., LAURIN, C.A., "A Large Deformation Composite for Quasi-Cylindrical Ligamentous Structure", Mechanics of Structural Media, Part A, pp.-209-217, Ottawa, Canada, 1981 (b).

TIPTON, C.M., JAMES, S.L., MERGNER, W., TCHENG, T.K., "Influence of Exercise on the Strength of the Medial Collateral Ligaments of Dogs", Am. J. Physiol., vol. 218, pp. 894-901, 1970.

TRELSTAD, R.L., "Le collagène", La recherche, no. 120, pp.-312-321, 1981.

UITTO, J., "Biochemistry of Elastic Fibers in Normal Connective Tissues and its Alterations in Diseases", the J. of Investigate Dermatology, vol. 72, no. 1, pp. 1-10, 1979.

VAILAS, A.C., TIPTON, C.M., MATTHES, R.D., GART, M., "Physical Activity and its Influence on the Repair Process of Medial Collateral Ligaments", Conn. Tiss. Res., vol. 9, pp. 25-31, 1981.

VAILAS, A.C., PEDRINI, V.A., PEDRINI-MILLE, A., "A Comparative Analysis of Proteoglycans from Different Ligaments", 28th Annual ORS, p. 315, 1982.

VELEBNY, V., LEDVINA, M., LANKASOVA, V., "Interaction of a Tropoelastin Model with Connective Tissue Components", Conn. Tiss. Res., vol. 9, pp. 63-68, 1981.

VERZAR, F., "The Ageing of Connective Tissue", Gerontologia (Basel), vol. 1, no. 6, pp. 363-378, 1957.

VIIDIK, A., "Connective Tissues-Possible Implications of the Temporal Changes for the Aging Process", Mechanisms of Ageing and Development, 9, pp. 267-285, 1979 (a).

VIIDIK, A., "Biomechanical Behaviour of Soft Connective Tissues", Progress in Biomechanics (ed. N. AKKAS), pp. 75-113, Sijthoff and Nordhoff, Alpen aan den Rijn, 1979 (b).

VIIDIK, A., VUUST, J., "Biology of Collagen", Academic Press, N.Y., 1980 (a).

VIIDIK, A., "Interdependence Between Structure and Function in Collagenous Tissues", dans le livre: Biology of Collagen, pp. 257-281, 1980 (b).

VIIDIK, A., DANIELSEN, C.C., OXLUND, H., "On Fundamental and Phenomenological Models. Structure and Mechanical Properties of Collagen, Elastin and Glycosaminoglycan Complexes", Biorheology, 19, pp. 437-451, 1982.

VOGEL, H.G., "Influence of Maturation and Age on Mechanical and Biochemical Parameters of Connective Tissue of Various Organs in the Rat", Conn. Tis. Res., vol. 6, pp. 161-166, 1978 (a).

VOGEL, H.G., "Age Dependence of Mechanical Parameters in Rat Skin Following Repeated Strain", Aktuelle Gerontologie 8, pp. 601-618, 1978 (b).

VOGEL, H.G., "Influence of Maturation and Aging on Mechanical and Biochemical Properties of Connective Tissue in Rats", Mechanisms of Ageing and Development, 14, pp. 283-292, 1980 (a).

VOGEL, H.G., "Experimental Approaches to Maturation and Ageing of Skin", Cosmetics and Toiletries, vol. 95, pp. 20-29, 1980 (b).

WIJN, P.F.F., "The Alinear Viscoelastic Properties of Human Skin In-Vivo for Small Deformations", Ph.D. Thesis, Katholieke Universiteit Nijmegen, The Netherlands, 1980.

WILSON, A.S., DANYLCHUK, K.D., "Studies on the Morphometric and Biomechanical Characteristics of Ligaments of the Knee Joint", Proc. of the 1st Annual Meeting of the Canadian Society of Biomechanics, pp. 58-67, 1974.

WOLLWEBER, L., STACKE, R., GOTHE, U., "The Use of a Simple Methods to Avoid Cell Shrinkage During SEM Preparation", J. of Microscopy, vol. 121, pp. 185-189, 1981.

WOO, S. L-Y., "Biorheology of Soft Tissues: The Need for Interdisciplinary Studies", Biorheology, vol. 17, pp. 39-43, 1980.

WOO, S. L-Y., GOMEZ, M.A., AMIEL, D., RITTER, M.A., GELBERMAN, R.H., AKESSON, W.H., "The Effects of Exercise on the Biomechanical and Biochemical Properties of Swine Flexor Tendons", J. of Biomechanical Eng., vol. 103, pp. 51-56, 1981.

WOO, S. L-Y., GOMEZ, M.A., WOO, Y-K., AKESSON, W.H., "Mechanical Properties of Tendons and Ligaments. II: The Relation of Immobilization and Exercise on Tissue Remodeling", Biorheology, 19, pp. 397-408, 1982.

WOO, S. L-Y., GOMEZ, M.A., AKESSON, W.H., "Mechanical Properties Along the Medial Collateral Ligament", 29th Annual ORS, Anaheim, California, 1983 (a).

WOO, S. L-Y., GOMEZ, M.A., SEGUCHI, Y., ENDO, C.M., AKESSON, W.H., "Measurement of Mechanical Properties of Ligament Substance from a Bone-Ligament-Bone Preparation", J. of Orthopaedic Research, vol. 1, no. 1, 1983 (b).

YOTSUZUKA, K., SASADA, T., MABUCHI, K., SEKIGUCHI, F., KUBODERA, T., TSUKAMOTO, Y., NISHI, H., "Mechanical Properties of Ligaments - An Impact Rupture Test of Medial Collateral Ligament -", (communication personnelle, 1982).

APPENDICE A

RELATIONS STRUCTURE - PROPRIETES DES LIGAMENTS ET DES TENDONS

1. INTRODUCTION

Les propriétés mécaniques des ligaments et des tendons ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, et d'excellentes revues de littérature ont été publiées [BUTLER et coll., 1978; VIIDIK, 1979b]. Toutefois, les résultats obtenus par les différents expérimentateurs ne sont directement comparables, et leur interprétation en est souvent complexe. Ces difficultés de l'approche macroscopique pour déterminer les propriétés mécaniques des tissus mous, découlent principalement de la difficulté de standardiser l'expérimentation rhéologique. Les facteurs critiques peuvent se résumer ainsi:

a) Histoire du tissu: espèce, âge, sexe, poids, degré d'activité physique ou d'immobilisation, état de santé, temps post-mortem...

b) Conditions de conservation: température, durée et milieu de conservation, vitesse de congélation et de dégel [SHESTERNINA et coll., 1979].

c) Conditions d'essai: la température et le pH du milieu, la durée de l'essai, les dimensions du spécimen, le mode d'attache du spécimen (complexe os-ligament-os, ou ligament), la direction de la charge appliquée par rapport à celle des fibres, la vitesse de déformation, sont autant de facteurs pouvant influencer les résultats.

d) Méthodes de mesure: la mesure de la longueur initiale, de la section droite, et la mesure de la déformation (jauge à mercure, extensomètre, méthodes optiques) ne sont pas standardisées. De plus, les

paramètres mécaniques analysés par les différents chercheurs ne sont pas toujours les mêmes: charge ultime, module d'élasticité, énergie de rupture, déformation de rupture, hystérésis, etc..

L'approche macroscopique considère les ligaments et les tendons comme étant des matériaux homogènes. C'est sans doute l'une des raisons pour lesquelles l'influence de ces différents facteurs n'a pas été étudiée. Or, nous verrons dans cette partie, que les propriétés mécaniques des ligaments et des tendons résultent de la microstructure, de l'architecture et des interactions entre les différentes composantes du tissu. Celles-ci dépendent des facteurs ci-dessus tels que l'histoire du tissu et les conditions de conservation ou d'essai, et qui par conséquent peuvent modifier les paramètres biomécaniques que l'on cherche à déterminer.

Dans ce paragraphe, après avoir examiné la réponse du tissu au chargement uniaxial, nous discuterons la corrélation entre la structure et la réponse des ligaments

et des tendons. La seconde partie sera consacrée à l'étude des facteurs in vivo ou in vitro qui peuvent modifier la structure et/ou les liaisons, ainsi que les propriétés des tissus mous, et nous discuterons enfin la corrélation structure et/ou liaisons - propriétés biomécaniques.

2. COMPORTEMENT SOUS CHARGE UNIAXIALE

Du point de vue biomécanique, les propriétés d'un tissu biologique peuvent être déterminées à partir de son équation constitutive. Celle-ci est généralement obtenue, d'une façon empirique, par des essais mécaniques réalisés in vitro. Dans cette approche macroscopique, les ligaments et les tendons sont considérés comme des matériaux homogènes constitués essentiellement de fibres de collagène. Ces fibres ont un arrangement parallèle à l'axe longitudinal du tissu.

Les propriétés mécaniques ont été, par conséquent, caractérisées par des essais de chargement uniaxial permettant d'obtenir les relations force-allongement [BUTLER

et coll., 1978; DORLOT et coll., 1980], et les courbes force-temps ou allongement-temps [VIIDIK, 1979; FUNG, 1981].

Nous examinerons trois types d'essais mécaniques:

Essai "quasi-statique", où la vitesse de déformation est lente et constante.

Essai dynamique, où des essais charge-allongement à des vitesses de déformation élevées, des essais de relaxation de contrainte, de fluage et d'hystérésis sont effectués.

Essai de préconditionnement, où le spécimen est soumis à un chargement cyclique.

2.1 Essai "quasi-statique":

Relation force-allongement ou contrainte-déformation

Des essais de traction simple à vitesse d'allongement constante, permettent d'obtenir les courbes force-déformation des ligaments et des tendons. La plupart des essais se font sur des complexes os-ligament-os et os-tendon-muscle-(tendon)-os en raison de la faible longueur de ces tissus. Il existe, en effet, d'énormes difficultés concernant la fixation des spécimens dans les mors des machines de traction [STEVENS et JONES, 1977]. Il est difficile de s'affranchir des problèmes de glissement du spécimen ou de concentration de contraintes au niveau des sites d'ancrage.

La courbe force-allongement de la figure A-1, décrit les propriétés d'un LCA canin jusqu'à la rupture. Ce diagramme charge-allongement du complexe os-LCA-os obtenu durant l'essai de rupture en traction est similaire à ceux

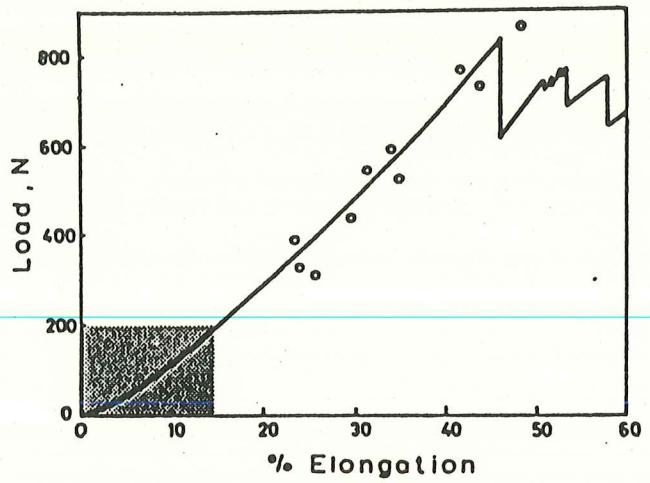


Figure A-1 Courbe force-allongement du LCA canin. Les points clairs indiquent la force de rupture de spécimens testés à la rupture, et la zone grise représente le domaine élastique.
(D'après DORLOT et coll. 1980).

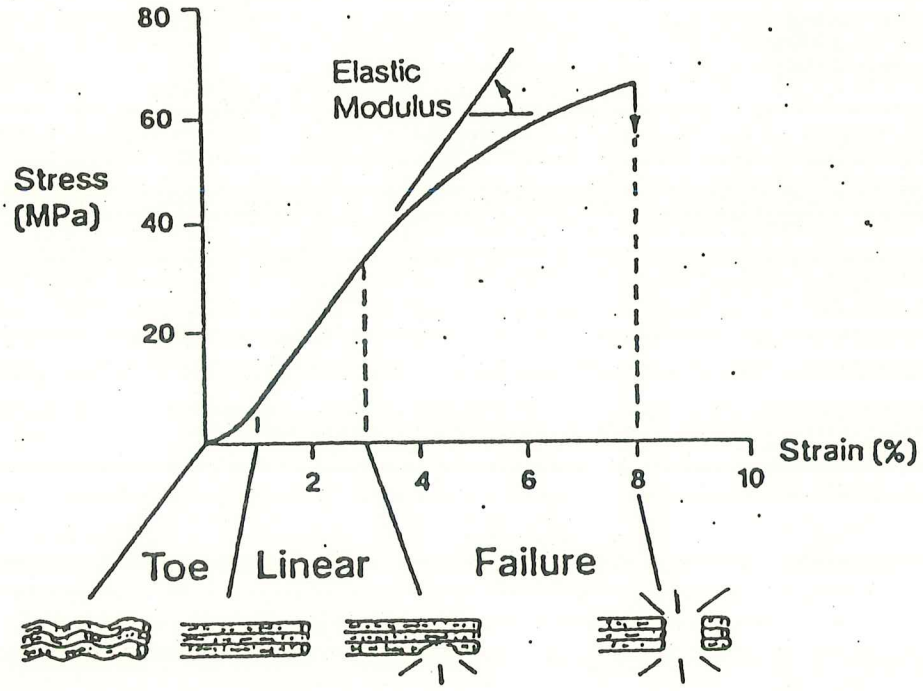


Figure A-2 Normalisée pour le collagène. Cette courbe fournit les paramètres mécaniques (du matériau) qui sont indépendants des dimensions du tissu.
(D'après BUTLER et coll. 1978).

des autres ligaments et tendons. Le complexe os-LCA-os présente un comportement structural non-linéaire. La portion initiale de la courbe est caractérisée par une faible rigidité et une forte non linéarité. Lorsque la déformation augmente, la pente de la courbe charge-allongement augmente rapidement pour atteindre un maximum dans la région linéaire. Ensuite, on a une zone de rupture progressive (irréversible) jusqu'à un point de rupture catastrophique du tissu.

Plusieurs paramètres biomécaniques peuvent être déterminés à partir de ces diagrammes charge-allongement:

- La résistance à la rupture, c'est-à-dire la force maximale.

- La rigidité élastique du tissu mesuré par la tangente de l'angle entre la partie linéaire de la courbe et l'abcisse (axe x).

- L'énergie, une fonction de la force et du déplacement, qui peut ici être calculée à partir de l'aire entre la courbe force-allongement et l'axe des x, au point de rupture. Ce paramètre d'absorption d'énergie est appelé énergie de rupture.

Dans la plupart des travaux, ces courbes force-allongement ont été transformées en courbes contrainte-déformation qui décrivent mieux les caractéristiques de la substance (matériau) du tissu, et permettent une meilleure analyse de la relation microstructure-propriétés du tissu. Toutefois, cette transformation soulève deux difficultés majeures: le calcul de la contrainte et celui de la déformation. L'inexistence de méthodes standards de calcul de ces paramètres, complique la comparaison entre les différents résultats.

(i) Détermination de la contrainte

La principale difficulté dans le calcul de la contrainte (force/unité d'aire de la section droite) est la mesure de l'aire de la section droite.

Une erreur géométrique due à la variation de la section droite le long de l'axe longitudinal du tissu, s'ajoute souvent à l'erreur de mesure.

Cette double source d'erreur de l'aire de la section droite, peut être contournée, en normalisant les valeurs de la force originale par la masse séchée ou la masse hydratée par unité de longueur plutôt que par l'aire de la section droite [VIIDIK, 1980(a)]. La "contrainte" est alors exprimée en Newtons par masse par longueur (N mg^{-1} mm).

Toutefois, les mesures de masse incluent aussi les substances non collagéniques présentes (élastine, PGs ...). Ceci introduit une imprécision quand on analyse les propriétés mécaniques du collagène. Dans de telles

évaluations, il est préférable d'utiliser la quantité de collagène par unité de longueur du spécimen comme mesure de "la surface fonctionnelle de la section droite", et d'exprimer la "contrainte" en Newtons/mg de collagène/mm de longueur du spécimen [VIIDIK, 1980]. De cette façon, on peut distinguer dans le collagène les changements qualitatifs des changements quantitatifs.

(ii) Détermination de la déformation

La déformation unitaire ϵ, est exprimée en pourcentage ou en unités de la longueur originale (ou de référence) du spécimen.

$$\epsilon = \frac{\lambda^2 - 1}{2} \quad \text{où } \lambda = \frac{L}{L_{réf}} \text{ est le rapport d'allongement}$$

L'état de référence (ou original) peut être choisi d'une façon arbitraire. En mécanique de l'ingénieur, on choisit toujours l'état "naturel" comme état de référence, c'est-à-dire celui qui représente le matériau relaxé et non

contraint. En biomécanique des tissus mous, il s'avère que l'un des problèmes pratique le plus complexe est la détermination des dimensions du spécimen d'essai à l'état naturel. La raison est qu'à cet état, le matériau est habituellement très mou, et difficile à manier quand on désire mesurer sa longueur ou sa section droite. De plus, à cause de l'existence d'une "pré-contrainte" à l'état in vivo, la longueur du tissu, comparée à celle après excision, n'est pas connue.

La longueur du spécimen relaxé est donc, une mesure plutôt arbitraire, et une longueur plus reproductible doit être utilisée. La meilleure méthode consisterait à définir la longueur de référence comme étant la longueur à laquelle la déformation provoque la plus petite charge clairement enregistrable [VIIDIK, 1980]. Celle-ci est d'environ 0,5 à 1% de la résistance ultime en traction, pour la plupart des équipements. Le niveau de contrainte utilisé pour définir la longueur de référence, doit être le même dans tous les groupes d'une série d'essais.

Des techniques optiques (sans contact) ont été développées récemment pour mesurer les déformations superficielles de la substance ligamentaire lors d'essai mécanique des complexes os-ligament-os [WOO et coll., 1980, 1981, 1982, 1983].

Ces méthodes optiques éliminent les difficultés de mesure de la longueur initiale du ligament entier.

Les caractéristiques contrainte-déformation ainsi obtenues présentent une forme non-linéaire avec une pente croissante avec la contrainte (figure A-2). L'interprétation physique du comportement non-linéaire des ligaments et des tendons, est que lors de la traction, les fibres de collagène ne se chargent pas en même temps. Il existe, par conséquent, une corrélation entre la microstructure et la réponse macroscopique du tissu.

(i) Région initiale de la courbe

Durant un essai de traction simple, les fibres de collagène, qui à l'état relaxé, ont une morphologie ondulée, commencent à se redresser. Lorsque la déformation augmente, cette ondulation diminue progressivement jusqu'à une déformation critique à laquelle les différentes unités structurales sont complètement redressées.

(ii) Région linéaire

Le domaine de comportement linéaire est assez grand pour les tissus constitués de fascicules de collagène denses et à fibres parallèles tels que le tendon d'Achille, le ligament rotulien etc.. Par contre, pour des tissus tels que le LCA, où les fibres de collagène ne sont pas aussi parallèles, cette région linéaire diminue; et, dans certains cas, se réduit à un point d'inflexion.

Ce segment linéaire de la courbe correspond à la déformation élastique des fibres de collagène. NEMETSCHEK et coll. (1978) ont observé que la période de striation caractéristique des fibrilles de collagène (67 nm) augmente avec la contrainte appliquée. Toutefois, si la limite élastique n'est pas dépassée, le profil revient à sa dimension originale après relaxation.

(iii) Région de déformation plastique

A la fin de la partie élastique de la courbe, la déformation devient irréversible. Un endommagement structural se produit donc, à ces niveaux de déformation.

La nature de cet endommagement n'est pas bien comprise. BETSCH et BAER (1980) expliquent le comportement des tissus, dans la région de déformation plastique par une perte de cohésion et un glissement des microfibrilles de collagène. Dans le cas du ligament croisé antérieur, on observe généralement des microruptures dans la région irréversible [BUTLER et coll., 1978]. Ces microruptures

seraient des ruptures de sous-fascicules par suite d'un chargement inégal [VIIDIK, 1979].

(iv) Zone de rupture

Après le point de contrainte maximale, la contrainte diminue lorsque la déformation augmente, et le spécimen se rompt soit brusquement, soit par des ruptures successives comme dans le cas du LCA. Le spécimen peut, cependant, se rompre à la fin de la partie linéaire de la courbe. Ceci a été observé dans le cas de complexes os-ligament-os lâchant par avulsion osseuse.

La rupture en dents de scie (ruptures successives) est souvent reliée à la différence d'étirement des différentes unités structurales du collagène [BUTLER et coll., 1978].

2.2 Essai dynamique

Propriétés dépendant du temps: comportement viscoélastique

Les ligaments et les tendons sont des matériaux viscoélastiques. Ce comportement viscoélastique est mis en évidence par leur sensibilité aux phénomènes dépendants du temps tels que la relaxation de contrainte, le fluage, la vitesse de déformation et l'hystérésis.

(a) Relaxation de contrainte et fluage

Quand une expérience de chargement en tension est arrêtée quelque part en dessous de la fin de la partie linéaire de la courbe, et que l'on maintient la déformation constante, alors la contrainte se relâche, d'abord rapidement, puis de plus en plus lentement (courbe 1 sur la figure A-3a).

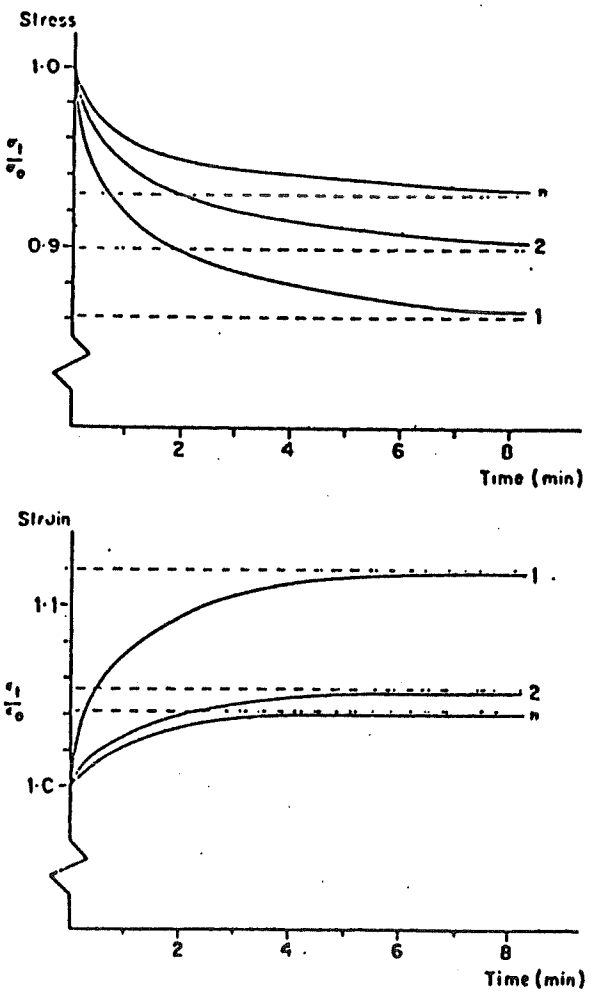


Figure A-3 Courbes de relaxation et de fluage.

(a) Expériences de relaxation de contrainte (à un niveau de déformation constant) où σ = 100% est le niveau de contrainte au début de la relaxation, et qui est d'environ 1/3 de la contrainte maximale. Les cycles 1, 2 et n (= phase stationnaire) y sont représentés.

(b) Expériences de fluage (à un niveau de contrainte constant, et d'environ 1/3 de la contrainte maximale), où ε = 100% est le niveau de déformation au début du fluage. Les cycles 1, 2 et n (= phase stationnaire) y sont représentés.

(D'après VIIDIK, 1980).

D'un autre côté, quand la contrainte est maintenue constante après avoir atteint le point mentionné ci-dessus, la déformation augmente à une vitesse qui est d'abord élevée, ensuite devient successivement plus lente (courbe 1 sur la figure A-3b).

Les courbes contrainte-temps et déformation-temps ont donc une forme quasi-exponentielle, et approchent asymptotiquement (avec le temps) certaines valeurs de contrainte et de déformation respectivement.

(b) Influence de la vitesse de déformation

Les propriétés mécaniques des ligaments et des tendons dépendent de la vitesse de déformation. La courbe contrainte-déformation (figure A-4), notamment sa partie linéaire, devient plus raide quand la vitesse augmente [FRISEN et coll., 1969]. Toutefois, SONNERUP (1982) a montré que la pente de la partie linéaire de la courbe tend rapidement vers une limite supérieure. Il existerait donc, une certaine vitesse critique de déformation, à laquelle la

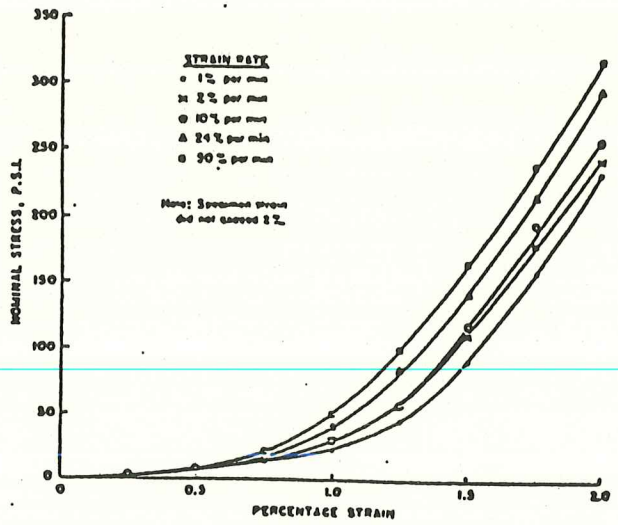


Figure A-4 Influence de la vitesse de déformation sur la courbe contrainte-déformation du tendon d'Achille humain.
(D'après ABRAHAMS, 1967).

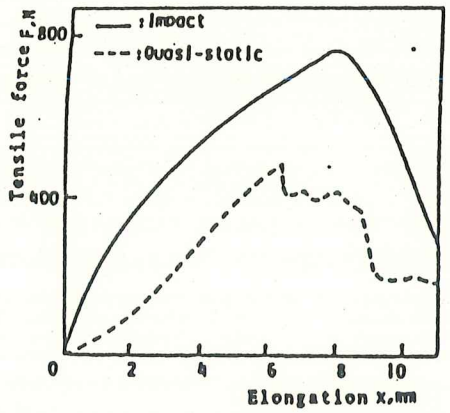


Figure A-5 Comparaison d'un essai quasi-statique et d'un essai d'impact sur la courbe force-allongement d'un ligament collatéral.
(D'après YOTSUZUKA et coll. 1982).

rigidité du tissu atteint une valeur maximale, et devient ensuite indépendante de la vitesse.

Récemment, HAUT (1983) a montré que dans le cas du TQR, quelque soit l'âge de l'animal, la rigidité dans la région initiale augmente avec la vitesse de déformation. La région de réponse linéaire (déformation reversible) est plus grande pour des déformations élevées, et ceci serait dû au caractère dépendant du temps (viscoélastique) de la gaine de mucopolysaccharides qui entoure les fibrilles de collagène.

La région de déformation irréversible (réponse non-linéaire) serait beaucoup plus sensible à la vitesse de déformation. Elle diminue pour des vitesses de déformation élevées [BETSCH et BAER, 1980].

La comparaison des essais "quasi-statiques" et dynamiques montre que la résistance en tension des tissus mous augmente avec la vitesse de déformation. A des vitesses de l'ordre de 100 sec^{-1}, MELVIN et coll. (1975) trouvent des niveaux de contrainte deux fois supérieurs à ceux des

essais statiques pour des niveaux de déformation comparables. Par contre, les niveaux de déformation à la rupture seraient similaires, alors que HAUT (1983) observe une augmentation de la déformation de rupture lorsque la vitesse de déformation augmente.

YOTSUZUKA et coll. (1982) ont étudié le comportement dynamique des ligaments collatéraux canins par des essais d'impact (choc) en tension. La comparaison des propriétés mécaniques montre que le comportement viscoélastique est plus important que lors des essais "quasi-statiques" (figure A-5).

(c) Hystérésis

ARNOLD (1974) a montré que la boucle d'hystérésis (frottement interne) des tendons humains du pied dépend de la vitesse de déformation. FUNG (1981) a montré qu'après un certain nombre de cycles, la boucle d'hystérésis devient presque indépendante de la vitesse de déformation dans le cas du mésentère de lapin. Cette insensibilité à la

fréquence de la boucle d'hystérésis est incompatible avec tout modèle viscoélastique constitué d'un certain nombre d'amortisseurs et de ressorts, et a conduit FUNG à formuler le concept de viscoélasticité quasi-linéaire.

Par ailleurs, SCHWERDT et coll. (1980) ont observé que le frottement interne des tendons augmente avec le rapport d'extension initial, mais qu'il est quasiment indépendant de la fréquence.

2.3 Préconditionnement

On peut observer des composantes irréversibles dans le comportement des ligaments et des tendons en répétant un cycle expérimental sur le même spécimen.

Un chargement cyclique, à une contrainte maximale constante, produit une déformation croissante des tendons et des ligaments (figure A-6). La courbe contrainte-déformation se déplace successivement à droite, et la courbe de la

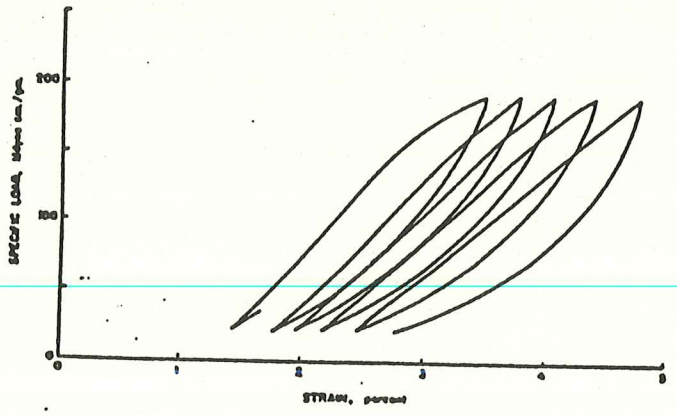


Figure A-6 Enregistrement force-allongement d'un TQR montrant un allongement progressif (0.072 cycles/min).
(D'après ELLIS (1970), cité par GOLDSTEIN, 1981).

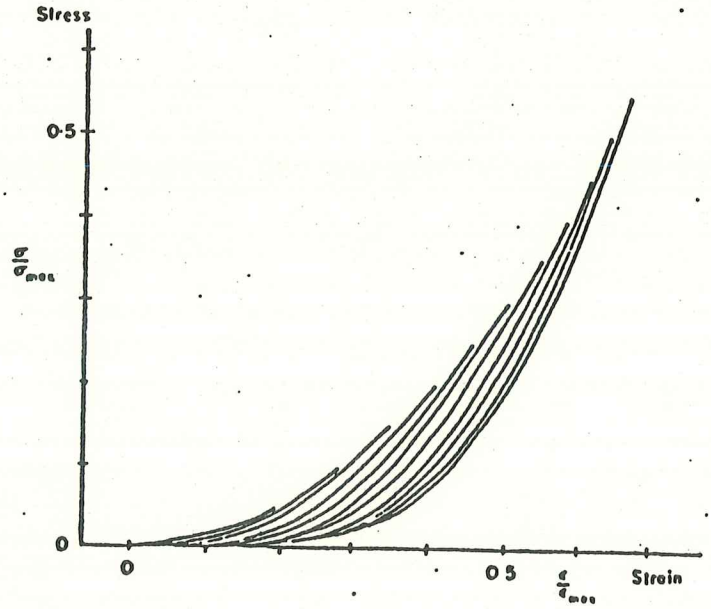


Figure A-7 Cycles successifs sur le même spécimen non préconditionné au préalable.
(D'après VIIDIK, 1980).

phase de chargement, mais pas celle du déchargement, devient plus raide (figure A-7).

La déformation enregistrée illustre un écoulement pseudo-plastique, et une réponse viscoélastique sous des conditions de chargement lent.

La courbe de déchargement présente une plus grande rigidité que celle de la phase de chargement. Ceci signifierait qu'une certaine quantité d'énergie est dissipée sous forme d'amortissement [GOLDSTEIN, 1981].

La relaxation de contrainte à déformation constante, et le fluage à contrainte constante deviennent moins prononcés lorsque le nombre de cycles augmente (figure A-3).

Lorsque le nombre de cycles augmente, l'aire de la boucle d'hystérésis diminue. Après un certain nombre de cycles, le comportement du tissu entre dans une phase stationnaire, et les résultats deviennent reproductibles

d'un cycle à l'autre. Cette phase initiale du comportement du tissu est utilisé comme un préconditionnement, avant l'analyse des divers paramètres qui nécessitent des expériences répétées sur le même spécimen [FUNG, 1981].

Ce préconditionnement est seulement valable à un niveau de contrainte donné; quand le spécimen est sollicité à des niveaux de contrainte plus élevés, les phénomènes irréversibles de la phase initiale se reproduisent.

La raison pour laquelle le préconditionnement se produit dans un spécimen n'est pas claire. FUNG (1981) attribue le mécanisme du préconditionnement à un changement de la structure interne du tissu avec le cyclage. Par cyclage répété, le tissu atteindrait un état permanent, ensuite aucun changement ultérieur ne se produira à moins que les limites inférieures ou supérieures du cyclage soient changées. Dans ce cas, la structure interne change aussi, et le spécimen doit être préconditionné à nouveau.

Un modèle de cumul de micro-endommagement fut proposé par CHU et BLATZ en 1972 (cité par GOLDSTEIN, 1981) pour décrire l'hystérésis. Ils ont supposé qu'elle proviendrait de la rupture des liaisons hydrogènes, et d'autres liaisons chimiques entre la matrice et les structures fibrillaires. In vivo, les mécanismes physiologiques rendent ces changements normalement réversibles, sauf si l'accumulation de ces ruptures excède la capacité de réparation physiologique.

On peut se demander s'il existe un niveau de contrainte au-dessous duquel les phénomènes inrréversibles de plasticité et de viscosité ne se produiraient pas, c'est à dire si la réversibilité est liée ou non au niveau de la contrainte. Cette hypothèse est fausse pour les conditions in vitro de cyclage du même spécimen à des niveaux de contrainte successivement plus élevés (figure A-7).

Cet ensemble de changements dans la phase initiale du comportement du tissu est donc irréversible in vitro.

VIIDIK (1981) attribue cette irréversibilité à une consolidation de la structure par suite d'un meilleur alignement parallèle des fibres de collagène et d'une redistribution partielle de la substance fondamentale.

Cependant, après une certaine période de repos suivant un préconditionnement limité à la région linéaire de la courbe contrainte-déformation, les changements de propriétés mécaniques sont réversibles. L'aire de la boucle d'hystérésis reprend sa valeur initiale [BETSCH et BAER, 1980].

Il semblerait toutefois, que si le cyclage s'effectue dans la région de déformation permanente, même après de longues périodes de repos, les changements des propriétés demeurent irréversibles. VIIDIK et coll. (1979) ont observé que les microruptures de la zone de déformation plastique ne se produisent que lors du premier cycle de chargement. La déformation permanente est donc attribuée aux microruptures mécaniques. On ignore, cependant, les sites de telles microruptures.

Par ailleurs, certains auteurs ont observé des changements permanents à des niveaux de déformation physiologiques [ABRAHAMS, 1967].

Récemment, GOLDSTEIN (1981) a suggéré que les déformations permanentes proviennent des fibrilles de collagène relaxées, et qui ne reviendraient pas à leur configuration ondulée originale. Par conséquent, le mécanisme conduisant à une déformation permanente peut être une rupture des liaisons biochimiques maintenant les configurations ondulées.

Ces changements durant la phase initiale du comportement du tissu, notamment l'écrouissage par déformation et la diminution de la viscosité, sont bénéfiques du point de vue fonctionnel. Ils contribuent à un transfert plus précis de la force musculaire au tendon, et pourraient bien se produire durant l'échauffement effectué habituellement avant des exercices athlétiques. D'un autre côté, ces changements seraient donc réversibles in vivo après une période de repos plus grande [VIIDIK, 1980].

3. INFLUENCE DES MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE ET/OU DES LIAISONS SUR LES PROPRIETES BIOMECANIQUES

La structure et les liaisons des différents constituants des ligaments et des tendons peuvent être modifiées IN VIVO par divers facteurs tels que l'immobilisation, l'activité physique, l'âge et certaines substances chimiques.

Des modifications peuvent également se produire lors d'expériences IN VITRO par suite d'une déshydratation ou d'une variation de pH. Des modifications IN VITRO peuvent aussi être introduites volontairement par des digestions enzymatiques pour des objectifs expérimentaux.

Nous allons montrer dans cette partie que les modifications de la structure et/ou des liaisons provoquent des changements dans les propriétés biomécaniques des

tissus, et mettre ainsi en évidence la relation structure-propriétés des ligaments et des tendons.

Nous étudierons d'abord les modifications qui surviennent IN VIVO par suite d'une immobilisation, d'un entraînement physique, de l'âge, et d'injections de substances chimiques. Nous aborderons ensuite les modifications introduites lors des essais IN VITRO.

Pour chaque facteur considéré, nous analyserons successivement les changements de composition, de structure, de liaisons, et des propriétés biomécaniques.

3.1 Modifications in vivo

(a) Immobilisation

Les effets d'une immobilisation (suppression de la contrainte et du mouvement) sur les ligaments et les tendons ne sont pas aussi bien compris que dans le cas des muscles et de l'os, même si le processus est admis intuitivement.

Toutefois, l'immobilisation provoque des changements de la structure et/ou des liaisons qui à leur tour modifient les propriétés biomécaniques du tissu.

Composition

AKESSON et coll. (1980) ont observé une diminution importante de la teneur en eau (de 4 à 6%) par rapport au tissu de contrôle après 9 semaines d'immobilisation du LCA de lapin. Une diminution de la concentration en GAG-s (de 30% pour la chondroïtine-sulfate 4 et 6, et de 40% pour l'acide hyaluronique) a été également observée.

Gillard et coll. (1979) ont montré que la suppression de la contrainte dans la région de compression du tendon fléchisseur de lapin, provoque une perte rapide de plus de 60% de GAG-s en 8 jours. La composante majeure qui est perdue est la chondroïtine sulfate, de sorte que la dermatane sulfate devienne le GAG prédominant. Nous verrons

qu'une perte en eau ou en GAG même infime, après immobilisation, peut être importante du point de vue fonctionnel.

Par ailleurs, l'immobilisation provoque un renouvellement ("Turnover") métabolique croissant du collagène. AMIEL et coll. (1982 a et b, 1983) ont étudié les influences d'une immobilisation à moyen terme du ligament collatéral médial de genou de lapin. Les résultats montrent une atrophie du ligament manifestée par une dégradation accrue et une diminution de la masse de collagène. La composition de la matrice change dramatiquement lorsque la période d'immobilisation augmente de 9 à 12 semaines.

La dégradation du collagène durant ces 3 semaines supplémentaires d'inactivité augmente. Elle est de 28% supérieure à celle du ligament de contrôle, alors qu'elle n'est que de 14% après 9 semaines. Cette dégradation, équilibrée par la synthèse de nouveau collagène, ne produit qu'une très faible diminution de la masse totale de

collagène (= 2%) après 9 semaines d'immobilisation; alors qu'une diminution importante (27%) est observée à la fin de 12 semaines. Une dégradation exponentielle se produit lorsque l'immobilisation se poursuit, et le ligament perd sa capacité régénératrice.

En dépit de ce changement de métabolisme, aucun changement dans le type de collagène n'a été observé dans les tissus immobilisés [AMIEL et coll., 1982b].

Structure

Le nombre et les dimensions des fascicules de fibres de collagène diminuent par suite d'une immobilisation [TIPTON et coll., 1970]. Une désorganisation des fibres de collagène (perte de leur parallélisme) a été observée dans des ligaments croisés de lapins immobilisés pendant 9 semaines [AKESSON et coll., 1980]. Une organisation aléatoire de la matrice de substance fondamentale est manifestée par un non-alignement des fibroblastes.

Liaisons

Une augmentation des liaisons inter-moléculaires réductibles, indiquant un accroissement de la synthèse du collagène, a été démontrée par AKESSON et coll. (1980). Ce sont des liaisons réductibles au borohydrure de sodium telle que: DHLNL (+ 49%), HLNL (+ 11.6%) et HHMD (+ 29%).

Propriétés biomécaniques

LAROS et coll. (1971) ont montré que l'inactivité provoque une résorption de l'os qui interrompt les fibres de collagène du LCA canin entrant dans l'os. Ceci produit une zone de faiblesse au site d'insertion, et donc diminue la résistance (force de séparation) du complexe os-ligament.

Après 8 semaines d'immobilisation de primates, NOYES et coll. (1974a) constatent une diminution de 39% de la résistance du LCA. Cet affaiblissement du ligament a été également attribué à l'atrophie de l'os cortical aux sites d'insertion puisque le mode de rupture observée est une

avulsion osseuse. Toutefois, le mode de rupture dépend également de la vitesse de déformation [NOYES et coll., 1974b].

Après 9 semaines d'immobilisation, les ligaments collatéraux du genou de lapin présentent une courbe force-déformation beaucoup moins rigide que celle du ligament de contrôle (figure A-8).

Les propriétés mécaniques (rigidité, charge ultime, capacité d'absorption d'énergie) du complexe os-ligament collatéral diminuent d'environ 1/3 par rapport au ligament de contrôle après 9 semaines d'immobilisation (figure A-9).

Les courbes contrainte-déformation (figure A-9) suggèrent que la diminution de la résistance en tension des ligaments par suite d'immobilisation, est due non seulement à une simple atrophie mais aussi aux changements dans la substance du tissu (composition, structure, liaison) [AMIEL et coll., 1982b; WOO et coll., 1982].

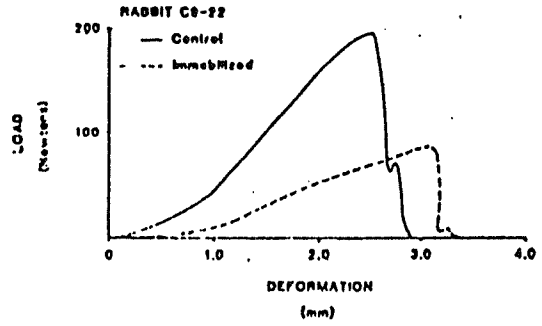


Figure A-8 Courbes force-déformation de ligaments collatéraux de genous de lapin. La courbe en trait plein est celle du ligament de contrôle, l'autre est celle du ligament immobilisé.
(D'après AMIEL et coll. 1982).

(a) (b)

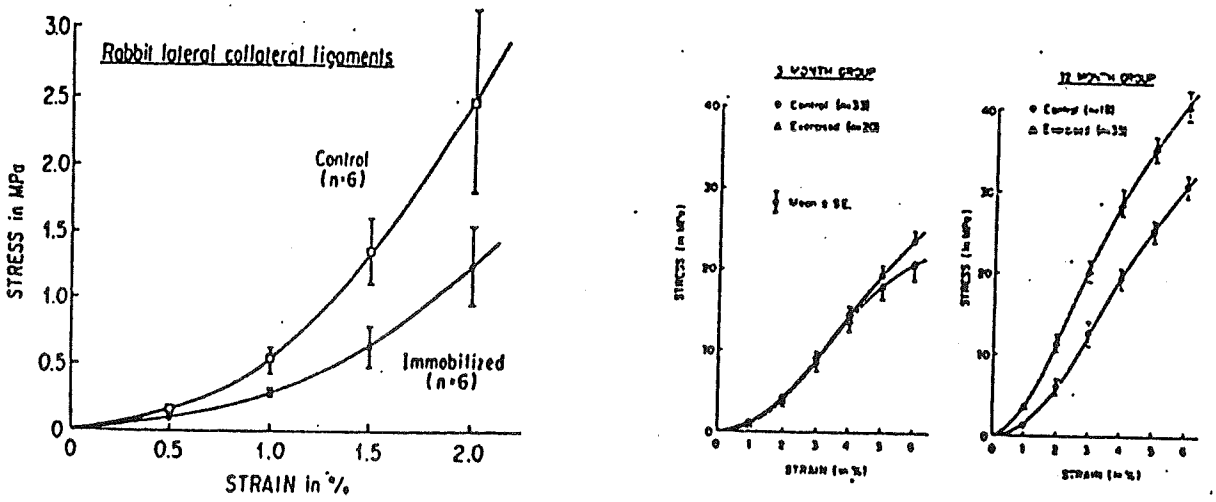


Figure A-9 (a) Courbes contrainte-déformation des ligaments collatéraux de contrôle ewt immobilisés (genou de lapin).

(b) Courbes contrainte-déformation de tendons extenseurs de porc après un entraînement de 3 et 12 mois.

(D'après WOO et coll. 1982).

Ces résultats confirment l'existence d'une corrélation entre, d'une part, la composition, la structure et les liaisons, et les propriétés biomécaniques, d'autre part.

(b) Exercice ou activité physique

Nous avons vu que les ligaments et les tendons ne sont pas des structures inertes du point de vue métabolique, et sont capables de réagir à un exercice physique.

Composition

La durée de l'exercice (entraînement) joue un rôle important dans l'homéostase du tissu [WOO et coll., 1981; 1982]. Une hypertrophie (augmentation de la masse) a été observée sur des tendons et des ligaments après un entraînement [VAILAS et coll., 1981].

Structure

Après 4 semaines d'exercice, OAKES et coll. (1982) observent une augmentation du nombre de fibres de collagène par unité d'aire du ligament croisé antérieur (LCA) de rat. Le diamètre moyen des fibres diminue également, alors que la section droite du tissu augmente après exercice [WOO et coll., 1982].

Liaisons

L'entraînement par exercice physique peut retarder le processus normal des modifications des liaisons avec l'âge étudié au prochain paragraphe. VIIDIK (1979a) a montré qu'un entraînement de lapins en croissance maintient la stabilité thermique de leurs tendons assez basse. Cette réponse du tissu à l'exercice semble diminuer après la maturité.

Propriétés biomécaniques

L'exercice physique consolide les ligaments et les tendons du genou, mais la variation des techniques d'entraînement et d'évaluation rend l'analyse comparative entre les différentes études assez complexe.

Diverses études ont montré que l'exercice augmente la résistance maximale en tension des complexes os-ligament-os et qui se traduit par une augmentation de la force de séparation [VAILAS et coll., 1981; WOO et coll., 19821. Ceci serait dû à une réponse à l'augmentation de la contrainte appliquée beaucoup plus rapide dans l'os (remodelage) que celle dans la substance ligamentaire.

CABAUD et coll. (1980) ont utilisé des vitesses d'allongement suffisamment élevées (= 3.5 mm/sec) pour que les ruptures se produisent dans la substance du ligament croisé antérieur. Il a démontré, que l'augmentation de la rigidité et de la résistance du LCA après exercice, est due aux changements dans la substance du tissu et non aux effets

sur les sites d'insertions osseuses. WOO et coll. (1982) ont également constaté une augmentation de la rigidité et de la résistance à la rupture des tendons d'animaux entraînés. Des différences importantes existent entre les propriétés mécaniques des tendons entraînés et celles des tissus de contrôle (figure A-9). La contrainte maximale à la rupture augmente après exercice, alors que la déformation maximale diminue (figure A-10).

La durée de l'entraînement semble jouer un rôle important dans l'homéostase du tissu. Un entraînement à court terme n'influence pas beaucoup les propriétés mécaniques et structurales des tendons [WOO et coll., 1982].

Par ailleurs, la fréquence et la durée de l'exercice jouent également un rôle important dans la réponse du tissu. Il semblerait que l'augmentation la plus grande de la résistance et de la rigidité soit produite à partir d'exercices de courte durée (30 min/jour) et de fréquence élevée (6 jours/semaine); et les changements minimes à

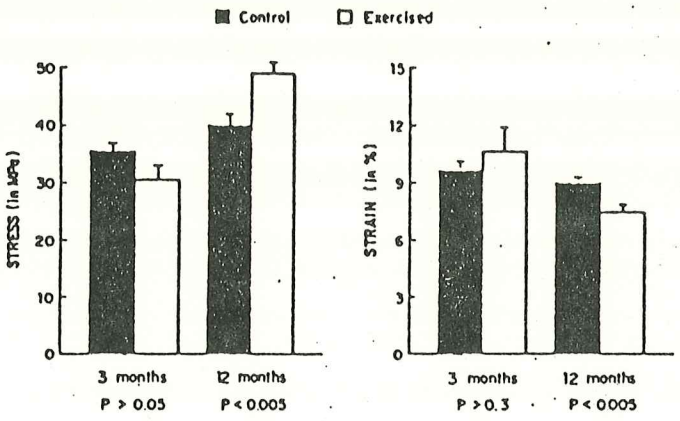


Figure A-10 Comparaison des valeurs ultimes de la contrainte et de la déformation des tendons extenseurs de porc.
(D'après WOO et coll. 1982).

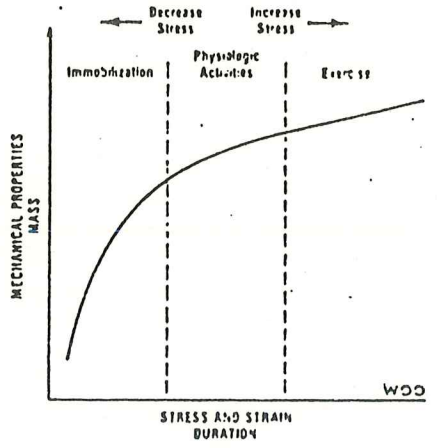


Figure A-11 Courbe non-linéaire représentant les réponses homéostatiques des tissus biologiques mous, et qui dépend du mouvement et de la contrainte.
(D'après WOO, 1982).

partir d'exercices de longue durée et de faible fréquence [CABAUD et coll., 1980]. WOO et coll. (1982) proposent que les réponses homéostatiques des tissus mous soumis à des contraintes physiques peuvent être représentées pour une courbe fortement non-linéaire (figure A-11). La relation entre les niveaux et la durée de la contrainte et du mouvement, et les changements résultants des propriétés biomécaniques et de la masse suivraient une courbe concave vers le bas. La partie centrale de la courbe correspondrait au domaine normal des activités physiologiques.

Après immobilisation ou suppression de la contrainte, une diminution rapide des propriétés du tissu et de sa masse se produirait. Par contre, après un entraînement par exercice ou par augmentation des niveaux de contrainte et de mouvement, les changements résultants ne seront pas aussi importants.

Toutefois, bien que cette hypothèse de nature qualitative permet une description des changements dans les propriétés mécaniques et dans la masse après exercice ou

immobilisation, les phénomènes ne sont pas aussi simples. Pour élucider ces phénomènes, il est nécessaire de comprendre la relation entre, d'une part, la composition, la structure et les interactions, d'autre part, les propriétés biomécaniques et biophysiques des tissus.

(c) Age

Les tissus conjonctifs subissent d'importants changements de composition, de structure et de liaisons inter- et intramoléculaires avec l'âge. Par conséquent, les propriétés biomécaniques se modifient également.

Composition

La teneur totale en collagène du TQR augmente rapidement avec l'âge de 1 à 4 mois, pour atteindre un maximum au bout de 12 mois.

La teneur en élastine du TQR augmente continuellement durant la maturation et le vieillissement.

Ces changements sont mis en correspondance avec les modifications des propriétés biomécaniques avec l'âge, qui seront discutées ultérieurement (figure A-12).

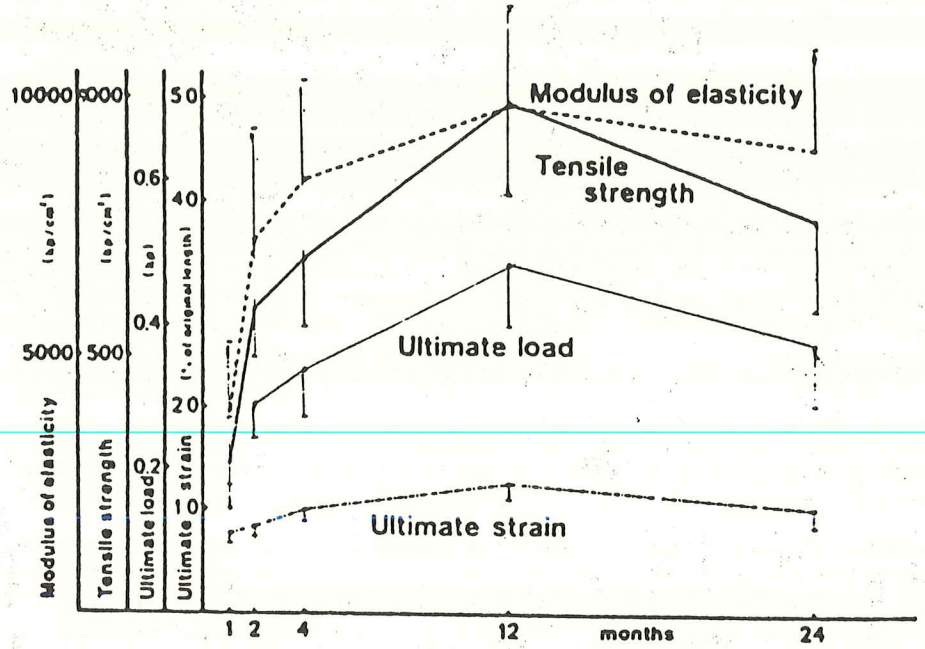
Dans le cas de la peau du rat, la teneur en GAG (notamment en AH), diminue durant la période de maturation pour se stabiliser à l'âge de 12 mois [VOGEL, 1980b].

La teneur cellulaire du tendon étant d'environ 45% à la naissance, diminue à 30% au bout de 0,5 mois, et à 10% au bout de 1,5 mois, pour se stabiliser autour de 3% à la maturité [BETSCH et BAER, 1980].

Structure (morphologie)

Des changements dans la structure hiérarchique du TQR ont été observés avec l'âge.

(a)



(b)

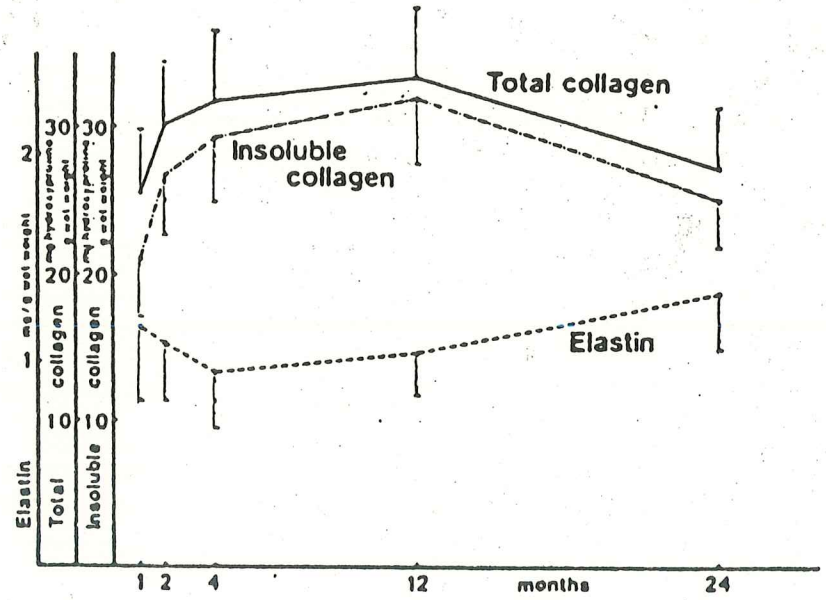


Figure A-12 (a) Évolution avec l'âge des paramètres mécaniques des TQRs.
(b) Évolution avec l'âge des paramètres biochimiques des TQRs.
(D'après VOGEL, 1978).

Le diamètre des fibrilles et des sub-fibrilles de collagène augmente durant la croissance et la maturation. Après maturité, le diamètre de la fibrille ne change pas d'une façon importante.

Les paramètres de l'ondulation du collagène, longueur d'onde et angle d'ondulation, varient avec l'âge (tableau II.1). Les fibrilles foétales du TQR ont des angles d'ondulation variant de 35 à 45° et des longueurs d'onde de 12 µm [GATHERCOLE, 1978b]. Progressivement, l'angle d'ondulation diminue et la longueur d'onde augmente durant la maturation et le vieillissement.

Il semblerait que l'augmentation de la longueur d'onde correspond à l'augmentation de la longueur totale de la queue du rat de sorte que le nombre d'ondulations reste constant (2 000 ± 300) durant la durée de vie de l'animal [BETSCH et BAER, 1980].

Liaisons

Les liaisons réductibles du collagène disparaissent successivement avec la maturation et l'âge.

Dans le tendon fléchisseur humain, la liaison déhydro-HLNL augmente jusqu'à un maximum durant la première période après la naissance, mais diminue ensuite lors de la croissance pour atteindre un minimum à la maturité [FUJI et TANZER, 1974].

Durant la période de croissance post-natale, les fibres de collagène, nouvellement formées, forment des liaisons aldimines inter-moléculaires, déduites d'aldéhydes, et qui servent à renforcer les fibres et à fournir un certain degré de stabilité à la matrice. Presqu'aussitôt après, ces liaisons commencent à être remplacées par des liaisons plus stables, non encore caractérisées, et qui augmentent la résistance mécanique de la matrice et la rendent quasiment insoluble [LIGHT et BAILEY, 1980b].

Chez l'homme, les liaisons réductibles disparaissent entre l'âge de 17 et 20 ans [KEMPSON, 1982].

La structure des liaisons inter-moléculaires stables qui remplacent les liaisons réductibles lors de la maturation n'est pas encore connue.

Toutefois, il semblerait que ce processus de permutation s'effectue par stabilisation des liaisons réductibles grâce à un certain mécanisme inconnu et qui pourrait être une réaction de réduction ou d'oxydation [LIGHT et BAILEY, 1980b].

En effet, deux types de liaisons stables ont été isolées IN VITRO, et suggérées comme étant des produits de réduction présents IN VIVO:

- l'hydroxy-aldol__histidine, une liaison trifonctionnelle stable formée d'hydroxyallysine, d'allysine et d'histidine (figure A-13).

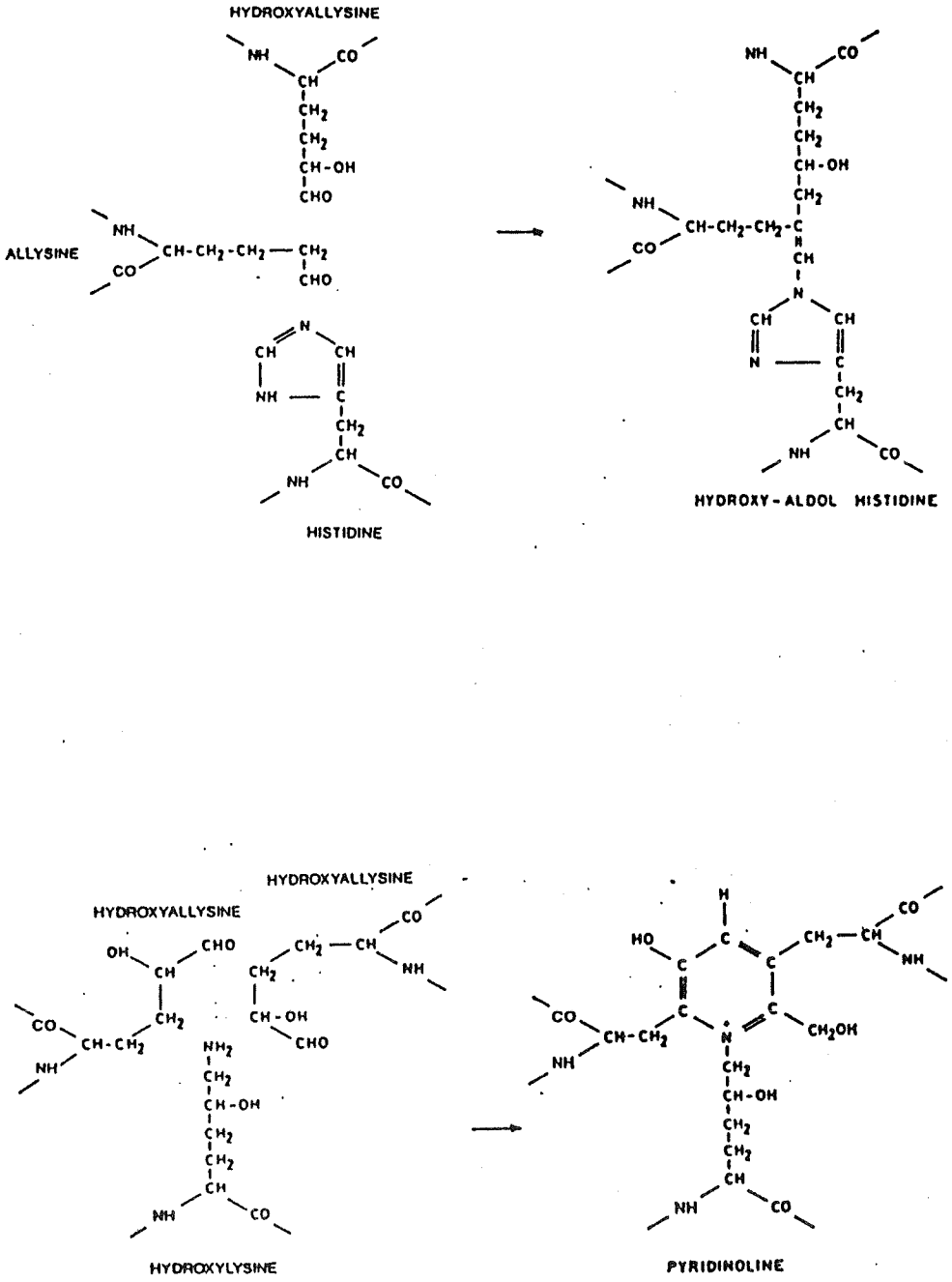


Figure A-13 Structures chimiques des liaisons stables du collagène:

(a) Hydroxy-aldol-histidine.

(b) Pyridinoline.

(D'après LIGHT et BAILEY, 1980).

- la pyridinoline, une liaison trifonctionnelle résultant de la combinaison d'un aldéhyde d'hydroxylysine d'une chaîne α avec une liaison aldimine réductible existant entre les deux autres chaînes α.

Dans les tendons d'Achille bovins, la pyridinoline est la liaison finale, et jouerait un rôle important dans la liaison fibrille-fibrille de collagène [TANZER et WAITE, 1982].

Par ailleurs, les liaisons réductibles peuvent être stabilisées par une oxydation spontannée. Des études in vitro ont montré une stabilisation accrue du collagène en présence d'oxygène [VIIDIK et coll., 1982].

Il semblerait, par conséquent, que dans un ligament mature, les microfibrilles de collagène soient couplées l'une à l'autre par des liaisons multivalentes et stables. On ignore, cependant, si une certaine composante du ligament

(élastine, PG-s) participe à l'assemblage des microfibrilles en fibrilles.

Des liaisons inter-fibrillaires et inter-fasciculaires de nature plus complexe peuvent être présentes également. A présent très peu de choses sont connues sur ces liaisons [TANZER et WAITE, 1982].

Propriétés biomécaniques

Du point de vue mécanique, il ne semble pas y avoir de différence de résistance en tension entre la liaison kéto-imine et la liaison aldimine.

La réduction *in vitro* des liaisons déhydro-HLNL et HLONL, par du borohydrure de sodium, en des liaisons plus stables du point de vue physico-chimique, ne modifie pas les propriétés mécaniques du collagène [VIIDIK et coll., 1982]. Cependant, l'influence de cette conversion des liaisons réductibles en liaisons stables non-réductibles reste inconnue *in vivo*.

Nous avons vu précédemment que les courbes contrainte-déformation des tendons et des ligaments présentent quatre régions principales. Le module "d'élasticité" déterminé à partir de la région de contrainte linéaire, augmente rapidement avec l'âge durant les trois premiers mois (figure A-14).

Ce résultat est prévisible étant donné que la déformation dans la région linéaire est dominée par les fibrilles de collagène. Les changements du diamètre des fibrilles (structure) qui se produisent durant la maturation, sont responsables de cette augmentation du module [SHAH et coll., 1979]. Après maturité, le diamètre des fibrilles n'augmente plus, et par conséquent, le module devient indépendant de l'âge [HUBBARD et coll., 1984]. Par contre, la contrainte de rupture augmente constamment durant cette période. Cette augmentation de la résistance à la rupture se produit donc durant la période où il n'y a plus d'augmentation du diamètre des fibrilles de collagène, mais,

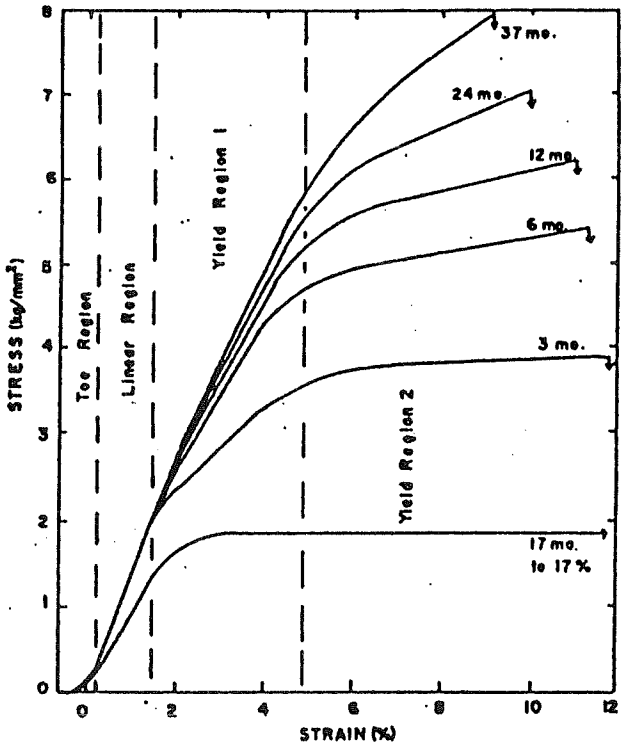


Figure A-14 Comportement contrainte-déformation du TQR comme une fonction de l'âge.
(D'après BETSCH et coll. 1980).

par contre, où il se produit un changement des liaisons réductibles en liaisons stables.

On peut noter, par ailleurs, que le "module" apparent, dans les régions de déformation plastique de la courbe contrainte-déformation, augmente avec l'âge. BETSCH et coll. (1980) attribuent ces changements à l'augmentation des interactions inter-fibrillaires par l'intermédiaire des liaisons, et qui empêche (ou retarde) le principal mécanisme d'endommagement (dissociation des fibrilles).

Par conséquent, durant le processus de maturation, la résistance des ligaments et des tendons augmente. Par contre, la composante plastique du comportement de ces tissus diminue, c'est-à-dire que leur performance mécanique s'améliore.

Les travaux de VOGEL (1978, 1980) confirment ces résultats. Les paramètres indiquant la résistance et l'élasticité du tissu mou (charge ultime, résistance ultime,

déformation ultime et le module d'élasticité), augmentent rapidement durant le processus de maturation (1 à 12 mois chez le rat), et diminuent lors de la sénescence (figure A-12). La teneur en collagène présente la même évolution que celle des paramètres mécaniques. Elle atteint un maximum à 12 mois dans le TQR. Par contre, la teneur en élastine continue à augmenter même après maturité, alors que le "module" d'élasticité diminue durant cette période.

Par conséquent, les changements des paramètres de résistance et d'élasticité corrèlent bien avec les changements de la teneur en collagène mais pas avec ceux de l'élastine ou des GAG-s [VOGEL, 1978a].

Le coefficient de relaxation, qui reflète le comportement viscoélastique du tissu, diminue beaucoup durant la maturation, et continue à décroître lentement durant la sénescence dans le cas de la peau du rat. Les changements de la teneur en GAG, spécialement de l'acide

hyaluronique, corrèlent avec ce changement des paramètres indiquant la viscosité du tissu [VOGEL, 1980a].

Par ailleurs, les phénomènes de plasticité qui se produisent après un chargement transitoire, sont indépendants de l'âge. Le rapport entre l'énergie dissipée et l'énergie fournie dans des expériences d'hystérésis, n'est presque pas influencé par l'âge [VOGEL, 1978b, 1980a; HUBBARD et coll., 1984].

Les courbes contrainte-déformation montrent que le comportement mécanique dépend plus de l'âge pour des faibles extensions. La contrainte et le module d'élasticité aux faibles degrés d'extension, diminuent lors de la maturation et augmentent durant la sénescence, exactement l'inverse des changements observés aux degrés d'extension élevés [VOGEL, 1980b].

Ces résultats montrent que les changements de la plupart des paramètres mécaniques aux degrés d'extension élevés durant la maturation peuvent être expliqués par une

augmentation des liaisons du collagène. Les autres phénomènes tels que les changements aux faibles degrés d'extension ou les paramètres de plasticité ne peuvent être expliqués sur cette base.

(d) Hormones et autres drogues desmotropiques

Les glucocorticoïdes tels que le cortisol ou le prédnisolone sont utilisés habituellement dans le traitement des blessures des articulations et des tendons. Ces hormones peuvent influencer les propriétés biomécaniques et biochimiques des tissus conjonctifs [BUTLER et coll., 1978; VOGEL, 1982].

Composition

Un traitement aux corticostéroïdes (cortisol, prédnisolone) à court et à long terme, des ligaments et des tendons, ne modifie pas leur teneur en collagène. Par contre, une diminution du poids séché de ces tissus a été observés après un traitement à long terme [OXLUND et coll.,

1980, 1981; OXLUND et MANTHORPE, 1982]. Il est possible donc, qu'une diminution des autres substances non-collagéniques se produise.

Par ailleurs, VOGEL (1982) a observé que le traitement aux corticostéroïdes augmente la teneur en collagène insoluble.

Liaisons

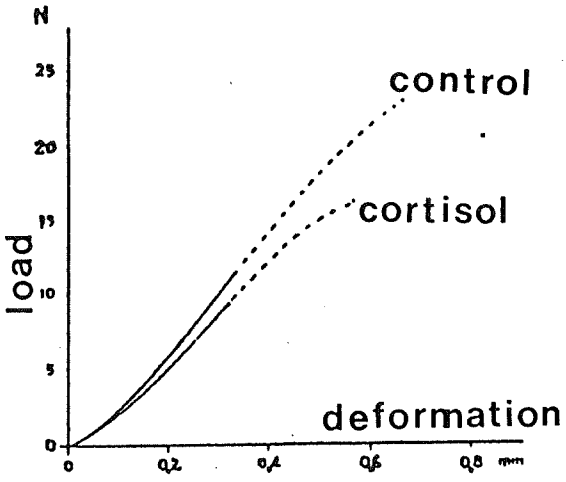
Un traitement au cortisol et au prédnisolone, à des doses modérées, augmente la stabilité thermique des fibres de collagène des tendons et des ligaments [VIIDIK, 1979; OXLUND, 1980a]. Le mécanisme de cette stabilisation du tissu n'est pas clair, mais il est probable que les corticostéroïdes accélèrent le processus de conversion des liaisons réductibles en liaisons stables.

Propriétés biomécaniques

OXLUND (1980a) a étudié l'influence d'une injection de cortisol sur les propriétés des tendons et des ligaments de rat. Après ce traitement, la résistance (charge maximale) du complexe os-ligament croisé postérieur-os diminue (figure A-15).

Dans ce cas, la rupture du complexe se produit toujours à l'une des insertions osseuses. Ce résultat s'explique par le fait que les glucocorticoïdes peuvent inhiber la biosynthèse du collagène, et accroître ainsi la résorption de l'os. Le temps du renouvellement métabolique du collagène de l'os (4 à 40 jours) est inférieur à celui du ligament (> 110 jours). Par conséquent, l'inhibition de la synthèse du collagène et l'augmentation dans le catabolisme de l'os durant le traitement au cortisol sont suffisants pour affaiblir la résistance des insertions osseuses du ligament.

(a)



(b)

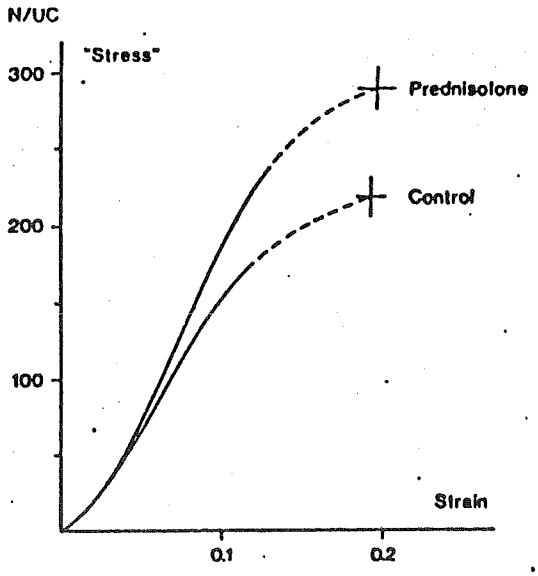


Figure A-15 (a) Courbes force-déformation du ligament croisé postérieur de rat. Le ligament de contrôle a subit une injection de solution de saline, et le ligament traité a subit une injection de 20 mg de cortisol/kg.

(b) Diagrammes«contrainte»-déformation des tendons du péroné de lapin. La «contrainte» est calculée comme une force par mg de collagène par mm de longueur du spécimen (UC).

(D'après OXLUND et coll. 1981).

Dans le cas d'un traitement local au cortisol, la résistance et la rigidité des tendons augmentent.

De même, un traitement à court ou à long terme au prédnisolone augmente les paramètres mécaniques tels que la rigidité élastique, la "contrainte" maximale et l'énergie relative de rupture des tendons de lapin (figures A-15 et A-16).

Les propriétés visqueuses de tendons ne sont pas influencées par un traitement, à court ou à long terme, au prédnisolone. Cependant, la déformation plastique résiduelle diminue peu à court terme, et d'une façon importante après un traitement à long terme [OXLUND et coll., 1981; OXLUND et MANTHROPE, 1982].

Ce changement des propriétés biomécaniques serait dû à l'augmentation de la stabilité des fibres de collagène, c'est-à-dire à une modification des liaisons inter-moléculaires du collagène.

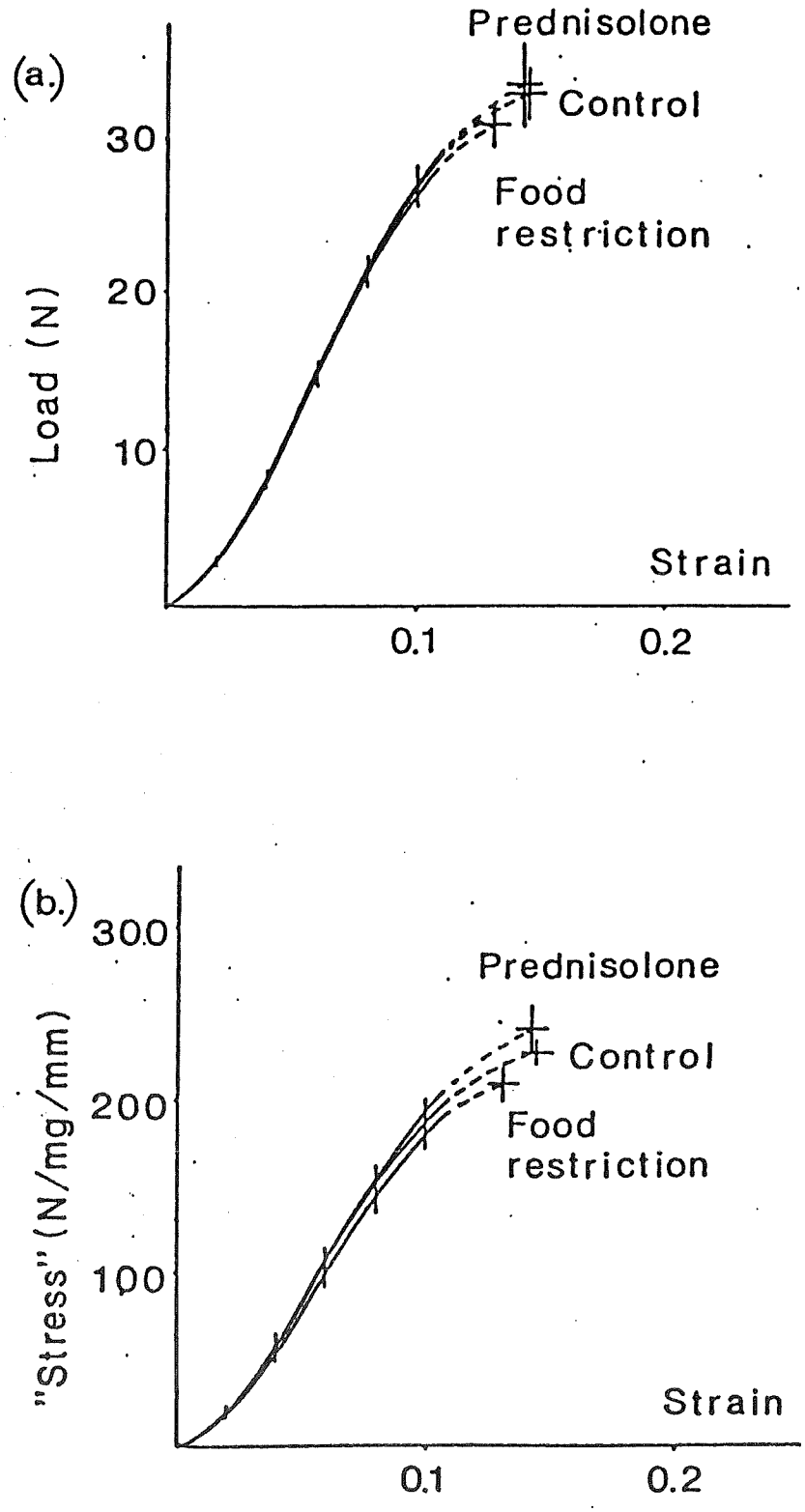


Figure A-16 (a) Courbe force-déformation.

(b) Courbe «contrainte»-déformation du tendon du péroné. Les barres verticales indiquent l'écart-type.

(D'après OXLUND et coll. 1982).

3.2 Modifications IN-VITRO

Il est à noter que les effets du milieu environnant (déshydratation, pH, résistance ionique), par leur influence sur les vitesses des processus moléculaires de déformation et de réarrangement, s'avèrent non négligeables dans le comportement rhéologique des tissus mous.

(a) Influence de la déshydratation

Les tissus conjonctifs peuvent être considérés comme des matériaux diphasiques, constitués d'une matrice organique de collagène, GAG-s, élastine, cellules et lipides dispersés dans un fluide interstitiel qui constitue environ 80% du poids total du tissu. Toutefois, cette hydratation peut être modifiée par des facteurs électrostatiques le long des macromolécules de collagène et des GAG-s [ELDEN, 1964].

ALFREY et coll. (1957) ont montré que le comportement contrainte-déformation des protéines dépend du degré d'hydratation. De même, BETSCH et BAER (1980) ont

observé des différences considérables dans la réponse du TQR, notamment une disparition de la région initiale non-linéaire, après une déshydratation partielle ou complète (figure A-17). Ainsi, des tendons déshydratés à 15% d'eau peuvent atteindre des valeurs de contrainte et de déformation à la rupture de 40 kg/mm^2 et de 20% respectivement (figure A-17). Ces valeurs excèdent les estimations maximales des fibrilles de collagène individuelles qui sont de 15 à 30 kg/mm^2.

Ces modifications peuvent s'expliquer, d'une part, par le fait que l'eau liée à l'acide hyaluronique constitue le principal lubrifiant des tissus mous. Une diminution de la concentration en eau peut altérer la plasticité de la matrice, provoquer un frottement fibrille-fibrille de collagène, et favoriser la formation de liaisons ou d'adhésions entre les fibrilles adjacentes [AKESON et coll., 1980].

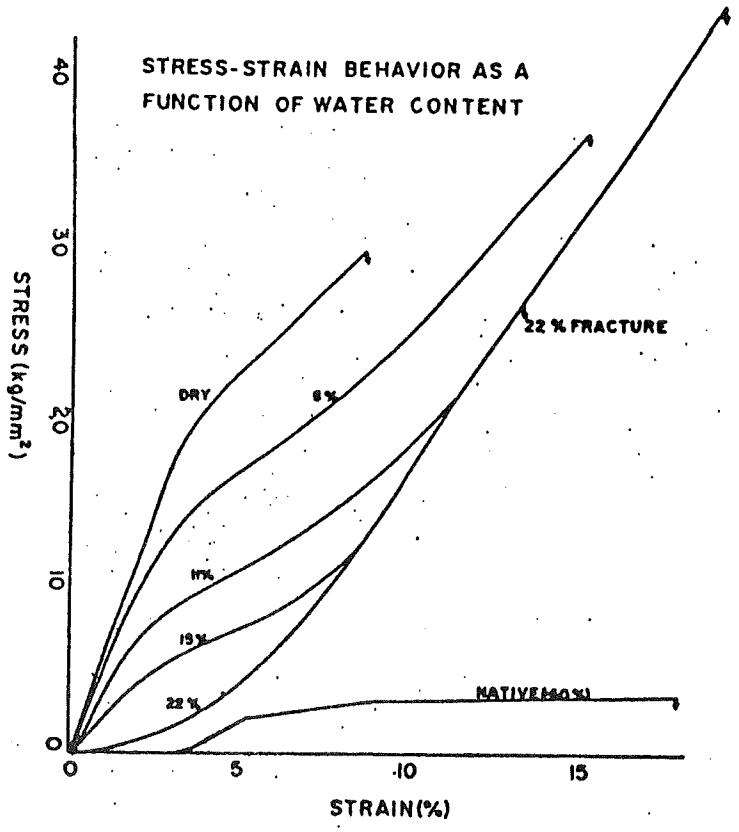


Figure A-17 Comportement contrainte-déformation du TQR en fonction de la teneur en eau du tissu.
(D'après BETSCH et BAER, 1980).

D'autre part, nous verrons dans le paragraphe suivant que l'élastine joue un rôle important dans la région initiale de la courbe. Par ailleurs, plusieurs chercheurs ont montré que l'élastine doit ses propriétés élastiques à la présence de l'eau [SANDBERG et coll., 1976 et 1981]. En absence de l'eau, elle devient comme un solide rigide et vitreux, où l'énergie élastique est emmagasinée entièrement dans les variations d'énergie interne dues à la déformation des liaisons chimiques.

GOSLINE et FRENCH (1979) ont montré que la transition vitreuse de l'élastine est très sensible à la teneur en eau. Leurs résultats suggèrent que sous des conditions physiologiques, une perte de seulement 10% d'eau liée augmente la température de transition vitreuse d'environ 20°. Par conséquent, une déshydratation des ligaments et des tendons modifie la structure et les liaisons de l'élastine [TAMBURRO, 1981] et par suite ses propriétés physiques.

(b) Influence du pH

Les changements de pH du milieu environnant influencent aussi les propriétés mécaniques des tissus mous. BAILEY (1968) a rapporté que la résistance à la rupture du TQR diminue beaucoup après incubation à un pH non physiologique (acide ou basique). De plus, cette sensibilité des propriétés mécaniques au pH dépend beaucoup de l'âge. VIIDIK (1980) a montré, sur des tendons de jeunes rats, que la déformation maximale augmente lorsque le pH diminue, alors que pour des tendons de vieux rats, elle varie dans le même sens.

Tous les autres paramètres mécaniques (résistance à la rupture, rigidité élastique, énergie de rupture), diminuent lorsque le pH diminue, et ceci indépendamment de l'âge.

(c) Influence de l'environnement ionique

Bien que la composition de l'environnement ionique peut influencer le comportement des tissus mous, ce facteur a été très peu étudié. En examinant l'influence de petits ions organiques sur le comportement de relaxation de contrainte du cartilage articulaire, GRODZINSKY et coll. (1983) ont observé que des additions de NaCl et de $CaCl_2$ produisent une décroissance monotone du niveau d'équilibre de la contrainte.

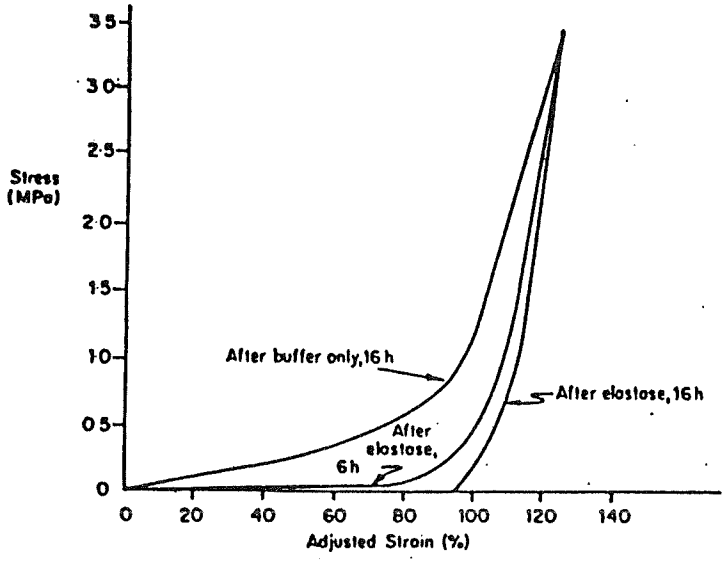
Récemment, GREENBERG et coll. (1984) ont montré que le comportement viscoélastique des tissus conjonctifs est particulièrement sensible à l'environnement ionique. Par conséquent, les interactions entre les ions de la solution et les liaisons intermoléculaires semblent jouer un rôle important dans les propriétés des tissus mous.

(d) Digestion enzymatique

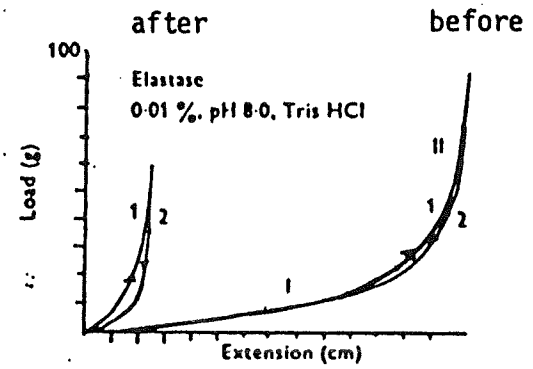
L'évaluation de l'influence des différentes composantes sur les propriétés mécaniques du collagène, qui est la composante prédominante des tendons et des ligaments, et responsable de leur stabilité mécanique, peut être effectuée après retrait des diverses composantes à l'aide d'enzymes.

Elastase

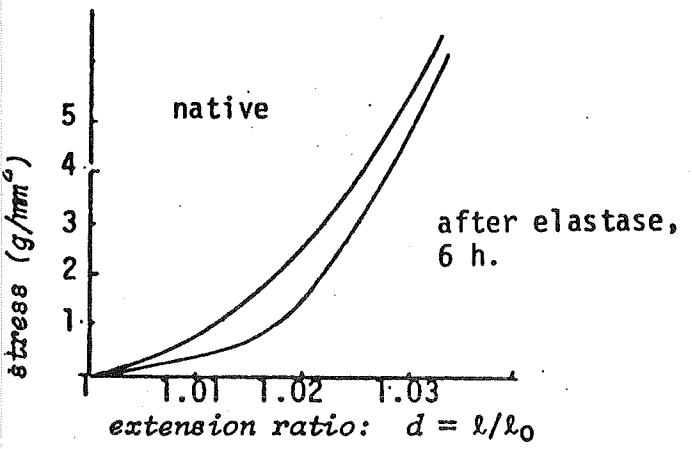
Les ligaments et les tendons articulaires contiennent très peu d'élastine. L'influence de l'élastine a été étudiée surtout dans des ligaments bovins de la nuque [HOFFMAN et coll., 1973]. La rigidité du tissu augmente après la digestion enzymatique de l'élastine. Une diminution de la région initiale de la courbe contrainte-déformation a été également observée (figure A-18).



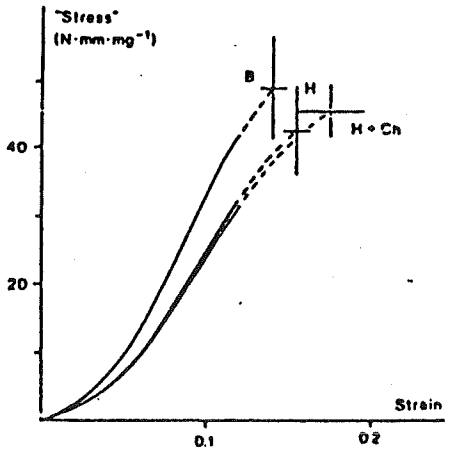
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure A-18 (a) Comportement contrainte-déformation du ligament de la nuque bovin, avant et après élastase.
(D'après GIBSON, 1973; cité par HOFFMAN, 1980).

(b) Courbe force-allongement avant et après élastase, du tendon de l'aile de volaille.
(D'après OAKES et BIALKOWER, 1977).

(c) Courbe contrainte-rapport d'allongement avant et après élastase, du tendon de la patte arrière de chien.
(D'après MISSIRILIS, 1977).

(d) Courbe«contrainte»-déformation du TQR après incubation dans un tampon (B); du hyaluronidase (H), Sigma, 100 U/ml, 6 heures, à pH.05.4 37°C; et du hyaluronidase suivi de chondroïtinase ABC. La«contrainte» est exprimée en Newton par mg de collagène par mm de longueur de spécimen.
(D'après VIIDIK, 1982).

MISSIRILIS (1977) a montré que dans le cas des tendons de la patte arrière de chien, contenant peu d'élastine, la courbe contrainte-allongement ne change pas beaucoup après élastase.

Cependant, la spécificité de l'enzyme utilisée peut influencer les résultats. OXLUND et ANDREASSEN (1980b) ont trouvé que l'élastase affecte les propriétés mécaniques du collagène reconstitué. De même, BADER et coll. (1981) ont constaté que l'élastase peut dégrader les peptides terminaux non-hélicoïdaux du cartilage, et rompre les principales liaisons inter-moléculaires des fibrilles de collagène. L'addition de certains inhibiteurs à la solution enzymatique peut empêcher cette activité collagénalytique de l'élastase [VIIDIK et coll., 1982]. De même, un faible rapport enzyme/substrat (0,05 à 0,1) est recommandé pour minimiser les effets des impuretés enzymatiques non-spécifiques [HOFFMAN, 1980a et b].

Digestion des protéoglycannes

Des expériences de digestion enzymatique des GAG-s du tendon de la queue du rat à l'aide du hyaluronidase et de la chondroïtinase ABC ont été effectués récemment par VIIDIK et coll. (1982). L'évaluation de la teneur en acide uronique avant et après incubation, a montré des diminutions de 53% (avec l'hyaluronidase) et de 50% (avec la chondroïtinase ABC).

Des essais de traction après enzymolyse révèlent que les courbes contrainte-déformation tendent à devenir moins raides, c'est-à-dire la rigidité du tissu diminue (figure A-18 d).

Des essais de relaxation de contrainte après incubation dans ces enzymes pourraient révéler des changements plus importants.

Collagènase

HOFFMAN et coll. (1973) ont montré que les fibres de collagène sont responsables de la portion finale de la courbe contrainte-déformation des ligaments de la nuque.

OXLUND et coll. (1980) ont trouvé que le collagène de l'aorte contribue également à la résistance mécanique dans la région de faible déformation, même si les caractéristiques mécaniques de cette région sont déterminées principalement par l'élastine. Une perte importante d'extensibilité se produit dans les spécimens aortiques après collagènase. Celle-ci serait reliée à la suppression d'une interaction morphologique entre les fibres de collagène et d'élastine.

Toutefois, les détails d'une telle interaction ne sont pas encore mis en évidence ni dans l'aorte, ni dans les tendons et les ligaments.

3.3 Discussion

L'analyse des résultats de ces différentes études, révèle l'existence de corrélation entre les changements de la structure interne, et les propriétés mécaniques des ligaments et des tendons.

Après immobilisation, la diminution de la quantité, de la taille et de l'arrangement du collagène corrèle avec la diminution des paramètres de résistance et de rigidité élastique. Par contre, la diminution de la concentration en eau et en GAG, c'est-à-dire du principal lubrifiant inter-fibrillaire, ne corrèle pas avec la diminution de la rigidité.

Après un entraînement physique, l'augmentation de la résistance et de la rigidité des ligaments et des tendons est en accord avec l'augmentation de la masse et du nombre de fibres de collagène.

Les changements avec l'âge démontrent l'existence de corrélation entre successivement, l'augmentation du diamètre des fibrilles de collagène et l'accroissement du module "d'élasticité" durant le processus de maturation; l'augmentation de la contrainte de rupture et la conversion des liaisons réductibles en liaisons stables après maturité; les changements de la teneur en collagène et ceux des paramètres de résistance et de rigidité et enfin entre les modifications de la teneur en GAG et celles des propriétés viscoélastiques. Par ailleurs, l'augmentation continuelle de la teneur en élastine avec l'âge, corrélerait bien avec la diminution de la rigidité du tissu observée dans la région initiale de la courbe contrainte-déformation. Il est probable également que cette diminution de la rigidité, dans la région de faibles extensions, soit reliée à une diminution de la concentration en dermatane sulfate avec l'âge. En effet, DANIELSEN (1982) a montré que l'addition "in vitro" de dermatane sulfate, à des concentrations de l'ordre de 1%, augmente la rigidité initiale.

La corrélation des changements des paramètres de plasticité avec l'âge est encore controversée. BETSCH et coll. (1980) trouvent une augmentation avec l'âge du module "apparent" dans la région de déformation plastique, et celle-ci corrélerait avec l'augmentation des interactions inter-fibrillaires par l'intermédiaire des liaisons. Par contre, VOGEL (1980) trouve que les changements des paramètres de plasticité ne corrèlent pas avec l'augmentation des liaisons du collagène.

Après un traitement in vivo aux corticostéroïdes, l'augmentation des paramètres mécaniques (résistance, rigidité et énergie de rupture) est en accord avec l'accroissement de la stabilité du collagène, c'est-à-dire avec l'accélération de la conversion des liaisons réductibles en liaisons stables. Cependant, le manque d'information sur les modifications biochimiques induites par ce traitement, ne permet pas de corréler la diminution de la déformation plastique résiduelle.

Après digestion enzymatique in vitro, la corrélation entre la composition biochimique et les propriétés biomécaniques est mieux mise en évidence. L'élastine, l'eau et les PGs semblent jouer un rôle important dans la réponse initiale des ligaments et des tendons. Une diminution de la teneur de ces composantes provoque une réduction de la région initiale de comportement non-linéaire. Le collagène est responsable de la région de comportement linéaire des ligaments et des tendons. Une disparition du collagène entraîne une détérioration de toutes les propriétés mécaniques.

Les PGs contribuent à la lubrification du tissu, par conséquent une digestion enzymatique de ces macromolécules augmente sa rigidité.

La corrélation des liaisons biochimiques avec les propriétés mécaniques des tissus mous a été étudiée en utilisant des substances chimiques capables de briser ou de stabiliser les liaisons inter-moléculaires. Le

D-penicillamine et la β-aminopropionitrile peuvent inhiber d'une façon irréversible, IN VIVO et IN VITRO, l'oxydase lysyl, et donc empêcher la formation des liaisons. VIIDIK (1980b) a montré que ces substances diminuent la résistance mécanique des tissus. Il a observé également qu'une réduction au borohydrure du collagène à pH: 7,4 augmente la résistance et l'extensibilité dans le cas de jeunes tendons, alors que celle-ci n'a aucune influence sur les propriétés mécaniques de tendons matures. Ces changements sont corrélés à la stabilisation, par le borohydrure, des liaisons aldimines dans les jeunes tendons.

Ces résultats montrent que plusieurs facteurs peuvent induire des modifications de la substance tissulaire, c'est-à-dire du matériau, des ligaments et des tendons. A l'échelle microscopique, ces modifications se traduisent par des changements biochimiques (composition, liaisons), et/ou des changements microstructuraux (morphologie, dimensions, architecture) des différentes composantes du tissu. A l'échelle macroscopique, elles sont

reflétées par des changements de propriétés mécaniques du tissu. Il existe, par conséquent, comme dans le cas de matériaux non biologiques, une interdépendance entre la microstructure et les propriétés mécaniques. Toutefois, ce qui caractérise les tissus vivants, en particulier les ligaments et les tendons, c'est leur capacité d'adaptation aux nouvelles demandes fonctionnelles [TARDIEU et coll., 1983]. A des changements de sollicitations biomécaniques, le tissu répond par des modifications microstructurales et biochimiques. Le temps de réponse du tissu n'est pas encore bien compris. En effet, le matériau tissulaire étant un composite, le temps de renouvellement métabolique de chaque constituant est différent. Celui du collagène des tendons et des ligaments est d'environ 110 jours [OXLUND et coll., 1980], alors que celui de l'élastine est beaucoup plus court [DAMIANO et coll., 1981]. Le renouvellement métabolique des composantes non-collagéniques de la matrice serait donc plus rapide, et on peut s'attendre à des modifications de la matrice avant celle du collagène. A l'échelle macroscopique, ceci se traduirait par des changements plus rapides des propriétés viscoélastiques. Malheureusement, dans la plupart

des travaux, les ligaments et les tendons sont considérés comme des matériaux collagéniques, et par conséquent, seules les propriétés élastiques et de résistance ont été analysées.

APPENDICE B

Préparation des solutions de fixation

Tampon d'approvisionnement (TA)

- 4,28 g de cacodylate de sodium par 100 ml d'H_2O distillée = TA à 0.2 M

- Ajuster le pH à 7,45 avec Hcl ou NaOH.

Tampon de lavage (TL)

- Diluer 1 volume de TA dans 1 volume d'H_2O distillée = TL à 0.1 M

- Ajouter 5% de sucrose

- Ajouter 0,5 mg de $CaCl_2$ par ml de solution pour stabiliser les membranes

- Ajuster le pH à 7,45.

Fixatif glutaraldéhyde (GA)

- Prendre un volume de GA à 4%

- Ajouter un volume égal de TA à 0.2 M

- On obtient du GA à 2%

- Puis ajouter le pH à 7,45.

Fixatif tétroxyde d'osmiun (O_sO_4)

- O_sO_4 à 1% à diluer dans du TA à 0.1 M.

APPENDICE C

PREPARATION DES COUPES MINCES POUR LA MET

a. Fixation

Immédiatement après la mort de l'organisme, le spécimen est excisé puis plongé dans le fixateur et découpé ensuite en tranches de 1 mm^3 de façon à limiter les changements post-mortem.

b. Rinçage

Les spécimens sont rincés au tampon phosphate 0.1 M + sucrose, à pH = 7,21, pendant 3 fois 15 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite transférés dans du tampon veronal-acétate à pH = 7,4 pour la nuit à 4°C.

c. Post-fixation à l'acide osmique

Une post-fixation de 1 heure à 4°C, est par suite effectuée avec de l'O_5O_4 à 1% dans un tampon veronal-acétate à pH = 7,4.

d. Déshydratation

Les spécimens sont ensuite déshydratés successivement dans:

- Ethanol: 30% - 50% - 70% à 4°C durant 10 min.
- Ethanol: 80% - 95% - 100% à température ambiante durant 10 min.
- Ethanol anhydre: 3 X 100%, pendant 10 min. chaque fois
- Oxyde de propylène: 3 X 100%, 10 min. chaque fois

e. Enrobage dans l'araldite 502

On utilise l'araldite 502 fraichement préparée (voir appendice D). On prépare un mélange d'oxyde de propylène - araldite 502 (1V/1V) durant 1 heure à température ambiante sous agitation constante, avec fiole fermée. Ensuite, on ajoute de l'araldite pour porter le mélange oxyde de propylène-araldite à (1V/2V); on laisse agiter, avec fiole ouverte, toute la nuit. Les spécimens sont ensuite transférés dans le mélange. Les capsules d'enrobage sont conservées à l'étuve à 45°C ou 60°C au moins 24 heures avant usage.

f. Polymérisation

On laisse ensuite polymériser à 3 températures:

37°C - 1 jour (7 jours)

45°C - la nuit - 1 jour

60°C - 1 jour - quelques jours

Les blocs sont récupérés, marqués et préparés pour la coupe ultrafine après refroidissement à la température ambiante.

g. Ultramicrotomie

Les coupes sont réalisées à l'ultramicrotomie LKB III, équipé d'un couteau en diamant (Jumdi Special Diamond Knife).

Les coupes d'épaisseur variant de 60 à 80 nm, sont recueillies sur des grilles (en nickel) recouvertes d'une membrane support (carbone).

h. Coloration des coupes

Les sections récupérées sur grille sont mises à flotter sur une goutte d'acétate d'uranyle à l'abri de la lumière pendant 5 minutes. Après un rinçage à l'eau bidistillée, elles sont transférées sur du citrate de plomb pendant 7 minutes en présence de NaOH pour éviter les

précipitations du citrate de pb qui réagit avec le CO_2 de l'air.

APPENDICE D

Préparation de la solution araldite - DDSA

- Peser 77g de DDSA dans une bouteille de 240 cc ou un bécher en plastique

- Ajouter 100 g d'araldite 502 W.P.E. 242 .

- Fermer la bouteille et secouer vigoureusement pour s'assurer de l'homogénéité de la solution

Si le W.P.E. (poids par équivalent d'époxide) de la résine varie d'une bouteille à l'autre, utiliser la table ci-dessous pour déterminer le poids de l'anhydridre requis:

Araldite 502 W.P.E.	Araldite 502 poids en g	DDSA poids en g	Poids total DDSA + araldite 502
232-234	100	80	180
235-237	100	79	179
238-240	100	78	178
241-243	100	77	177
244-246	100	76	176
247-249	100	75	175
250	100	74	174

Mélange complet de la résine

Ajouter 0.15 cc de DMP-30 par 10 g de solution d'araltide 502 - DDSA utilisant des seringues graduées disposables. Fermer la bouteille de DMP-30 immédiatement après usage pour éviter l'évaporation de la solution et la respiration des vapeurs qui peuvent en résulter. Mélanger la solution DDSA-araldite DMP-30 vigoureusement au moins pendant 5 minutes.

Polymérisation

La résine peut être gardée toute la nuit à 60°C ou on peut utiliser de préférence les étapes suivantes:

1er jour: polymérisation toute la nuit à 45°C

2e jour: polymérisation pendant 24 heures à 60°C

3e jour: enlever les blocs de l'étuve

Nettoyage

Plastisolve [23] est un solvant pratique pour les époxys et les polyesters de résine. Met-a-terge [24] est aussi pratique pour les époxys non polymérisés et les polyesters de résine. L'acetone peut aussi servir. Tous sont pratiques pour tenir le milieu de travail propre.

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL
3 9334 00289340 0