



**HAL**  
open science

# Mise au point d'un modèle de renfort ligamentaire endocapsulaire chez le rat

Diane Pichard

► **To cite this version:**

Diane Pichard. Mise au point d'un modèle de renfort ligamentaire endocapsulaire chez le rat. Médecine vétérinaire et santé animale. 2020. dumas-04779939

**HAL Id: dumas-04779939**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04779939v1>**

Submitted on 13 Nov 2024

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

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

Copyright

Année 2020

# MISE AU POINT D'UN MODÈLE DE RENFORT LIGAMENTAIRE ENDOCAPSULAIRE CHEZ LE RAT

**THÈSE**

pour obtenir le diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 16 juillet 2020

par

**Diane, Marie, Suzanne PICHARD**

sous la direction de

**Véronique VIATEAU**

et avec la participation en tant qu'invitée de

**Émeline MAURICE**

**Président du jury :** M. Nicolas DE PROST

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

**1<sup>er</sup> Assesseur :** Mme Véronique VIATEAU

Professeur à l'EnvA

**2<sup>ème</sup> Assesseur :** Mme Eve LALOY

Maître de Conférences à l'EnvA





## Liste des membres du corps enseignant



Directeur : Pr Christophe Degueurce  
 Directeur des formations : Pr Henry Chateau  
 Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin  
 Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Morailon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

### Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC) Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

<p><b>Unité pédagogique d'anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Fernandez Parra Rocio, Maître de conférences associée</li> <li>- Pr Verwaerde Patrick*</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de clinique équine</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pr Audigé Fabrice</li> <li>- Dr Bertoni Léila, Maître de conférences</li> <li>- Dr Bourzac Céline, Chargée d'enseignement contractuelle</li> <li>- Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier</li> <li>- Pr Denoix Jean-Marie</li> <li>- Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier</li> <li>- Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier</li> <li>- Dr Mespouilhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier*</li> <li>- Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier</li> <li>- Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences</li> <li>- Pr Blot Stéphane*</li> <li>- Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences</li> <li>- Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier</li> <li>- Dr Maurey-Guénéac Christelle, Maître de conférences</li> </ul>	<p><b>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel</li> <li>- Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences</li> <li>- Pr Grandjean Dominique*</li> <li>- Dr Hoummady Sara, Chargée d'enseignement contractuelle</li> <li>- Dr Maenhout Cindy, Praticien hospitalier</li> <li>- Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences</li> <li>- Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticien hospitalier</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Decambon Adeline, Maître de conférences</li> <li>- Pr Fayolle Pascal</li> <li>- Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences</li> <li>- Pr Viateau-Duval Véronique*</li> </ul> <p><b>Discipline : cardiologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pr Chetboul Valérie</li> <li>- Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier</li> </ul> <p><b>Discipline : ophtalmologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Chahory Sabine, Maître de conférences</li> </ul> <p><b>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier</li> <li>- Dr Volait Laetitia, Praticien hospitalier</li> </ul>
---	---

### Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP) Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

<p><b>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Bolnot François, Maître de conférences</li> <li>- Pr Carlier Vincent</li> <li>- Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associée</li> <li>- Dr Mîmet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel</li> <li>- Pr Dufour Barbara*</li> <li>- Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia</li> <li>- Dr Rivière Julie, Maître de conférences</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pr Adjou Karim</li> <li>- Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences*</li> <li>- Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associée</li> <li>- Pr Millemann Yves</li> <li>- Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier</li> <li>- Dr Ravary-Plumioën Bérange, Maître de conférences</li> </ul>	<p><b>Unité pédagogique de reproduction animale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Constant Fabienne, Maître de conférences*</li> <li>- Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle</li> <li>- Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)</li> <li>- Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Arné Pascal, Maître de conférences</li> <li>- Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences</li> <li>- Pr Bossé Philippe*</li> <li>- Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences</li> <li>- Pr Grimard-Ballif Bénédicte</li> <li>- Pr Ponter Andrew</li> </ul> <p><b>Rattachée DPASP</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier</li> </ul>
---	---

### Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP) Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - Adjoint : Pr Pilot-Storck Fanny

<p><b>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Boissady Emilie, Chargée d'enseignement contractuelle</li> <li>- Pr Chateau Henry</li> <li>- Pr Crevier-Denoix Nathalie</li> <li>- Pr Robert Céline*</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pr Boulouis Henri-Jean</li> <li>- Pr Eloit Marc</li> <li>- Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences</li> <li>- Pr Le Poder Sophie</li> <li>- Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences*</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pr Bellier Sylvain*</li> <li>- Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences</li> <li>- Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences</li> <li>- Pr Fontaine Jean-Jacques</li> <li>- Dr Laloy Eve, Maître de conférences</li> <li>- Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences*</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais)</li> <li>- Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie)</li> <li>- Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée</li> <li>- Dr Marignac Geneviève, Maître de conférences*</li> <li>- Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée</li> </ul>	<p><b>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP)</li> <li>- Dr Briand Amaury, Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel (rattaché au DEPEC)</li> <li>- Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC)</li> <li>- Pr Guillot Jacques*</li> <li>- Dr Polack Bruno, Maître de conférences</li> <li>- Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences</li> <li>- Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences*</li> <li>- Pr Tissier Renaud</li> </ul> <p><b>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique)</li> <li>- Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie)</li> <li>- Pr Gilbert Caroline (Ethologie)</li> <li>- Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie)</li> <li>- Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)*</li> <li>- Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticien hospitalier</li> </ul> <p><b>Discipline : éducation physique et sportive</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- M. Philips Pascal, Professeur certifié</li> </ul>
--	--

\* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émérites : Pr Combrisson Hélène, Pr Enriquez Brigitte, Pr Panthier Jean-Jacques, Pr Paragon Bernard.



# Remerciements

**Au Président du Jury de cette thèse, Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,**  
Pour avoir accepté la présidence de mon jury de thèse.  
Avec mes hommages respectueux.

**A Mme Véronique Viateau, Professeur à l'EnvA,**  
Qui m'a octroyé l'immense privilège de diriger ce travail,  
Pour sa confiance et son accompagnement dans mon parcours professionnel au sens large,  
Pour ses précieux conseils, sa rigueur et sa gentillesse,  
Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

**A Mme Eve Laloy, Maître de conférences à l'EnvA,**  
Pour sa bienveillance et sa relecture attentive,  
Avec mes sincères remerciements.

**Au docteur Émeline Maurice,**  
Qui m'a guidée tout au long de ce travail,  
Pour son soutien, le temps consacré et l'aide apportée au cours de ce travail,  
Pour son dévouement et sa disponibilité,  
Avec mes sincères remerciements.



# Table des matières

---

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>Première partie : Revue de la littérature</b> .....	<b>13</b>
1. Techniques de reconstruction du ligament croisé antérieur .....	13
A. <i>Techniques actuelles de remplacement ligamentaire en médecine humaine</i> .....	13
B. <i>Techniques émergentes de renfort ligamentaire en médecine humaine</i> .....	13
2. Choix du modèle d'étude .....	14
A. <i>Définition du cahier des charges du modèle</i> .....	14
B. <i>Intérêt de l'espèce rat</i> .....	15
C. <i>Anatomie du grasset du rat : Similitudes et différences avec le genou humain</i> .....	16
<b>Deuxième partie : étude expérimentale</b> .....	<b>19</b>
1. Introduction .....	19
2. Matériels et méthodes.....	19
A. <i>Faisabilité de l'étude</i> .....	19
a. Essais ex vivo sur pièces anatomiques .....	19
b. Essais in vivo sur deux rats : étude pilote .....	20
B. <i>Animaux</i> .....	20
C. <i>Protocole opératoire</i> .....	21
a. Examen pré-anesthésique .....	21
b. Protocole anesthésique.....	22
c. Protocole chirurgical.....	22
D. <i>Suivi clinique post-opératoire et évolution</i> .....	26
a. Évaluation clinique post-opératoire immédiate .....	26
b. Évaluation orthopédique post-opératoire immédiate.....	26
c. Suivi hebdomadaire .....	26
d. Évaluation clinique de fin d'étude.....	28
E. <i>Sacrifices et prélèvements</i> .....	28
F. <i>Analyse des pièces prélevées</i> .....	28
a. Étude nécropsique .....	28
b. Étude par imagerie à résonance magnétique (IRM) .....	29
c. Histologie et histomorphométrie.....	31
d. Étude tomodensitométrie (TDM).....	40
e. Biologie moléculaire et immunohistochimie .....	40
G. <i>Étude statistique</i> .....	41
3. Résultats .....	44
A. <i>Faisabilité et innocuité de la procédure chirurgicale</i> .....	44
B. <i>Biofonctionnalité</i> .....	45
a. Évaluation de l'appui.....	45
b. Évaluation de l'intégrité du renfort.....	50
C. <i>Bioactivité : Réaction inflammatoire</i> .....	52
a. Résultats histologiques .....	52
b. Résultats biomoléculaires .....	57
4. Discussion.....	61
A. <i>Originalité du travail</i> .....	61
B. <i>Conformité du modèle : réponse au cahier des charges pré-défini</i> .....	61
C. <i>Conformité du modèle : Biofonctionnalité et bioactivité</i> .....	62

a. Biofonctionnalité.....	62
b. Bioactivité.....	63
<i>D. Aspects bénéfiques fonctionnels et biologiques du modèle .....</i>	<i>65</i>
<i>E. Limites du modèle.....</i>	<i>66</i>
a. Limites liées à la taille et au nombre d'animaux.....	66
b. Limites liées aux méthodes d'évaluation.....	66
<b>Conclusion.....</b>	<b>69</b>
<b>Liste des références bibliographiques.....</b>	<b>71</b>
<b>Annexe 1 : Protocoles de biologie moléculaire.....</b>	<b>77</b>
<b>Annexe 2 : Résultats d'histologie.....</b>	<b>79</b>
<b>Annexe 3: Résultats de TDM.....</b>	<b>83</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : Vue latérale (A) et antérieure (B) d'un grasset droit de rat à l'IRM haute résolution .....	16
Figure 2 : Schéma expérimental .....	21
Figure 3 : Étapes chirurgicales de prélèvement du tendon fléchisseur profond des doigts .....	23
Figure 4 : Arthrotomie médiale du grasset gauche et section du LCCr .....	24
Figure 5 : Forages des tunnels fémoral et tibial et insertion de l'autogreffe.....	24
Figure 6 : Mise en place des vis fémorale et tibiale .....	24
Figure 7 : Autogreffe fixée et en place, avant section des extrémités (A) et après (B). .....	25
Figure 8 : Imbrication du rétinacle latéral de la rotule et suture cutanée .....	25
Figure 9 : Orientation des coupes IRM : sagittale (A), axiale (B), et coronale (C). .....	29
Figure 10 : Images IRM séquence FISP en coupe sagittale, axiale et coronale, d'un grasset gauche opéré avec l'AG (A, A', A''), et d'un grasset droit non opéré (B, B', B''). .....	30
Figure 11 : Orientations des coupes histologiques transversales sur un grasset opéré.....	32
Figure 12 : Schéma récapitulatif du protocole de préparation des lames histologiques .....	33
Figure 13 : Vues intra-articulaires parapatellaires comparées d'une articulation saine (A) et d'une articulation opérée avec une autogreffe (B). .....	34
Figure 14 : Coupes histologiques parapatellaires d'un CAIF droit (grasset sain) et d'un CAIF gauche (grasset opéré, groupe AG).....	35
Figure 15 : Coupes histologiques transversales de la région ostéo-chondrale illustrant les anomalies notées en cours d'analyse.....	35
Figure 16 : Coupes histologiques parapatellaires de membrane synoviale montrant la mesure de l'épaisseur de la membrane synoviale d'un grasset sain droit non opéré (A) et d'un grasset gauche opéré (groupe AG) (B).....	36
Figure 17 : Coupes histologiques tibiales distales de grassets opérés montrant les différents degrés d'ostéointégration .....	37
Figure 18 : Coupe histologique tibiale distale d'un grasset opéré montrant l'ostéointégration .....	37
Figure 19 : Image tomодensitométrique de coupe sagittale d'un grasset opéré montrant la région d'intérêt évaluée (rotule).....	40
Figure 20 : Diagramme décisionnel du choix de test statistique .....	43
Figure 21 : Évolution comparative du poids des deux groupes sur les trois mois post-implantation .....	45



Figure 22 : Photographie d'un rat du groupe AG à T <sub>0+24h</sub> .....	46
Figure 23 : Évolution de la laxité articulaire dans les deux groupes .....	46
Figure 24 : Évolution de la mobilité angulaire articulaire dans chaque groupe.....	47
Figure 25 : Pourcentage d'amyotrophie calculé par individus.....	48
Figure 26 : Comparaison du rapport de la DMO des rotules opérées et des rotules saines pour les deux groupes.....	48
Figure 27 : Comparaison du rapport de l'épaisseur trabéculaire des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes .....	49
Figure 28 : Comparaison du rapport du nombre de trabécules des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes .....	49
Figure 29 : Comparaison du rapport de la séparation des trabécules des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes .....	49
Figure 30 : Comparaison du rapport VO/VT des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes .....	49
Figure 31 : Coupes IRM en séquence FISP des AG, SS et témoins. ....	51
Figure 32 : Importance de l'ostéointégration chez les animaux AG .....	52
Figure 33 : Comparaison du score du CAIF des grassets opérés pour les deux groupes (graphique de gauche) et comparaison du score du CAIF des grassets opérés et des grassets sains (graphique de droite).....	52
Figure 34 : Comparaison du score de Mankin modifié des grassets opérés pour les deux groupes (graphique de gauche) et comparaison du score de Mankin modifié des grassets opérés et des grassets sains (graphique de droite).....	53
Figure 35 : Coupes histologiques parapatellaires intra-articulaires en zone trochléaire.....	53
Figure 36 : Comparaison des lésions cartilagineuses des autogreffes intactes et rompues .....	54
Figure 37 : Comparaison de l'épaisseur des membranes synoviales des grassets opérés pour les deux groupes (graphique de gauche) et comparaison de l'épaisseur des membranes synoviales des grassets opérés et des grassets sains (graphique de droite). ....	54
Figure 38 : Coupe histologique parapatellaire d'un grasset opéré du groupe AG (x100) montrant la cellularité et la vascularisation au sein de l'autogreffe .....	55
Figure 39 : Coupe parapatellaire d'un grasset opéré du groupe AG au grossissement x40 (A) et x100 (B).....	56
Figure 40 : Coupe du grasset en flexion (A) et coupe parapatellaire (B) d'un grasset opéré du groupe SS.....	57
Figure 41 : Comparaison de l'expression relative des différents marqueurs de l'inflammation pour les groupes AG et SS. ....	58

Figure 42 : Comparaison de l'expression relative des différents marqueurs spécifique des ligaments/tendons pour les groupes AG et SS. .... 59

Figure 43 : Comparaison de l'expression relative des différents marqueurs spécifiques du cartilage pour les groupes AG et SS..... 60



# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Description des groupes étudiés .....	21
Tableau 2 : Protocole de prémédication analgésique .....	22
Tableau 3 : Protocole d'induction anesthésique.....	22
Tableau 4 : Exemple de fiche de suivi clinique général et locomoteur .....	27
Tableau 5 : Scoring de boiterie utilisé pour l'évaluation orthopédique hebdomadaire .....	27
Tableau 6 : Protocole appliqué au grasset selon le groupe .....	28
Tableau 7 : Scoring utilisé pour l'évaluation de la colonisation cellulaire de l'autogreffe .....	38
Tableau 8 : Scoring utilisé pour l'évaluation histologique du CAIF (Udo <i>et al.</i> , 2016) .....	38
Tableau 9 : Scoring utilisé pour l'évaluation histologique du cartilage (Panahifar <i>et al.</i> , 2014) .....	39
Tableau 10 : Scoring de l'ostéointégration .....	39
Tableau 11 : Inclusion des animaux dans l'étude .....	44
Tableau 12 : Boiterie par groupe ( %) sur 3 mois .....	46
Tableau 13 : Amyotrophie moyenne par groupe .....	48
Tableau 14 : Type de rupture des autogreffes .....	50



# Liste des abréviations

---

AGGRECAN : protéoglycane du cartilage articulaire

ARN : Acide ribonucléique

AM : Faisceau antéro-médial

CAIF : Coussinet adipeux infra-patellaire

Col1 $\alpha$ 1 : Collagène I alpha 1

Col3 $\alpha$ 1 : Collagène III alpha 1

CRBM : Centre de recherche biomédicale

CCr : Cranial cruciate ligament

DMO : Densité minérale osseuse

EnvA : École Nationale Vétérinaire d'Alfort

FN : FibroNectine

IL1 $\beta$  : InterLeukine 1 beta

IRM : Imagerie à résonance magnétique

LB2OA : Laboratoire de Biomécanique et de Biomatériaux Ostéo-articulaires

LBPS : Laboratoire de biomatériaux pour la Santé

LARS : Ligament advanced reinforced system

LCA : Ligament croisé antérieur

LCP : Ligament croisé postérieur

LCCr : Ligament croisé crânial

LCCd : Ligament croisé caudal

MMP : Métalloprotéases matricielles

OARSI : Osteoarthritis Research Society International

PARCC-HEGP : Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire – Hôpital Européen Georges Pompidou

PL : Faisceau postéro-latéral

PMMA : Polyméthylmétacrylate

PRP : Plasma riche en plaquettes

qPCR : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase chain reaction*) quantitative

SCX : Scleraxis

SOX9 : SRY-box 9

SRY : Sex determining region Y

TDM : Tomodensitométrie

Tnmd : Ténomoduline



# Introduction

---

Les ruptures du ligament croisé antérieur (LCA) sont des lésions fréquemment observées chez l'homme. En France, l'incidence de rupture de LCA est estimée à 35 000 ruptures par an (Colombet *et al.*, 2007). Cette lésion ne cicatrise pas spontanément (Andersson *et al.*, 1989). Elle s'accompagne fréquemment d'une instabilité fonctionnelle avec des dérobements et une gêne à la pratique du sport. Même si une prise en charge conservatrice médicale est possible, une reconstruction chirurgicale donne de meilleurs résultats, en particulier concernant la stabilité articulaire (Mistry *et al.*, 2019). Des études rétrospectives montrent que la rupture non opérée s'accompagne avec le temps d'une symptomatologie méniscale, de lésions cartilagineuses secondaires ainsi que d'ostéoarthrite. (Haute Autorité de Santé, 2008), (Lohmander *et al.*, 2007). Une étude de 2001 (Harner *et al.*, 2001) recense plus de 100 000 reconstructions par an aux États-Unis et actuellement plus de 175 000 greffes sont réalisées. La prise en charge chirurgicale est donc actuellement la solution thérapeutique idéale pour pallier aux ruptures du LCA.

Les techniques chirurgicales de réparation ligamentaire actuelles reposent sur deux méthodes principales :

- La reconstruction ligamentaire (absence de préservation du ligament natif rompu)
- Le renfort ligamentaire (préservation du ligament natif rompu)

Même si la technique de référence aujourd'hui chez l'homme est la reconstruction ligamentaire par autogreffe (Haute Autorité de Santé, 2008), celle-ci est encore associée à des inconvénients majeurs, notamment une morbidité et une douleur associées au prélèvement de l'autogreffe, un mauvais ancrage au sein des tunnels osseux, des ruptures précoces et une laxité articulaire persistante. Avec 75 à 90 % de résultats cliniques satisfaisants, on retrouve une récurrence de l'instabilité dans 0,7 à 8 % des cas soit environ 1 400 à 16 000 reprises par an (Carson *et al.*, 2010). De plus, l'absence de préservation du LCA engendre des déficits proprioceptifs, du fait de la présence de mécanorécepteurs au sein du LCA (Dhillon *et al.*, 2012). Ainsi, l'instabilité fonctionnelle consécutive à une blessure du LCA est due à une translation tibiale excessive, mais aussi à une perte de coordination de l'activité musculaire stabilisant l'articulation, et à une perte de sensibilité douloureuse (Borsa *et al.*, 1997). La préservation du LCA natif lors de renfort ligamentaire devient alors une solution pour pallier à cette instabilité fonctionnelle. Bien que le retrait du LCA rémanent semblerait prévenir l'apparition d'arthrofibrose (Mayr *et al.*, 2004), des études ont montré que la préservation du LCA favoriserait la stabilité fonctionnelle du genou, par ré-innervation et récupération du potentiel proprioceptif (Dhillon *et al.*, 2010). Le LCA résiduel serait donc une source significative de fibres nerveuses et de mécanorécepteurs, et sa préservation améliorerait les résultats cliniques.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'élaborer un modèle animal basé sur une section du ligament croisé crânial (LCCr, équivalent du LCA chez l'animal), avec ou sans renfort par autogreffe tendineuse, cette dernière étant considérée comme la référence en clinique. Ce modèle, établi chez le rat, a pour vocation de définir les contrôles positif (section et renfort par l'autogreffe) et négatif (section sans renfort) pour les futures études évaluant sur le même modèle de nouveaux ligaments synthétiques de renfort. Il permettra de déterminer l'impact de la fonctionnalisation de l'autogreffe :



- par l'évaluation de la biofonctionnalité de l'autogreffe, définie par sa capacité à remplir sa fonction de renfort ligamentaire (intégrité du renfort après 3 mois d'implantation, qualité de la récupération fonctionnelle chez les animaux implantés).
- par l'évaluation de la réponse de l'hôte, au travers de l'étude de la réponse inflammatoire (bioactivité) et de l'intégration tissulaire en sites intra-articulaire et intra-osseux (ostéo-intégration).

# Première partie : Revue de la littérature

---

## 1. Techniques de reconstruction du ligament croisé antérieur

### A. Techniques actuelles de remplacement ligamentaire en médecine humaine

La reconstruction du LCA est devenue, au cours de ces dernières années, une procédure orthopédique avec un pronostic chirurgical satisfaisant (Anderson *et al.*, 2016). Le taux d'échec de la prise en charge varie de 8 à 25 % selon les auteurs et le choix de tissu greffé est controversé. De nombreuses options à la fois intra et extra-articulaires sont disponibles, incluant autogreffe, allogreffe, suture ligamentaire et ligament artificiel. Outre le type de substitut utilisé, la meilleure procédure reconstructrice dépend de nombreux facteurs, incluant les propriétés biomécaniques du substitut ligamentaire (dont la référence est l'autogreffe tendineuse), le type de fixation fémorale et tibiale, ainsi que l'expérience du chirurgien (Saccomanni, 2011).

Une étude récente propose une comparaison des autogreffes et des allogreffes d'un point de vue de la récupération clinique et dans une perspective économique, et conclut que les deux types de greffes sont très efficaces. Elle rapporte un taux d'échec très similaire (6 % pour les autogreffes et 7 % pour les allogreffes), pour une différence de coût significative (plus élevé pour les allogreffes), faisant des autogreffes le choix de première intention (Mistry *et al.*, 2019). Les avantages de l'allogreffe, en plus d'un aspect esthétique, reposent sur une absence de morbidité associée au site de prélèvement et un temps de chirurgie plus court (Hulet *et al.*, 2019).

En chirurgie primaire de reconstruction du LCA en France, la recommandation thérapeutique de la Haute Autorité de Santé (2008) est "une reconstruction par autogreffe, puisque les sutures sont inefficaces et que les plasties prothétiques ont montré leur insuffisance et leur iatrogénie." Cependant il a été montré que les autogreffes présentent un risque de rupture, de désinsertion précoce au cours de la rééducation, et subissent des changements morphologiques qui les rendent moins résistantes que d'autres supports comme les ligaments artificiels, notamment pendant la phase de ligamentation (Harner *et al.*, 2001). Néanmoins, les ligaments artificiels ne constituent pas une solution efficace à long terme, puisqu'ils sont associés à un taux de rupture et d'étirement de la prothèse allant jusqu'à 28 %, ainsi qu'une forte incidence de synovite (Nau *et al.*, 2002), (Ghalayini *et al.*, 2010), (Jadeja *et al.*, 2007).

Enfin, le tissu autologue principalement utilisé dans les ligamentoplasties actuelles est le ligament patellaire, même si depuis quelques années les tendons des muscles ischio-jambiers semblent offrir un meilleur processus de cicatrisation et une meilleure intégration osseuse des extrémités de la greffe (Amiel *et al.*, 1986).

### B. Techniques émergentes de renfort ligamentaire en médecine humaine

La chirurgie reconstructrice humaine engendre un taux non négligeable de douleurs articulaires (13-43 %), d'atrophie du muscle quadriceps (20-30 %) et d'une perte d'amplitude de mouvements (12-23 %). Un intérêt croissant est alors porté depuis quelques décennies à la préservation du LCA, dans le souci d'une approche moins invasive et de conservation des propriétés proprioceptives des

fibres du LCA rompu. Cette préservation s'est alors d'abord envisagée par une réparation primaire du ligament (suture, agrafes internes) puis par un renforcement de la structure du ligament natif par l'adjonction de plasma riche en plaquettes (PRP) (Figuroa *et al.*, 2015). L'addition de PRP pourrait être un facteur synergique favorisant la récupération, mais les données scientifiques ne sont pas encore suffisantes pour en assurer la certitude. Ces techniques se sont pour le moment révélées insuffisantes au regard de la détérioration des résultats à long terme et ont conduit à envisager un renforcement ligamentaire, combinant le tissu natif et ses caractéristiques biologiques, et une reconstruction chirurgicale par greffe (van der List et DiFelice, 2016). Cela permettrait en plus du maintien des capacités proprioceptives, une revascularisation voire une "ligamentisation de novo" par maintien du tissu natif.

En pratique, certains matériaux (polyéthylène terphthalate par exemple) ont montré une très bonne histocompatibilité, notamment par des formations de tissu conjonctif autour de la prothèse (Yu *et al.*, 2014). C'est dans ce contexte qu'on assiste à l'émergence d'un système de renforcement ligamentaire avancé (LARS). Le LARS permet une résistance à la fatigabilité, notamment en cas de stress articulaire de type flexion-torsion et élongation. Il a récemment fait preuve de bons rendements thérapeutiques et de bons résultats à court-terme (Hamido *et al.*, 2011). Par ailleurs, en cas de lésions multiples du LCA ainsi que lorsque le tendon de remplacement est d'un diamètre insuffisant, il est d'autant plus important de considérer la nécessité d'augmenter la longueur et/ou le diamètre de ces autogreffes. En pratique, une étude clinique de suivi à moyen terme montre une grande satisfaction des patients opérés 5 ans après la procédure chirurgicale de renforcement ligamentaire à l'aide du LARS, spécifiquement les athlètes souhaitant un retour rapide à la pratique sportive (Hamido *et al.*, 2011).

Malgré ces résultats prometteurs, un manque de données concernant l'aspect histologique, biomécanique et biofonctionnel persiste dans la littérature actuelle pour l'étude d'autres matériaux de renfort et une incertitude demeure quant au devenir à long terme d'un matériau non résorbable au sein de l'articulation (risque de synovites).

L'objectif de notre étude est ainsi de définir un modèle animal de renfort ligamentaire, qui servira de témoin dans l'évaluation d'autres matériaux de renfort, notamment de nouveaux ligaments artificiels résorbables, préalable à une utilisation chez l'homme. Une évaluation clinique, orthopédique, nécropsique, histologique, par imagerie médicale (IRM, SCANNER) et une évaluation de biologie moléculaire seront réalisées afin de définir les caractéristiques de ce nouveau modèle.

## **2. Choix du modèle d'étude**

### **A. Définition du cahier des charges du modèle**

Les expérimentations animales permises par notre modèle s'inscrivent dans le cadre d'évaluation préalable de nouveaux matériaux destinés à terme à une utilisation chez l'homme dans le renfort de réparation du LCA. Dans ce contexte, notre modèle doit répondre à un cahier des charges précis. Il est nécessaire de trouver un modèle en charge (animal prenant appui sur son membre), dont l'articulation possède un maximum de similarités avec l'articulation humaine et chez qui le suivi du remplacement ligamentaire sera possible et caractérisable. Enfin, il est indispensable que le modèle soit peu coûteux et que la morbidité en soit faible.

## **B. Intérêt de l'espèce rat**

Il n'existe pas actuellement de protocole défini permettant de choisir le modèle de travail le plus adapté comme cela a été démontré dans la recherche autour de l'ostéoarthrite de l'homme (Lampropoulou-Adamidou *et al.*, 2014).

Au cours des deux dernières décennies, les modèles animaux ont joué un rôle considérable dans l'amélioration des connaissances scientifiques autour de la rupture du LCA. Aujourd'hui, aucun modèle animal ne simule encore parfaitement l'articulation humaine. Malgré les similarités morphologiques avec l'articulation du porc (Xerogeanes *et al.*, 1998), la difficulté de manipulation de cet animal en font un modèle difficilement utilisable. Par ailleurs, la disponibilité de réactifs biochimiques adaptés aux espèces chien et lapin reste faible, ce qui limite fortement, dans une approche biomoléculaire, l'évaluation de potentiels agents biochimiques dans les articulations affectées (Hayami *et al.*, 2006).

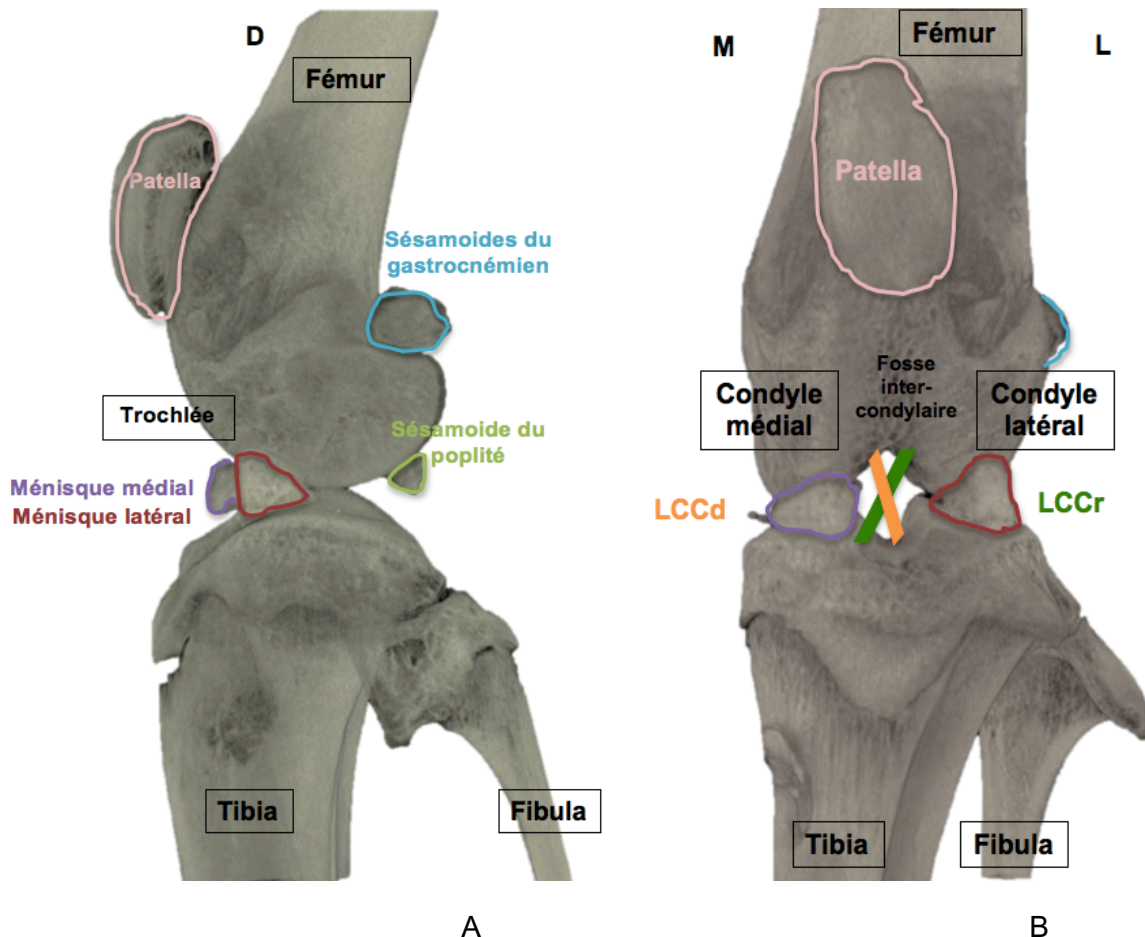
La nécessité d'une espèce animale de petite taille (facilité d'élevage, moindre coût) oriente vers les espèces de rongeurs. Le rat présente, par rapport à la souris, un cartilage plus épais et une articulation plus large, facilitant l'étude des lésions cartilagineuses. De plus, il a été récemment démontré la faisabilité de micro-IRM chez le rat (Goebel *et al.*, 2010).

Ainsi le modèle du rat réunit à la fois une facilité de manipulation du fait de la petite taille des animaux, un moindre coût d'entretien et de mise en place des protocoles, ainsi qu'une particulière résistance aux infections (Pritzker, 1994). Concernant plus spécifiquement l'articulation du grasset, comme détaillé ci-après, certaines particularités anatomiques du rat en font un modèle particulièrement avantageux.

### C. Anatomie du grasset du rat : Similitudes et différences avec le genou humain

Chez le rat, le grasset est semblable au genou de l'homme (Fig. 1 ; Hildebrand *et al.*, 1991), mais nous nous appliquerons ici à décrire les différences anatomiques même si elles sont moindres, tout en rappelant les rôles des différentes structures.

Figure 1 : Vue latérale (A) et antérieure (B) d'un grasset droit de rat à l'IRM haute résolution



L'articulation de l'homme est plus large transversalement et aplatie dans le sens cranio-caudal que celle des autres mammifères. La structure d'un os de rat adulte est similaire à celle de l'homme à l'exception de la persistance de plaques de cartilage de croissance des os longs, qui ne sont pas totalement résorbées. Chez le rat, le tibia est discrètement incurvé en forme de « S » dans le plan sagittal. De plus, l'extrémité distale de la fibula est fusionnée au tibia, alors qu'elle forme une pseudo-articulation chez l'homme. La rotule présente une portion cartilagineuse, alors que la rotule humaine est entièrement osseuse. L'extenseur long des doigts du rat s'insère sur l'épicondyle latéral du fémur alors que celui de l'homme prend son origine sur la fibula. La courbure des condyles fémoraux du rat est importante et s'accroît en région palmaire ce qui permet de définir une large fosse intercondyloire, contrairement à l'articulation humaine, facilitant la visualisation des ligaments inter-articulaires. De plus, comme chez l'homme, les condyles fémoraux et tibiaux latéraux sont plus larges que les condyles médiaux. Cette différence de configuration des condyles permet le mouvement spécifique du fémur par rapport au tibia et inversement (Fig. 1B).

Chez l'homme comme chez le rat, les mêmes structures anatomiques stabilisatrices sont retrouvées et la stabilité du genou repose sur les ligaments collatéraux, les ligaments croisés cranial (LCCr) et caudal (LCCd) et les ménisques.

Les ligaments croisés antérieurs et postérieurs sont similaires à ceux des humains (Fig.1B). Comme chez l'homme, le LCCr est bi fasciculaire. Il est composé d'un faisceau antéro-médial (AM) qui est tendu en flexion et son rôle est la stabilisation du genou en translation antéro-postérieure : c'est ce faisceau dont la rupture entraîne le tiroir antérieur à l'examen clinique. Le faisceau postéro-latéral (PL) est tendu lors de l'extension quasi complète et possède un rôle de stabilisation pour les charges rotatoires.

Les ménisques sont des fibrocartilages qui s'interposent entre les condyles et les plateaux tibiaux, améliorant considérablement la congruence articulaire fémoro-tibiale et jouant un rôle fondamental dans la cinétique du genou. Le rat est un modèle qui présente des ménisques articulaires de forme pyramidale particulièrement développés, le latéral étant le plus large des deux (Hildebrand *et al.*, 1991). Au contraire, chez l'homme, les ménisques articulaires sont de forme triangulaire, le ménisque latéral est le moins large des deux, et le ménisque médial est en forme de "C" (Kaplan E.B., 1962). Chez les deux espèces, la vascularisation est de type vestigial, et une partie de la zone périphérique des ménisques est avasculaire, rendant la cicatrisation plus difficile. Les ménisques des rats subissent en plus une ossification partielle, qui n'est pas retrouvée chez l'homme. On observe également chez le rat des nodules osseux arrondis rattachés l'un à l'autre par une bande étroite de tissu fibro-cartilagineux (Hildebrand *et al.*, 1991).

L'ensemble de ces caractéristiques ligamentaires et musculaires reflètent le fait que même si le rat est un modèle en charge, l'articulation de son genou se maintient principalement en flexion, alors que celle de l'humain est en extension la majeure partie du temps. En dépit des différences anatomiques listées ci-dessus, le rat est un modèle anatomique et fonctionnel adapté pour reproduire l'articulation humaine.



# Deuxième partie : étude expérimentale

---

## 1. Introduction

En utilisant un tendon autologue dans une procédure de renforcement ligamentaire du ligament croisé cranial (LCCr), notre étude a pour objectif d'évaluer à la fois la reconstruction tissulaire et osseuse autour de cette autogreffe, mais aussi l'interaction entre l'interface os – ligament par des évaluations cliniques et orthopédiques, des méthodes d'imagerie médicale (microscannographie, IRM) ainsi qu'une analyse histologique et biomoléculaire de l'intégration tissulaire de l'autogreffe.

Les principales problématiques de notre étude sont donc :

- La procédure chirurgicale de renfort ligamentaire chez le rat par autogreffe est-elle réalisable et quelle est son innocuité ?
- Quelles sont les particularités histologiques dégagées par notre étude et en particulier qu'en est-il des interfaces ligament natif/ autogreffe et os/ autogreffe (ostéo-intégration) ?
- La stabilité de l'articulation du grasset est-elle récupérée à court terme ?
- Quels sont les apports des examens d'imagerie et de biologie moléculaire dans la mise au point du modèle ?

## 2. Matériels et méthodes

### A. Faisabilité de l'étude

Préalablement à sa mise en œuvre, le projet a fait l'objet d'une saisine qui a reçu l'aval du Comité d'Éthique Anses/ENVA/UPEC (Référence APAFiS : 2018040312168559 - #14376). Sa réalisation a été effectuée sous le contrôle de personnes détentrices d'une autorisation d'expérimenter sur animaux vivants. L'ensemble des expérimentations a été réalisé au sein du Centre de Recherche BioMédicale (CRBM) de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (EnvA).

#### *a. Essais ex vivo sur pièces anatomiques*

Des essais *ex vivo* sur pièces anatomiques ont été réalisés afin de déterminer les choix techniques de la procédure chirurgicale :

- Identification de l'autogreffon optimal en termes de résistance mécanique et de longueur. Ont été testés : le tendon du muscle long extenseur des doigts, le tendon du muscle fléchisseur profond des doigts et les tendons de la queue (Ramme *et al.*, 2018).
- Choix du matériel chirurgical compatibles avec les critères définis ci-dessous.
- Choix du diamètre des tunnels osseux et des vis compatibles avec les critères définis ci-dessous.



Les critères vérifiés au cours de ces essais étaient :

- L'absence de fractures liées à un diamètre excessif des tunnels osseux
- L'absence de lésion de l'autogreffe lors de son passage dans les tunnels et de son ancrage par la vis d'interférence
- L'absence de lésions concomitantes des structures intra-articulaires (LCCd et ménisques en particulier)
- La neutralisation du tiroir crânial suite à la mise en tension de la greffe

Le greffon choisi est le tendon du muscle fléchisseur profond des doigts car s'avérant optimal en termes de résistance mécanique et de longueur disponible.

Le matériel choisi au cours des essais comporte : un moteur Vetline Aesculap® B Braun pour les tunnels osseux, un couteau ophtalmique AccuSharp Ophtalmic 22.5° Straight Knife, Référence AB-AST22, Accutome® pour la section du LCA.

#### ***b. Essais in vivo sur deux rats : étude pilote***

Des essais *in vivo* sur deux cadavres ont été réalisés pour :

- (i) Vérifier les choix techniques de l'étude *ex vivo* (choix du moteur chirurgical et des mèches, choix du diamètre des vis de fixation, choix de l'autogreffe)
- (ii) Évaluer la faisabilité de la technique chirurgicale chez le rat et son innocuité
- (iii) En évaluer la performance au plan fonctionnel (neutralisation du tiroir crânial suite à la mise en tension de l'autogreffe, absence de glissement de la greffe)
- (iv) Évaluer la pertinence de l'IRM pour l'évaluation non destructive de la greffe
- (v) Évaluer la pertinence de la micro-scannographie
- (vi) Évaluer la faisabilité de l'étude histologique et de l'étude biomoléculaire

Cette étude pilote était également à visée éthique, permettant l'entraînement du chirurgien avant de réaliser l'intervention sur animal vivant. Ces deux études ont permis de vérifier l'adéquation du matériel, de la technique chirurgicale et de la pertinence des examens prévus.

### **B. Animaux**

Les rats ont été obtenus auprès d'un fournisseur agréé (Janvier Labs, CS4105 Le Genest Saint Isle 53941 Saint Berthevin Cedex), des rats femelles Wistar âgées de 37 semaines, d'un poids d'environ 350g.

Les animaux ont été hébergés et traités selon les recommandations publiées et en vigueur en France et en Europe (Directive 2010/63/EU et Convention Européenne ETS 123), dans des cages en plastique transparent de 20 x 40 x 20 cm, en binôme (plus rarement trinôme) avec eau et croquettes à volonté. La litière était constituée de papier cartonné.

Deux groupes de 7 rats sont constitués de façon aléatoire (Tab. 1), le groupe associé à la mise en place d'une autogreffe (groupe AG) et celui-ci associé à une section simple du LCCr (groupe SS):

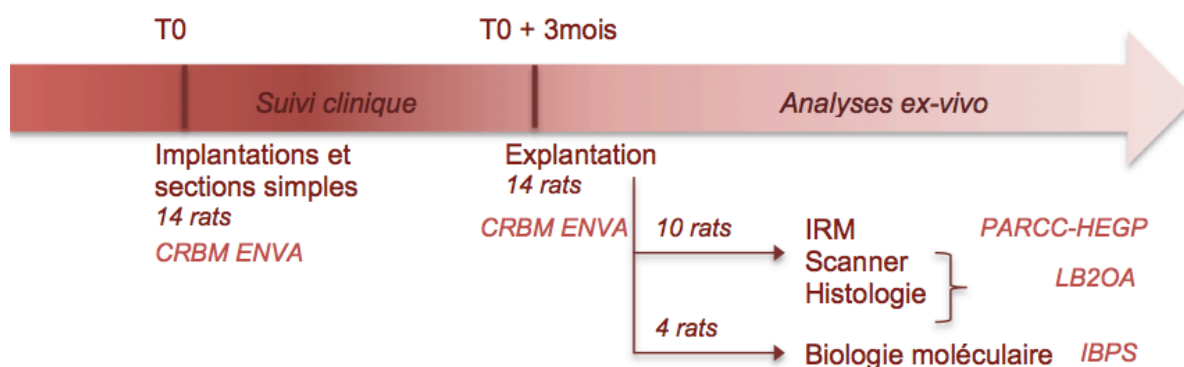
**Tableau 1 : Description des groupes étudiés**

Groupe	Description	Rôle	Nombre de spécimens faisant l'objet d'une étude biomoléculaire	Nombre de spécimens faisant l'objet d'une étude histologique, IRM et tomодensitométrique
AG (n=7 rats)	Section du LCCr et renfort tendineux	Évaluation de l'autogreffe en tant que renfort ligamentaire	<b>n=2 rats</b> (2 grassets opérés et 2 grassets controlatéraux non opérés)	<b>n=5 rats</b> (5 grassets opérés et 5 grassets controlatéraux non opérés)
SS (n=7 rats)	Section isolée du LCCr sans renfort tendineux	Groupe témoin	<b>n=2 rats</b> (2 grassets opérés et 2 grassets controlatéraux non opérés)	<b>n=5 rats</b> (5 grassets opérés et 5 grassets controlatéraux non opérés)

Pour l'ensemble des rats, le grasset opéré est le grasset gauche. Le grasset controlatéral, non opéré et sain, sert de témoin pour toutes les analyses.

Le schéma expérimental est détaillé dans la figure 2.

**Figure 2 : Schéma expérimental**



## C. Protocole opératoire

### a. Examen pré-anesthésique

- Examen clinique

Au cours de l'examen clinique sont vérifiés :

- Les capacités respiratoires : l'anesthésie entraîne une dépression respiratoire non compensée par apport d'O<sub>2</sub> pur, ce qui entraîne un risque de pneumopathie accru.
- La standardisation en termes d'âge et de poids des groupes de rats inclus dans l'étude : Une surcharge pondérale ou un âge trop avancé de l'un des animaux risque de fausser les résultats.
- L'absence de maladie clinique ou sub-clinique : les animaux doivent être en état de supporter l'anesthésie.
- L'absence de plaies externes (léchages excessifs, automutilation...)
- L'absence d'effort physiologique excessif : les animaux doivent être acclimatés à l'environnement et à l'alimentation pendant plusieurs jours avant de subir une anesthésie (en pratique, une acclimatation de 2 semaines était réalisée).

- Examen orthopédique

Au cours de l'examen orthopédique visuel, sont vérifiés :

- L'absence de boiterie
- L'absence de signes d'inflammation articulaire (gonflements, rougeurs...)
- L'absence d'amyotrophie
- L'absence de dissymétrie
- Déplacements fluides

- Mesure préalable pour évaluer l'amyotrophie

Dans le cadre d'une appréciation du développement potentiel d'amyotrophie du membre pelvien pendant la durée post-implantatoire (Thomas *et al.*, 2016), une mesure préopératoire de la circonférence des quadriceps est réalisée (Kirwan *et al.*, 1979) et sera complétée d'une mesure en fin d'étude. Toutes les mesures sont réalisées par le même manipulateur, avec le même ruban de mesure. Une moyenne de 3 mesures par quadriceps est gardée comme résultat. Le site de mesure est choisi en partie proximale du quadriceps afin de s'affranchir de potentiels empâtements du membre qui biaiserait la mesure en fin d'étude. Le quadriceps controlatéral est également mesuré. Une fonction est alors utilisée pour calculer le pourcentage d'amyotrophie : Lorsque la différence entre les deux mesures de circonférence ( $T_0$  et  $T_{0+3\text{mois}}$ ) est positive (absence d'amyotrophie par augmentation du diamètre du quadriceps sur la durée post-implantatoire) la fonction renvoie la valeur de 0. Si la différence ( $T_0 - T_{0+3\text{mois}}$ ) est négative, la fonction applique la formule :  $|T_0 - T_{0+3\text{mois}}| \times 100 / T_0$ , qui correspond au pourcentage de perte par rapport à la valeur initiale.

### **b. Protocole anesthésique**

Chaque rat est aléatoirement associé à un des deux groupes définis au préalable (Tab. 1) et subit alors la mise en place d'une autogreffe (renfort tendineux) ou bien la section simple de son LCCr gauche.

La procédure est réalisée sous anesthésie générale selon l'article R214-91 du code Rural. Elle est d'abord induite par un mélange dexmédétomidine / kétamine (Tab. 3) et est poursuivie par un relais gazeux : l'anesthésie est maintenue par inhalation au masque (mélange d'isofurane, Isofurane®/O<sub>2</sub>), (Stokes *et al.*, 2009). Les animaux sont disposés sur tapis chauffant pendant toute la durée de l'intervention afin de limiter les pertes thermiques. L'anesthésie est surveillée en suivant l'évolution des constantes vitales et évaluation des réflexes, et ajustée à l'état de profondeur anesthésique tout au long de l'intervention.

**Tableau 2 : Protocole de prémédication analgésique**

Molécules utilisées	Posologie	Voie d'administration	Laboratoire fournisseur
Buprénorphine	0,1 mg/kg	Sous cutanée	Buprecare®Axience
Méloxicam	1 mg/kg	Sous cutanée	Métacam® Boehringer

Une prémédication analgésique, selon la réglementation en vigueur (article R214-92) est également réalisée au moment de l'induction par une injection préopératoire de buprénorphine et de méloxicam (Tab. 2).

**Tableau 3 : Protocole d'induction anesthésique**

Molécules utilisées	Posologie	Voie d'administration	Laboratoire fournisseur
Dexmédétomidine	0,2mg/kg	intrapéritonéale	Domitor® Orion pharma
Kétamine	80 mg/kg	intrapéritonéale	Imalgène® Merial

Le rat est placé en décubitus dorsal. Le membre pelvien gauche est tondu puis préparé de manière aseptique à l'aide de povidone iodée (Bétadine savon™, Bétadine solution dermique™).

### **c. Protocole chirurgical**

- Prélèvement de l'autogreffe

La technique est basée sur un modèle modifié de reconstruction ligamentaire précédemment décrit chez le rat, dans lequel l'autogreffe est le tendon fléchisseur profond des doigts (Mifune *et al.*, 2013), (Kawakami *et al.*, 2017), (Carbone *et al.*, 2016).

Après préparation du membre postérieur gauche pour une chirurgie en condition d'asepsie, le tarse est abordé caudalement par une incision de 1cm au bistouri froid (lame N°11) en regard du tendon du muscle fléchisseur profond des doigts (flexor digitorum longus) (Fig. 3A). Après dissection fine à la pince de Debakey et aux ciseaux de Metzenbaum droits, le tendon est découvert, et mis sous tension de manière à s'assurer de son identification correcte (vérification de la flexion des doigts) (Fig. 3B). Il est alors désinséré caudalement en avant de son insertion sur les phalanges distales puis crânialement.

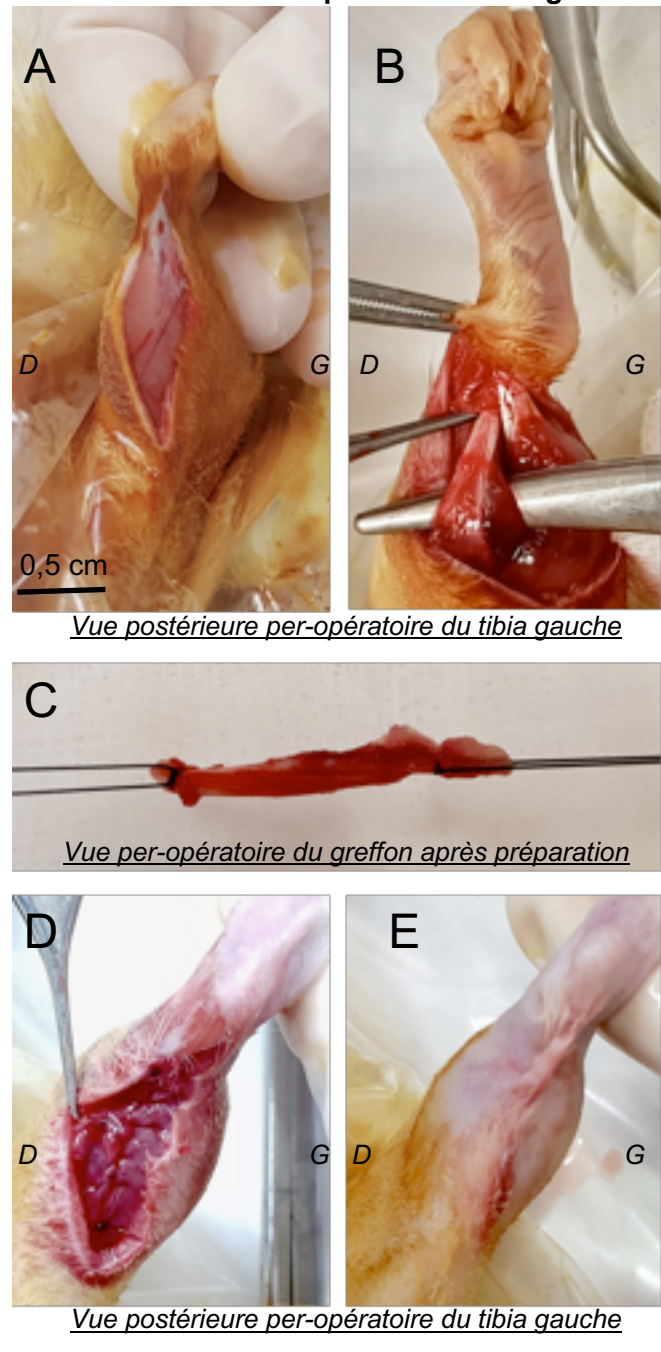
L'autogreffe est ainsi isolée et fixée à ses deux extrémités par du fil de suture (polyamide, Ethilon 4-0), et maintenue dans une compresse imbibée de Versol™ (Fig. 3C). Une préparation est réalisée par exérèse des éléments charnus. La procédure est terminée par une fermeture conventionnelle (cf ci-dessous ; Fig. 3D-E).

- *Abord du grasset et section du LCCr*  
Une arthrotomie latérale du grasset est réalisée à la lame froide (N°11) (Fig. 4A), la trochlée fémorale est découverte (Fig. 4B), et après avoir mis le membre en flexion, le LCCr est complètement sectionné au couteau ophtalmique AccuSharp Ophtalmic 22.5° Straight Knife, Référence AB-AST22, Accutome® en prenant soin de ne pas léser le LCCd et les ménisques (Fig. 4C). La présence d'un signe du tiroir antérieur est vérifiée.

- *Mise en place de l'autogreffe*

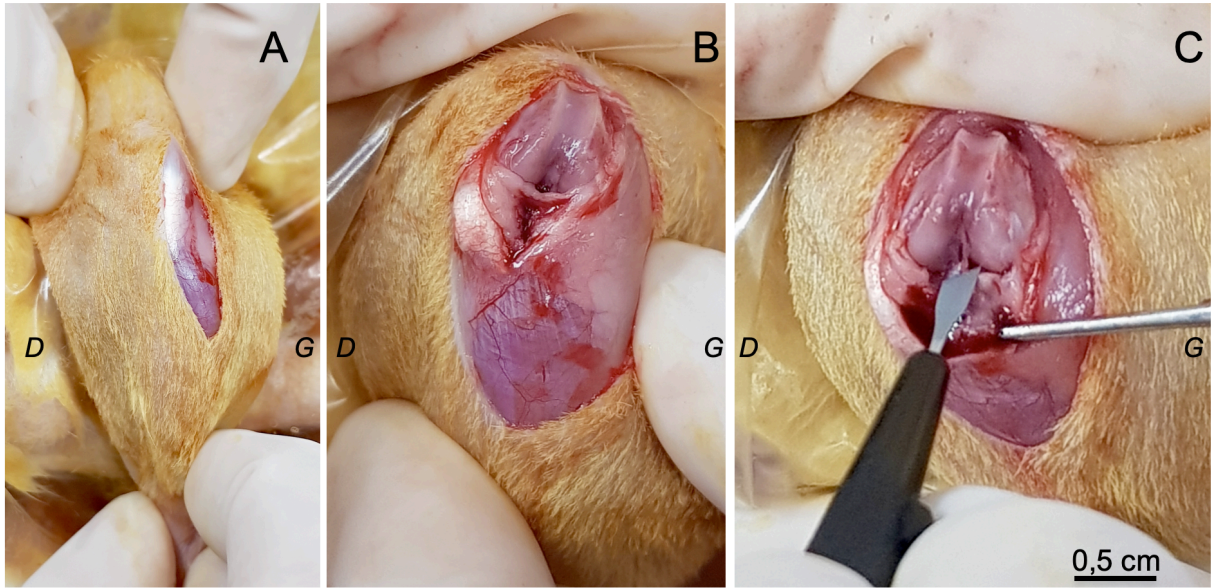
Deux tunnels osseux sont alors forés dans le sens médio-latéral, l'un dans le fémur, (Fig. 5B) et l'autre dans le tibia (Fig. 5A), avec une mèche de 1,4 mm de diamètre. En prenant soin de préserver les ménisques en particulier lors du forage du tunnel tibial.

**Figure 3 : Étapes chirurgicales de prélèvement du tendon fléchisseur profond des doigts**



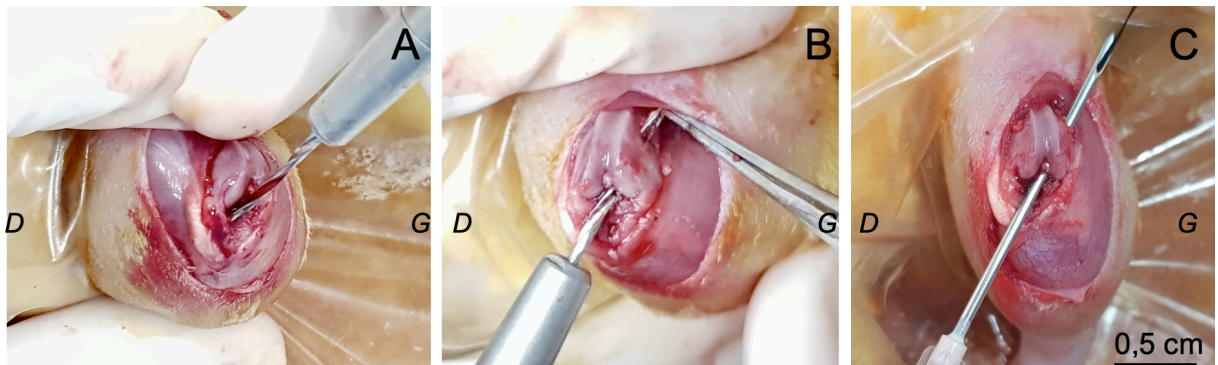


**Figure 4 : Arthrotomie médiale du grasset gauche et section du LCCr**



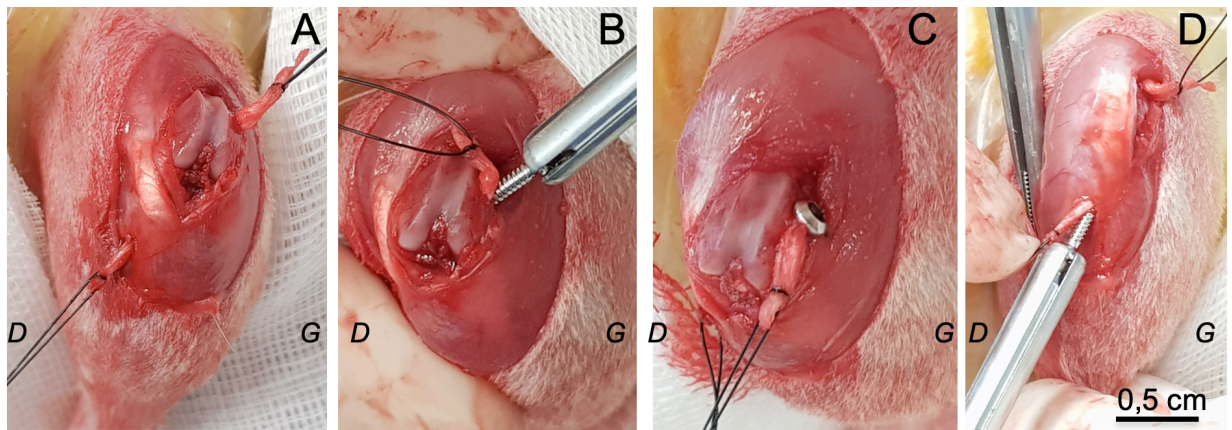
*Vue antérieure peropératoire du grasset gauche*

**Figure 5 : Forages des tunnels fémoral et tibial et insertion de l'autogreffe**



*Vue antérieure-supérieure peropératoire du grasset gauche*

**Figure 6 : Mise en place des vis fémorale et tibiale**



*Vue antérieure-supérieure peropératoire du grasset gauche*



Les fils d'ancrage de l'autogreffe sont alors insérés dans le tunnel fémoral médio-latéralement et caudo-crânialement, à l'aide d'une aiguille de 18 Gauges servant de guide (Fig. 5C).

L'aiguille est retirée et l'autogreffe est maintenue dans le tunnel fémoral à l'aide des fils de suture à ses extrémités. Le même processus (mais aiguille positionnée de dehors en dedans) est réalisé à travers le tunnel tibial (Fig. 6A).

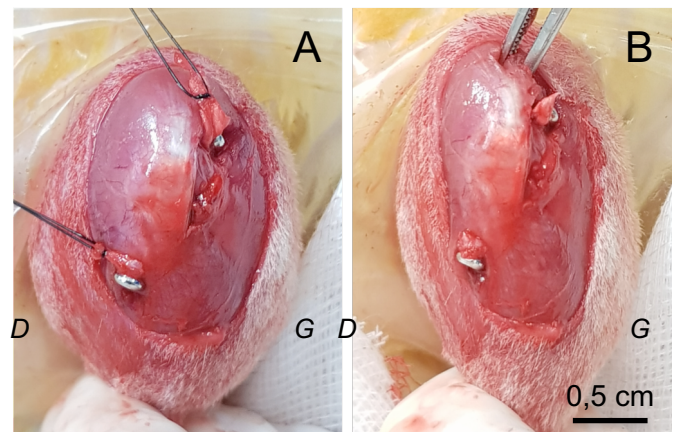
Une vis corticale en inox de 6 x 1,5 mm (Dupuy Synthes™) est insérée dans le tunnel fémoral, créant un premier point de fixation de l'autogreffe (Fig. 6B-C). Le genou est fléchi de 30°, et une tension est appliquée sur l'autogreffe. La vis tibiale de 6 x 1,5mm (Dupuy Synthes™) en inox est insérée dans le tunnel tibial (Fig. 6D).

Dans certains cas il a été nécessaire de rajouter un point d'ancrage du tendon au fascia lata au biosyn 4-0. Une fois l'autogreffe placée et fixée (Fig. 7A-B), le rétinacle latéral est imbriqué par deux point de suture en U au glycomère 631, Biosyn™ 4-0 (Fig. 8A-C).

- *Fermeture conventionnelle*

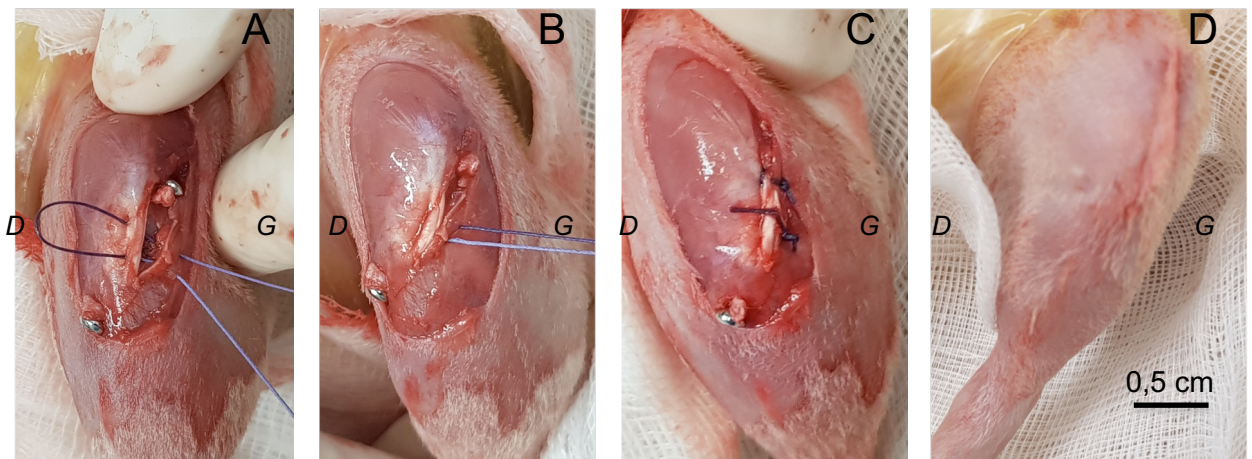
Les plans musculaires et sous-cutanés sont ensuite suturés par deux surjets simples au glycomère 631, Biosyn™ 4-0 et le plan cutané est refermé par un intradermique à l'Ethilon™ 4-0 (Fig. 8D).

**Figure 7 : Autogreffe fixée et en place, avant section des extrémités (A) et après (B).**



*Vue antéro-supérieure peropératoire du grasset gauche*

**Figure 8 : Imbrication du rétinacle latéral de la rotule et suture cutanée**



*Vue antéro-supérieure du grasset gauche per et post-opératoire*

Concernant le groupe SS, seuls sont réalisés l'abord du grasset et la section du LCCr suivis d'une fermeture conventionnelle comme décrit précédemment.

## **D. Suivi clinique post-opératoire et évolution**

### **a. Évaluation clinique post-opératoire immédiate**

Après l'intervention chirurgicale, les opérés des deux groupes reçoivent un traitement anti-inflammatoire par injection d'anti-inflammatoire non stéroïdien une fois par jour pendant 4 jours (Méloxicam<sup>®4</sup>, 0,5mg/kg, 0,1mL/100g, IM). Leur température est surveillée et rehaussée à l'aide de bouillottes jusqu'au réveil. Une protection hydratante oculaire est également renouvelée régulièrement au cours de la phase anesthésique (gel oculaire Ocry-gel). Un analgésique (Buprénorphine, 0,1mg/kg, Buprecare<sup>®</sup> 0,3mg/ml) est ajouté à leur eau de boisson et renouvelé pendant 72h après l'intervention.

### **b. Évaluation orthopédique post-opératoire immédiate**

Deux paramètres sont évalués immédiatement en post-opératoire :

- La laxité articulaire : évaluée par le signe du tiroir. Une note sur 3 est attribuée en fonction de l'intensité du signe du tiroir (0 : absence de tiroir, 1 : tiroir discret, 2 : tiroir modéré, 3 : tiroir franc). Le pourcentage d'individus présentant un signe du tiroir est établi à partir des individus ayant obtenu au moins une note de 1.

- La mobilité articulaire dans le plan sagittal, en flexion / extension : La capacité d'extension des grassetts opérés est évaluée sous anesthésie juste après la chirurgie, en exerçant sur les deux grassetts du rat une extension forcée. L'amplitude de flexion / extension possible est évaluée en comparaison de celle du grasset controlatéral, qui sert de témoin positif à cette évaluation. La flexion est évaluée de la même façon et une note sur 3 est attribuée en fonction de ces deux paramètres. (0 : Flexion et extension complète, 1 : Flexion et extension discrètement réduites, 2 : Flexion et extension sévèrement réduites, 3 : Flexion et extension impossibles). Le pourcentage d'individus présentant une flexion/extension réduite est établi à partir des individus ayant obtenu au moins une note de 1.

Ces paramètres sont également évalués indirectement et de façon subjective par d'autres aspects que le fonctionnel : empâtement articulaire du membre opéré par rapport au membre sain controlatéral ; cicatrisation des plaies (grasset et corde du jarret) ; continuité de la corde du jarret où s'est effectué le prélèvement (présence ou non d'une plantigradie). L'évaluation de ces mêmes paramètres est de nouveau réalisée sous anesthésie générale, juste avant le prélèvement des grassetts, permettant un suivi de leur évolution.

### **c. Suivi hebdomadaire**

A une surveillance quotidienne des animaux, s'ajoute des examens cliniques généraux, des examens rapprochés de la plaie chirurgicale, et un examen locomoteur toutes les semaines pendant 3 mois. Les résultats sont répertoriés dans des fiches de suivi individuelles (Tab. 4).

**Tableau 4 : Exemple de fiche de suivi clinique général et locomoteur**

ID ANIMAL	17		AUTOGREFFE				Poids T0	0,364kg		
DATE OP	13/03/2018						Circonférence cuisse préop : 65mm			
Evaluation clinique						Orthopédique	Evaluation des signes locaux			
Date	Poids (kg)	Tremblements	Yeux	Hydratation	Porphyrines et pelage	Boiterie (sur 5)	Œdème articulaire	Empâtement du membre	Aspect de la plaie	
14/03	0,371	non	ouvert	100 %	présent	0/5	présent	oui	propre	
15/03	0,357	non	ouvert	100 %	absent	0/5	présent	oui	propre	
16/03	0,357	non	ouvert	100 %	absent	0/5	diminué	non	Exteriorisation d'un fil	
30/03	0,344	non	ouvert	100 %	absent	0/5	absent	non	crouteux	
6/04	0,340	non	ouvert	100 %	absent	0/5	absent	non	propre	
11/04	0,345	non	ouvert	100 %	absent	0/5	absent	non	cicatrisé	
26/04	0,348	non	ouvert	100 %	absent	0/5	absent	non	cicatrisé	
06/06	0,362	non	ouvert	100 %	absent	0/5	absent	non	cicatrisé	
11/06	0,370	non	ouvert	100 %	absent	0/5	absent	non	cicatrisé	

- *Évaluation hebdomadaire clinique*

Les critères cliniques évalués sont inspirés du scoring de Hampshire et al. (*NINDS animal healthcare section rodent postoperative scoresheet*) : mesure du poids, mesure de la déshydratation, présence de tremblements, de porphyrines, évaluation de l'aspect du poil, fermeture des yeux, automutilation, attitude et posture.

- *Évaluation hebdomadaire des signes locaux*

Sont évalués :

- L'aspect de la plaie : déhiscence de plaie, présence de croûtes, suintement, extériorisation ou absence de fils de suture, signes d'automutilation
- La présence ou non d'un empâtement articulaire
- La présence ou non d'un œdème du membre opéré

- *Évaluation hebdomadaire orthopédique*

L'examen orthopédique hebdomadaire est pratiqué par une analyse visuelle de la démarche en liberté. Chaque individu est placé individuellement et à la suite dans une cage transparente large (30 x 40 x 20 cm) pendant 5 minutes. Deux évaluateurs attribuent indépendamment une note sur 5 et la moyenne de ces notes correspond à la note de boiterie hebdomadaire (Tab. 5).

**Tableau 5 : Scoring de boiterie utilisé pour l'évaluation orthopédique hebdomadaire**

Note de boiterie	
Pas de boiterie	0
Démarche hésitante	1
Boiterie sans appui intermittente	2
Boiterie sans appui fréquente	3
Boiterie sans appui permanente	4
Boiterie sans appui permanente avec amyotrophie marquée	5



#### d. Évaluation clinique de fin d'étude

A la fin de l'étude, avant le sacrifice et les prélèvements, une évaluation clinique est réalisée ; elle comprend :

- La mesure du poids de l'animal
- L'évaluation visuelle de la présence de boiterie (par observation de la démarche)
- L'évaluation par inspection et palpation comparative avec le membre sain controlatéral de la présence éventuelle d'anomalies (signes locaux : aspect de la plaie, présence ou non d'œdème loco-régional, gonflement articulaire)
- L'appréciation de l'amyotrophie par mesure de la circonférence du quadriceps (par la même méthode que celle présentée en pré-opératoire 2.3.1).

#### E. Sacrifices et prélèvements

Les animaux sont sacrifiés 3 mois après l'implantation, sous anesthésie générale (isoflurane / O<sub>2</sub>), afin de limiter le stress et la douleur. Le sacrifice est réalisé par injection intracardiaque de pentobarbital (5 mL/kg Dolethal® 182,2 mg/mL Vetoquinol). Les deux membres postérieurs sont prélevés et préparés en vue des examens indiqués dans le tableau 6.

Les grassets destinés à l'examen histologique sont conservés 7 jours dans du formol 10 %. Les examens sont ensuite réalisés selon l'ordre chronologique suivant : IRM et scanner, puis histologie.

Les pièces sur lesquelles sont pratiqués les examens de biologie moléculaire sont uniquement destinées à cette utilisation (Tab. 6).

**Tableau 6 : Protocole appliqué au grasset selon le groupe**

	Pièces destinées à l'IRM, au scanner et à l'histologie	Pièces destinées à la biologie moléculaire
Protocole	Décharnement des membres postérieurs Conservation de la capsule articulaire Section au 1/3 proximal du tibia Section au 1/3 distal du fémur Prélèvement de l'articulation avec capsule articulaire et rotule.	Décharnement des membres postérieurs Arthrotomie latérale Prélèvement de la partie intra-articulaire du grasset.  <i>Protocole réalisé en conditions d'asepsie.</i>
Conservation	Formol 10 %	

#### F. Analyse des pièces prélevées

##### a. Étude nécropsique

Après le sacrifice, deux paramètres sont de nouveau évalués, avec le même système de notation qu'en post-opératoire immédiat (voir 2.4.2) :

- La laxité articulaire
- La mobilité articulaire

Une comparaison avec les valeurs obtenues en post-opératoire immédiat permet d'appréhender l'évolution de l'instabilité et de la laxité ligamentaire au cours des 3 mois de l'étude.

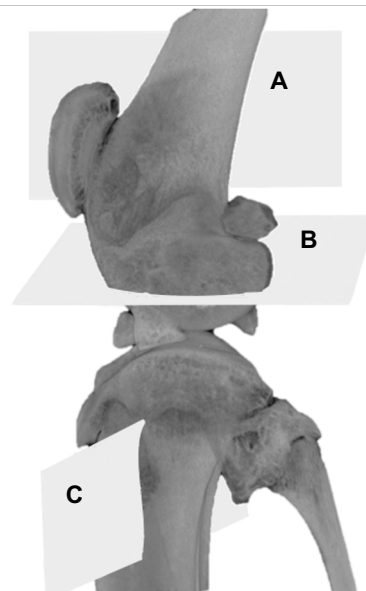
### **b. Étude par imagerie à résonance magnétique (IRM)**

Un examen IRM est réalisé sur chaque échantillon (au total 10 grassets opérés et 10 grassets controlatéraux) afin de visualiser l'autogreffe en renfort et son intégrité. Les acquisitions sont effectuées au sein de la Plateforme IRM Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire – Hôpital Européen Georges Pompidou (PARCC-HEGP) à l'aide d'une IRM 4,7 Tesla (Bruker BioSpin MRI GmbH, équivalent 7 Tesla avec cryosonde) en séquence FISP Siemens T1/T2\*, avec une résolution isotrope de 50  $\mu\text{m}$ . Les reconstructions sont obtenues en coupes axiales, sagittales et coronales (Fig. 9).

Le paramètre étudié est l'intégrité de l'autogreffe. L'évaluation se fait sur l'ensemble du trajet de l'autogreffe (intra-osseux et intra-articulaire), pour les 3 types de reconstructions (axiale, sagittale et coronale) (Fig. 10), et permet de classer les autogreffes selon leur intégrité :

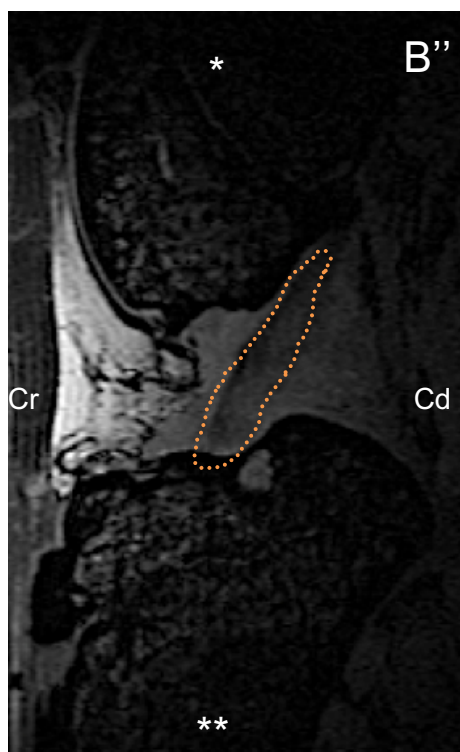
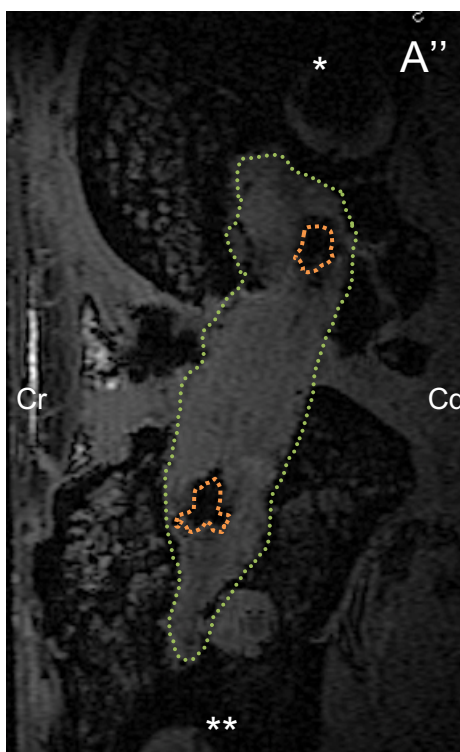
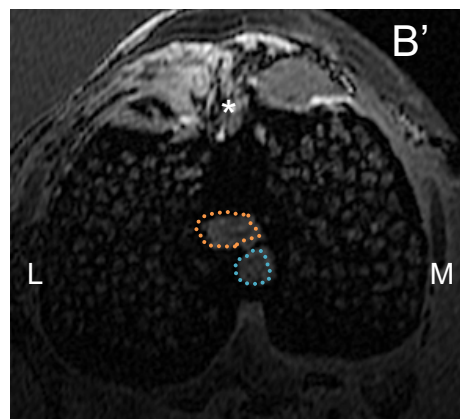
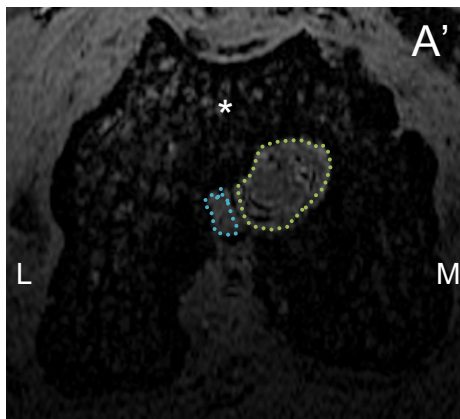
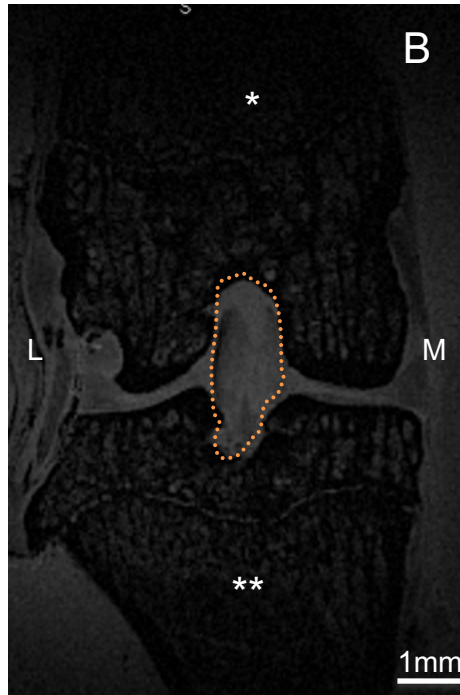
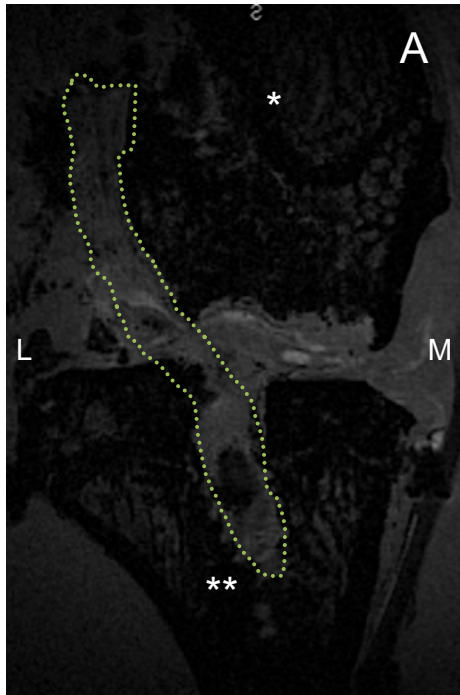
- **Intègre** : Visualisation d'une continuité tissulaire tout le long du trajet en coupes axiale, sagittale et coronale.
- **Rompue à moins de 50 %** : Visualisation d'une solution partielle de continuité tissulaire en coupe axiale, sagittale et coronale, avec toujours plus de 50 % du diamètre de l'autogreffe intègre sur les coupes axiales le long du trajet.
- **Rompue à plus de 50 %** : Visualisation d'une solution partielle de continuité tissulaire en coupe axiale, sagittale et coronale, avec moins de 50 % du diamètre de l'autogreffe intègre sur au moins une coupe axiale le long du trajet.
- **Totalement rompue** : Visualisation d'une solution de continuité tissulaire en coupe axiale, sagittale et coronale, avec absence complète de continuité sur au moins une coupe axiale le long du trajet.

**Figure 9 : Orientation des coupes IRM : sagittale (A), axiale (B), et coronale (C).**



Grasset avec autogreffe

Grasset intègre



**Figure 10 : Images IRM séquence FISP en coupe sagittale, axiale et coronale, d'un grasset gauche opéré avec l'AG (A, A', A''), et d'un grasset droit non opéré (B, B', B'').**

Coupes sagittales

A et B

- AG (trait vert)
- LCCr (trait orange)
- Grasset (\*)
- Tibia (\*\*)
- Médial (M)
- Latéral (L)
- Cranial (Cr)
- Caudal (Cd)

Coupes axiales

A' et B'

- AG (trait vert)
- LCCr (trait orange)
- LCCd (trait bleu)

Coupes coronales

(A'' et B'')

- AG (trait vert)
- LCCr (trait orange)
- Tunnels osseux d'ancrage de l'AG (traits rouges)

### **c. Histologie et histomorphométrie**

L'examen histologique est réalisé dans le but d'évaluer la colonisation tissulaire de l'autogreffe en sites intra-osseux et intra-articulaire, l'inflammation associée, l'état du coussinet adipeux infra-patellaire (CAIF), les lésions cartilagineuses, ainsi que l'épaisseur de la membrane synoviale.

- *Protocole de préparation histologique (Fig. 12, Annexe 1)*

L'ensemble du protocole de préparation des lames histologiques est réalisé au laboratoire de biologie, bio-ingénierie et bio-imagerie ostéo-articulaire (B3OA) UMR7052 (Paris, 75010).

#### ▪ Inclusion des échantillons en polyméthylmétacrylate (PMMA)

*Matériel* : piluliers en plastique avec trou pour le lavage à l'eau courante, pilulier en verre pour l'inclusion, papier absorbant.

*Réactifs* : Alcool 100°, Xylène, Méthacrylate, Dibutylphtalate, Benzoyle peroxyde.

Les 28 échantillons (14 grassets du groupe SS et 14 grassets du groupe AG) d'environ 1,5 cm<sup>3</sup> sont lavés, déshydratés et imprégnés dans différents bains puis sont inclus dans une solution de PMMA à 2 %, pendant 48 heures et jusqu'à durcissement.

Une fois inclus, les échantillons sont affinés par sciage de l'excédent de PMMA puis fixés sur un socle en résine.

#### ▪ Coupe et polissage des échantillons

*Matériel* : Machine de ponçage et polissage (Mecapol P301), machine de polissage (EXAKT™), tronçonneuse de précision (MT Micro Hergon), lames en plexiglas, stylo graveur, colle super glue (lotite), alumine en poudre, scie circulaire avec disque diamanté.

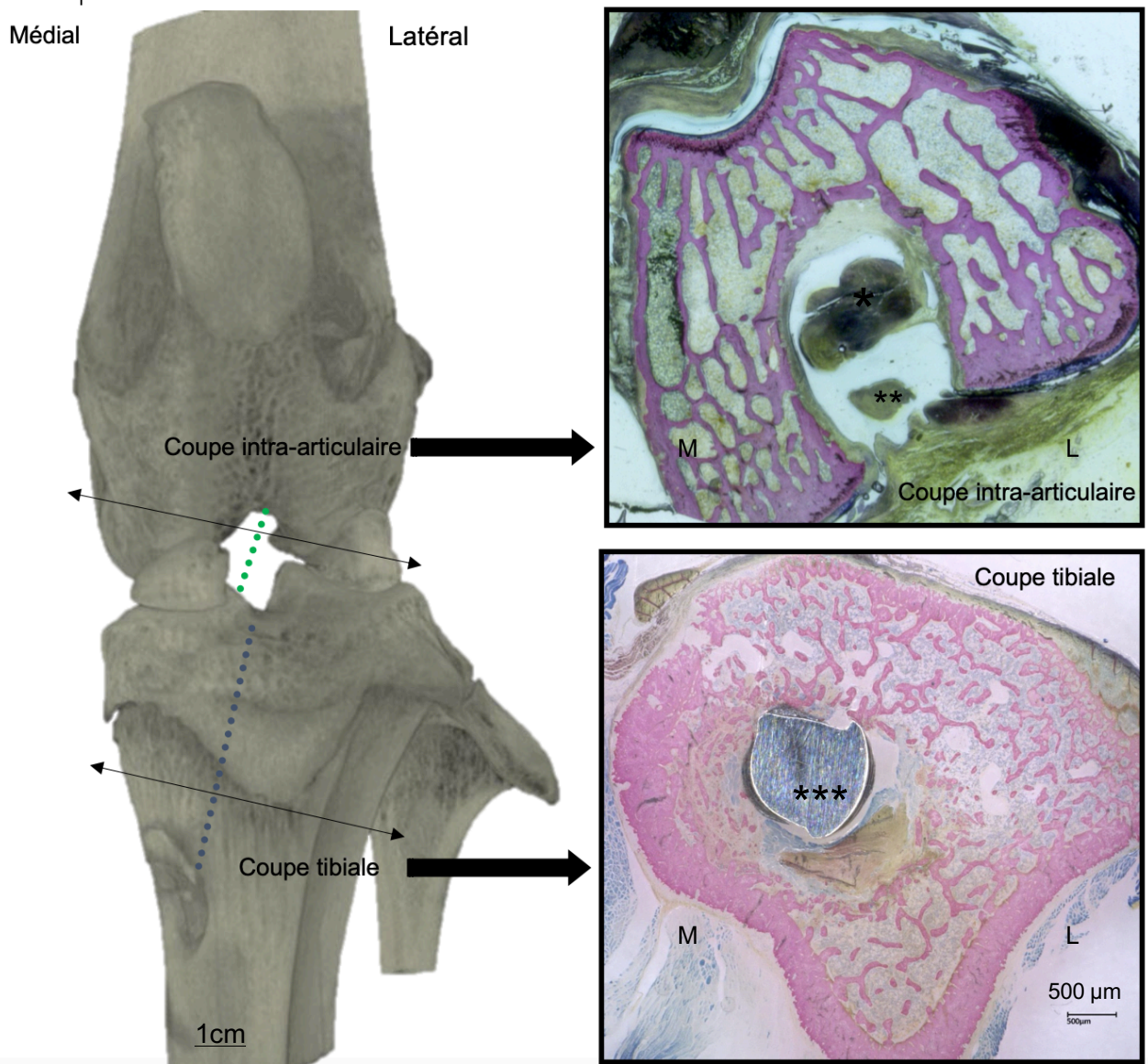
Des coupes transversales de 500 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide de la scie circulaire à disque diamanté. Trois coupes en intra-articulaires et trois coupes en intra-osseux (tibia), transversales sur tibia, sont réalisées (Fig. 11). La portion intra-articulaire comporte les renforts ligamentaires ou tendineux incluant les restes du LCCr sectionné, les massifs épiphyso-métaphysaires fémoraux et tibiaux incluant les tunnels osseux, la membrane synoviale, la rotule et le coussinet adipeux.

Pour les grassets du groupe AG, le plan de coupe des coupes tibiales s'effectue perpendiculairement au tunnel osseux tibial. Le trajet intra-osseux théorique est dessiné sur le bloc de PMMA. Pour les coupes intra-articulaires, le plan de coupe est ajusté de manière à être perpendiculaire au trajet de l'autogreffe (Fig. 11).

Pour les grassets du groupe SS, les coupes sont réalisées selon la même orientation afin d'assurer la répétabilité des analyses histologiques. Les coupes sont par la suite collées sur les lames de plexiglas, qui sont enfin poncées et polies.



**Figure 11 : Orientations des coupes histologiques transversales sur un grasset opéré**



Doubles flèches noires : Orientation des coupes histologiques transversales sur une reconstruction 3D de l'articulation au microscanner. Les coupes sont réalisées dans un premier plan perpendiculaire au tunnel osseux tibial (trait bleu) puis dans un second plan perpendiculaire au trajet intra-articulaire de l'autogreffe (trait vert). LCCr (\*), LCCd (\*\*), vis tibiale (\*\*\*).

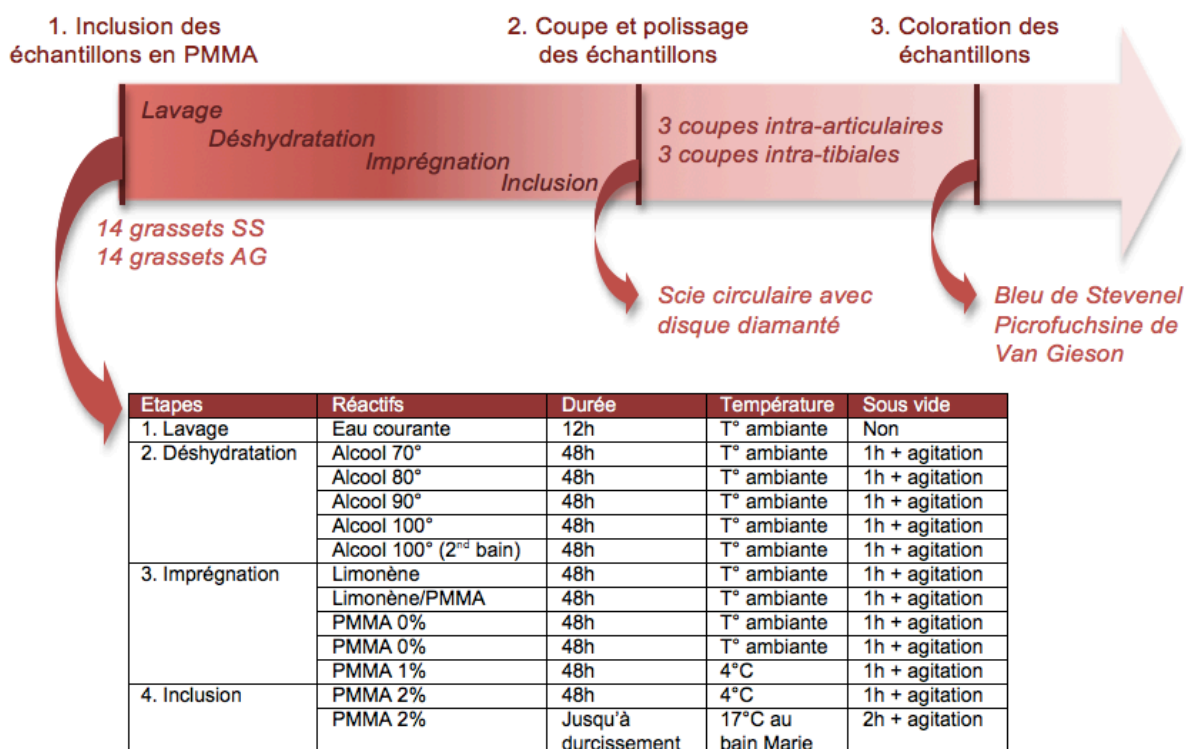
- Coloration des lames

Matériel : bain marie, thermomètre, cuves de coloration (x 6), porte lames, papier absorbant.

Réactifs : Bleu de Stevenel, picrofuchsine de Van Gieson, Alcool absolu, Eau milli Ro.

Le bleu de Stevenel colore en différentes teintes de bleu les composants nucléaires, cytoplasmiques et extra-cellulaires. La picro-fuschine de Van Gieson colore en rouge le collagène, en jaune le cytoplasme et en bleu-noir les noyaux cellulaires.

**Figure 12 : Schéma récapitulatif du protocole de préparation des lames histologiques**



- *Évaluation des lames histologiques*

Les coupes histologiques sont observées au microscope optique à divers grossissements (x5, x20 et x40) puis numérisées au microscope digital Keyence VHX-2000 aux objectifs 20-200X et 100-1000x.

Différentes structures sont évaluées :

- L'autogreffe sur les grassets opérés des rats du groupe AG

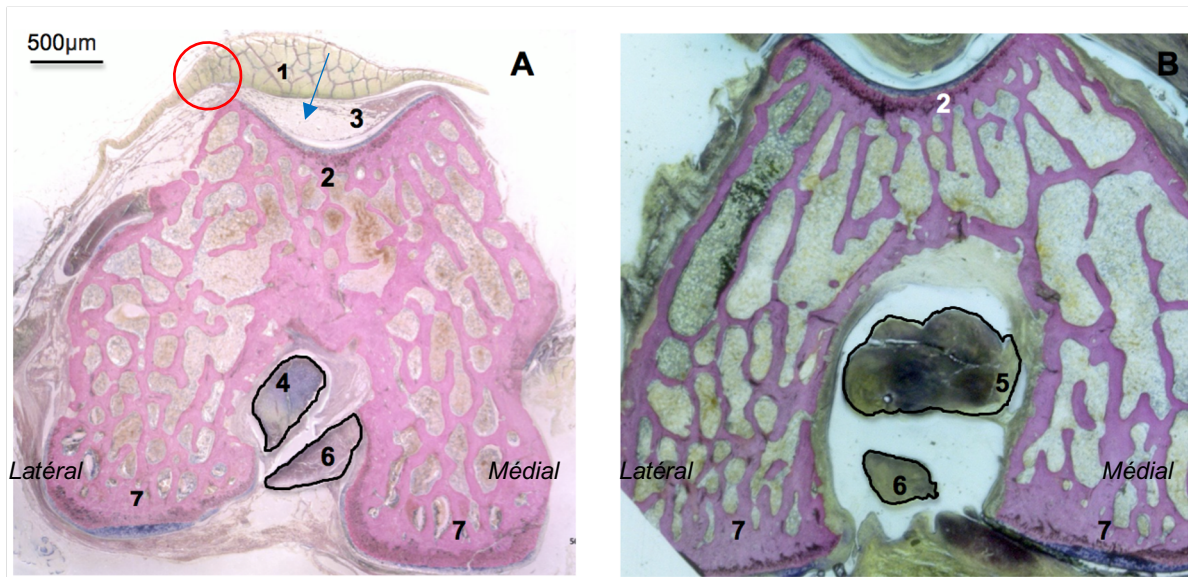
Et, chez les individus des deux groupes :

- Le coussinet adipeux intra-patellaire (CAIF)
- Le cartilage articulaire
- La membrane synoviale
- Les restes ligamentaires du LCCr sectionné (ou intègre dans le cas des grassets non opérés) (Fig. 13).

Sur l'ensemble des paramètres évalués, les grassets contro-latéraux, non opérés, ont servi de témoin. L'évaluation des paramètres sur chacune des 6 coupes d'un grasset opéré aboutit à une valeur moyenne par grasset pour chaque paramètre. Les paramètres évalués sont présentés ci-dessous.

Concernant les grassets des rats du groupe SS, tous les paramètres sont évalués de la même façon, à l'exception du degré de colonisation cellulaire du greffon, et de l'intensité de l'ostéo-intégration.

**Figure 13 : Vues intra-articulaires parapatellaires comparées d'une articulation saine (A) et d'une articulation opérée avec une autogreffe (B).**



A : Grasset droit (sain) du rat 20 ; B : Grasset gauche (opéré) du rat 20 ; 1 : Rotule, 2 : Trochlée, 3 : CAIF, 4 : LCCr, 5 : Autogreffe, 6 : ligament croisé postérieur (LCP), 7 : condyles fémoraux. Point d'évaluation de la membrane synoviale (cercle rouge) cartilage articular (flèche bleue).

#### Degré de colonisation cellulaire (Tab. 7)

Le degré de colonisation cellulaire a été évalué par 4 paramètres à l'aide d'un score allant de 1 à 3 pour chacun d'eux (Funakoshi *et al.*, 2007). La note de 0 correspond au grasset du rat pilote, sacrifié immédiatement après implantation (colonisation cellulaire inexistante).

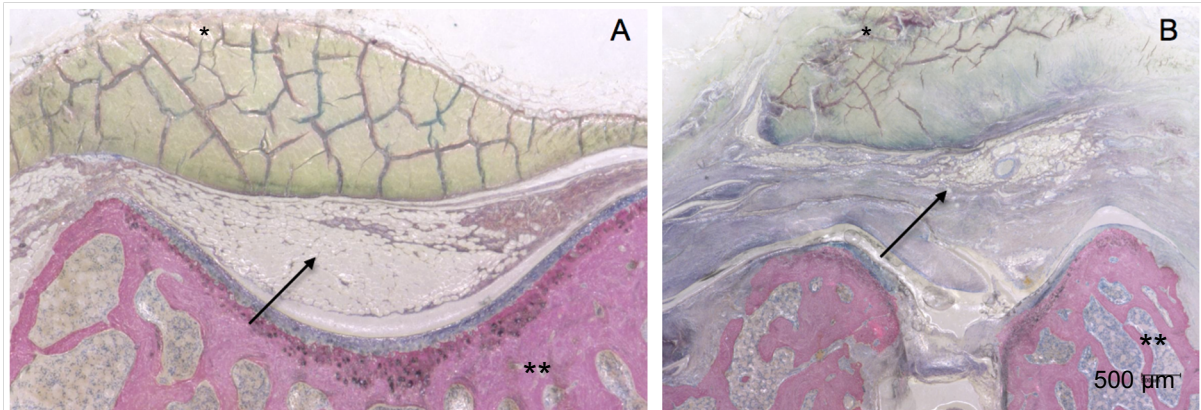
- Évaluation de l'organisation fibrillaire du greffon.
- Évaluation de la néovascularisation du greffon.
- Évaluation de la cellularité du greffon.
- Nombre de cellules géantes inflammatoires envahissant le greffon.

#### Fibrose et cellularité du CAIF (Fig. 14, Tab. 8)

L'infiltration cellulaire à la surface du coussinet adipeux et la densité de fibrose au sein du coussinet adipeux sont évaluées d'après le scoring mesurant l'inflammation du coussinet adipeux infra-patellaire (Udo *et al.*, 2016), sur une échelle de 0 à 6 points à l'aide d'un score modifié à partir du score d'Osteoarthritis research Society International (OARSI).



**Figure 14 : Coupes histologiques parapatellaires d'un CAIF droit (grasset sain) et d'un CAIF gauche (grasset opéré, groupe AG)**

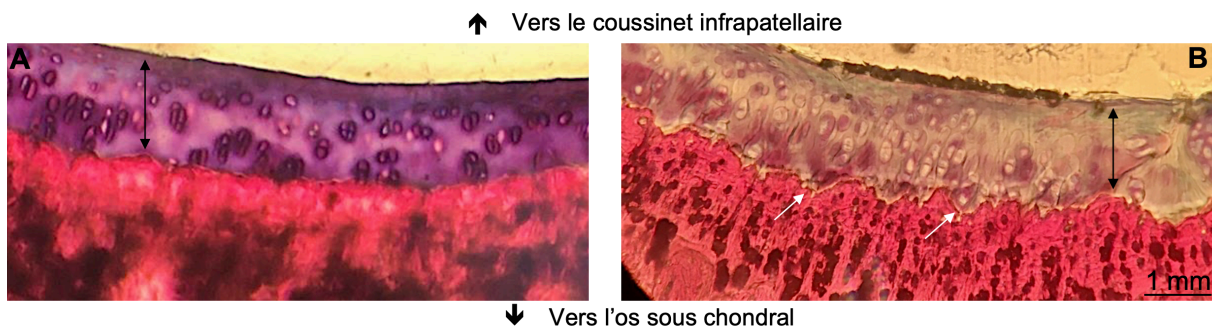


A : CAIF sain ; B : CAIF de grasset opéré (groupe AG). Noter les remaniements tissulaires et le remplacement du tissu adipeux par du tissu fibreux. (\* : Patelle ; \*\* : os sous-chondral)

**Lésions cartilagineuses (Fig 15, Tab. 9)**

Les lésions cartilagineuses sont évaluées pour chaque grasset en région parapatellaire, à l'aide d'un score de Mankin modifié (Panahifar *et al.*, 2014), sur une échelle de 0 à 14 points.

**Figure 15 : Coupes histologiques transversales de la région ostéo-chondrale illustrant les anomalies notées en cours d'analyse.**



(A) Cartilage (double flèche noire) de grasset sain, non opéré. (B) Cartilage (double flèche noire) lésé d'un grasset opéré : noter la surface irrégulière du cartilage (flèches blanches), l'hypocellularité relative et la décoloration sévère.



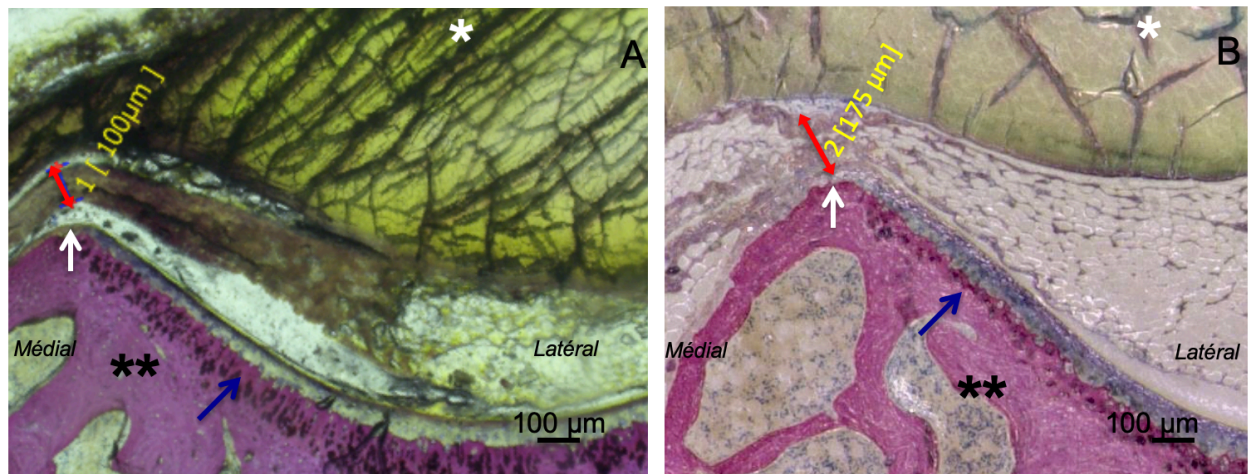
## Épaisseur de la membrane synoviale (Fig. 16)

Afin de standardiser les mesures, un point de repère répétable et dans une zone non lésée par l'arthrotomie est choisi : au niveau du condyle interne, en limite latérale du cartilage trochléaire, sur une coupe transversale de la membrane synoviale en région para-patellaire médiale (Fig. 13A).

L'épaisseur de la membrane synoviale de chaque échantillon est calculée en réalisant la moyenne de 9 mesures effectuées par échantillon (3 mesures par coupes, 3 coupes par échantillon). Ces calculs sont effectués sur l'ensemble des grassetts (sains et opérés).

Toutes les mesures sont effectuées par le même opérateur à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Keyence Communication Software Version 2.35 pour VHX-2000).

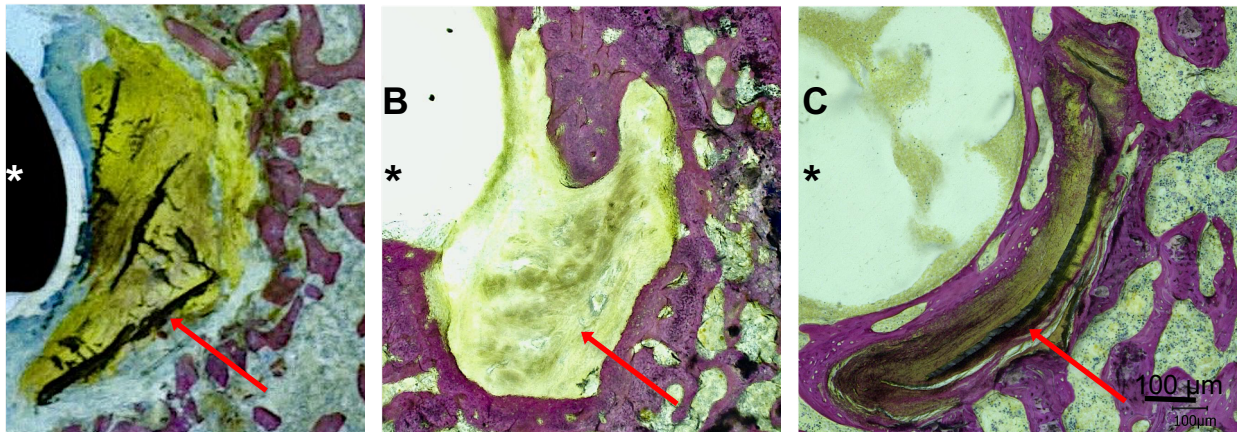
**Figure 16 : Coupes histologiques parapatellaires de membrane synoviale montrant la mesure de l'épaisseur de la membrane synoviale d'un grasset sain droit non opéré (A) et d'un grasset gauche opéré (groupe AG) (B).**



Flèche rouge : épaisseur de la membrane synoviale 1 (A) et 2 (B). Noter la désorganisation de la membrane (B), le repère anatomique utilisé pour effectuer la mesure (bord latéral de l'échancrure trochléaire (flèche blanche), le cartilage (flèche bleue), l'os sous-chondral (\*\*), la rotule (\*).

## Ostéointégration du greffon (Fig. 17, Fig. 18, Tab. 10)

**Figure 17 : Coupes histologiques tibiales distales de grassetts opérés montrant les différents degrés d'ostéointégration**



Absente chez le rat (témoin) de l'étude pilote (A), absente chez un rat à  $T_{0+3\text{mois}}$ , et forte ostéointégration chez un autre rat à  $T_{0+3\text{mois}}$  (C). Vis d'interférence (\*) et greffons (flèche rouge).

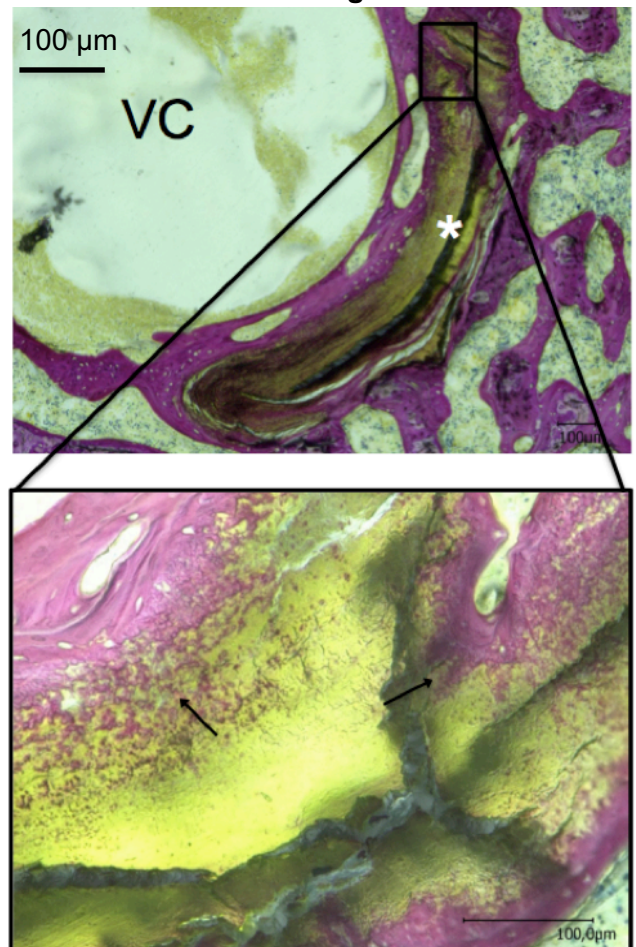
L'ostéointégration du greffon est quantifiée par une évaluation visuelle sur la coupe tibiale la plus distale des grassetts opérés du groupe AG, le rat de l'étude pilote à T0 servant de comparaison (Fig 18-A).

En fonction de la pénétration de la surface osseuse (coloration rose) au sein du greffon, une note est attribuée (Persson *et al.*, 2001). Ce paramètre n'est pas évalué chez les individus du groupe SS.

### Devenir des restes ligamentaires du LCCR sectionné et interaction avec l'autogreffon

Cette partie se limitera à une analyse descriptive, répondant aux interrogations suivantes:

**Figure 18 : Coupe histologique tibiale distale d'un grassetts opéré montrant l'ostéointégration**



VC : vis corticale d'interférence. \* : Autogreffe. Noter l'ostéointégration (flèches noires)

Concernant le groupe AG :

- Les restes ligamentaires du LCCr sectionné sont-ils discernables de l'autogreffe ? des tissus adjacents ?
- Si la visualisation est possible, y a-t-il une interaction entre le LCCr résiduel et le greffon ? Si oui, de quel type (fibreuse, prolifération cellulaire) ?

Concernant le groupe SS :

- Les deux extrémités sectionnées du LCCr sont-elles identifiables ?
- Si oui, y a-t-il des signes d'atrophie ou de reconstruction ?

Les grassets controlatéraux, avec leurs LCCr intacts sont les témoins de ces évaluations.

**Tableau 7 : Scoring utilisé pour l'évaluation de la colonisation cellulaire de l'autogreffe**

<b>Organisation fibrillaire du greffon</b>		<b>[0-3]</b>
Absence de fibres		0
Fibres complètement fragmentées et désorganisées		1
Fibres fragmentées, partiellement ou localement désorganisées		2
Fibres organisées et parallèles, calibre identique		3
<b>Néovascularisation du greffon</b>		<b>[0-3]</b>
Pas de vaisseaux		0
Présence normale de vaisseaux		1
Présence importante		2
Présence très importante		3
<b>Cellularité du greffon</b>		<b>[0-3]</b>
Absence de cellules		0
Cellularité faible		1
Cellularité moyenne		2
Cellularité importante		3
<b>Nombre de cellules géantes</b>		<b>[0-3]</b>
Absence		0
Total <5		1
Total entre 5 et 10		2
Total >10		3

**Tableau 8 : Scoring utilisé pour l'évaluation histologique du CAIF (Udo *et al.*, 2016)**

<b>Infiltration cellulaire à la surface du CAIF</b>		<b>[0-3]</b>
Normale		0
Cellularité augmentée, présence de cellules multinucléées		1
Augmentation peu marquée des couches cellulaires (moins de 3 fois l'épaisseur normale de la membrane synoviale)		2
Augmentation marquée des couches cellulaires (plus de 3 fois l'épaisseur normale de la membrane synoviale)		3

Fibrose dans le corps du CAIF [0-3]	
Absence de fibrose dans le corps du CAIF	0
Présence faible	1
Présence importante	2
CAIF entièrement fibrosé, cellules adipeuses absentes	3

**Tableau 9 : Scoring utilisé pour l'évaluation histologique du cartilage (Panahifar *et al.*, 2014)**

Structure [0-6]	
Normale	0
Surface irrégulière	1
Présence d'un pannus et surface irrégulière	2
Fissures dans la zone de transition	3
Fissures dans la zone radiaire	4
Fissures dans la zone calcifiée	5
Désorganisation complète	6
Cellules [0-6]	
En quantité normale (identique rat témoin)	0
Hypercellularité diffuse	1
Clones cellulaires	2
Hypocellularité	3
Coloration de la matrice extra-cellulaire [0-4]	
Normale	0
Diminution discrète	1
Diminution modérée	2
Diminution sévère	3
Aucune coloration	4
Intégrité de la ligne de séparation entre le cartilage et l'os sous chondral [0-1]	
Intacte	0
Traversée de vaisseaux sanguins	1

**Tableau 10 : Scoring de l'ostéointégration**

Degré de pénétration osseuse de la surface du greffon	Importance de l'ostéointégration	[0-4]
0 % de la surface	Nulle	0
25 % de la surface	Discrète	1
50 % de la surface	Modérée	2
75 % de la surface	Importante	3
100 % de la surface	Complète	4



#### d. Étude tomодensitométrique (TDM)

Un examen tomодensitométrique par micro-scanner (Skyscan 1172™ microCT) est effectué sur l'ensemble des grassets prélevés avant leur imprégnation en PMMA (soit au total 10 grassets opérés et 10 grassets controlatéraux) afin d'évaluer le diamètre des tunnels osseux, la densité minérale osseuse et la microarchitecture osseuse, reflets de la solidité de l'os et indicateurs indirects complémentaires de la qualité de l'appui du membre (Lelovas *et al.*, 2008).

L'acquisition est effectuée à l'aide du logiciel Skyscan 1172™ microCT Ver. 1.5 paramétré de la manière suivante :

- Voltage 80kV – Ampérage 100μA
- Filtre : Al 0,5mm
- Temps d'exposition : 100ms
- Résolution : 19,98μm
- Pas de rotation : 0,3°

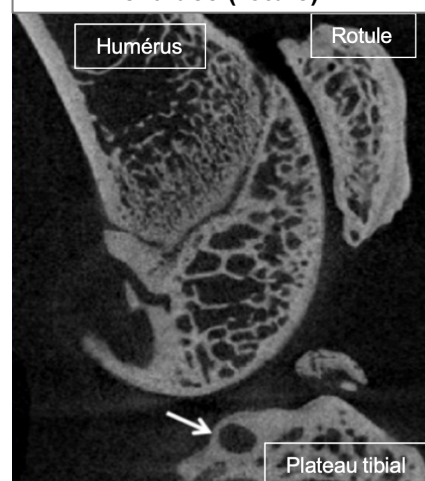
La reconstruction des échantillons est réalisée à l'aide du logiciel NRecon Ver. 1.7.1.6 (Skyscan). Les données sont traitées en utilisant :

- Un seuil global fixe de 82 à 255 niveaux de gris
- Une correction du durcissement du faisceau de 20 %
- Un seuil de masquage des pixels défectueux de 50 %
- Un pas de progression angulaire de 0,3°
- Une correction de l'artéfact circulaire de 3 unités

Le logiciel CTAn Ver. 1.5 (Skyscan) est ensuite utilisé afin de déterminer chez chaque animal, les paramètres suivants :

- **La densité minérale osseuse (DMO)** mesurée pour chaque grasset, opéré et controlatéral non opéré. La région d'intérêt choisie est la rotule prise dans son intégralité, sur os cortical et spongieux (Fig. 19). Afin de tenir compte des variabilités individuelles, le résultat exploité est le rapport des valeurs mesurées des côtés opéré et controlatéral sain :  $DMO_{\text{grasset opéré}}/DMO_{\text{grasset sain}}$ .
- **La microarchitecture osseuse.** Pour chaque grasset, opéré et controlatéral non opéré, la région d'intérêt choisie est la rotule. Après étalonnage, l'épaisseur Ep.Tr., le nombre Nb.Tr. et la séparation Sp.Tr. des trabécules sont étudiés, ainsi que le rapport volume osseux / volume total VO/VT. Pour chaque paramètre, le résultat exploité est le rapport des valeurs obtenues des côtés opérés et sain (à titre d'exemple pour l'épaisseur trabéculaire :  $Ep.Tr._{\text{grasset opéré}} / Ep.Tr._{\text{grasset sain}}$ ).

**Figure 19 : Image tomодensitométrique de coupe sagittale d'un grasset opéré montrant la région d'intérêt évaluée (rotule).**



Noter la présence d'un kyste osseux (flèche blanche)

#### e. Biologie moléculaire et immunohistochimie

Au moment du sacrifice, pour 2 rats de chacun des 2 groupes, un prélèvement intra-articulaire est réalisé en conditions d'asepsie du côté opéré (prélèvement de l'autogreffe) et du côté controlatéral non opéré qui sert de témoin (prélèvement du ligament natif). L'ensemble des manipulations de

biologie moléculaire sont effectuées par le laboratoire de biomatériaux pour la Santé (LBPS) UMR 7622 – Université Paris 13.

Les différents marqueurs étudiés sont :

- Les marqueurs de l'inflammation : les métalloprotéases matricielles MMP1 et MMP13, l'interleukine IL1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), la fibronectine (FN).
- Les marqueurs de la colonisation tissulaire :
  - o Spécifique des ligaments/tendons : le facteur de transcription scleraxis (Scx), la protéine ténomoduline (Tnmd), les chaînes de collagène I  $\alpha$ 1 (Col1 $\alpha$ 1), et collagène III alpha 1 (Col3 $\alpha$ 1)
  - o Spécifique du cartilage : le facteur de transcription la protéine sex determining region Y box 9 (Sox9), le protéoglycane majeur du cartilage articulaire (Aggrecan), la chaîne de collagène Col2 $\alpha$ 1, le Tumor necrosis factor (TNF)

Les grassets prélevés sont placés dans 500 $\mu$ L de tampon RNeasy (Qiagen®) et conservés à 4°C. Avant extraction d'acide ribonucléique (ARN), ils sont dissociés à la collagénase. L'extraction d'ARN est effectuée selon le protocole recommandé par le fabricant du kit Qiagen® (cf. Annexe 1). Les ARN sont dosés puis conservés à -20°C jusqu'à la transcription inverse, qui est réalisée selon le protocole recommandé par le fabricant du kit High Capacity cDNA reverse transcription de Life Technologies® (cf Annexe 1). La réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) est ensuite réalisée selon le programme détaillé en Annexe 1.

Les données exploitées sont, pour chaque échantillon, les expressions relatives des gènes cibles dans l'échantillon à analyser (autogreffe et section simple, côté opéré) par rapport au témoin (ligament natif, côté controlatéral non opéré).

## G. Étude statistique

Les données quantitatives sont exprimées en moyennes et écart-types lorsqu'elles suivent une loi normale. Dans le cas contraire, elles sont exprimées en médiane et quartiles.

L'analyse statistique des résultats a porté sur la comparaison, pour les 2 groupes AG et SS, des données suivantes :

- **Durées opératoires**
- **Poids moyens pré- et post-opératoires**
- **Données fonctionnelles**
  - Présence ou non d'une boiterie à T<sub>0+3mois</sub>
  - Présence ou non d'une laxité articulaire à T<sub>0+3mois</sub>
  - Diminution ou non de l'amplitude de flexion/extension à T<sub>0+3mois</sub>
  - Présence ou non d'une amyotrophie à T<sub>0+3mois</sub>
  - DMO des rotules
  - Microarchitecture osseuse (épaisseur trabéculaire, séparation des trabécules, nombre de trabécules, volume osseux/volume total)
  - Score OARSI modifié pour les lésions arthrosiques
- **Données biologiques**
  - Épaisseur de la membrane synoviale
  - Score OARSI modifié pour les lésions du CAIF

- Score de cellularité dans le tunnel osseux tibial et en intra-articulaire
- Score de vascularisation en intra-articulaire
- Score de cellules géantes en intra-articulaire
- Score d'organisation des fibres de collagène en intra-articulaire
- Score de Mankin modifié pour les lésions cartilagineuses

Le test statistique utilisé pour l'analyse des variables qualitatives (données fonctionnelles telles que « boiterie », « laxité articulaire », « amplitude de flexion/extension ») est le test de Fisher car c'est un test d'égalité de variance (mesure de la dispersion des valeurs) entre deux lois normales (la loi normale est la meilleure loi pour modéliser un phénomène naturel). Ce test particulièrement sensible à la non normalité, est spécialement réservé aux petits échantillons. Les paramètres seront exprimés en pourcentages.

Les tests statistiques utilisés pour l'analyse des variables quantitatives (durées opératoires, poids, données biologiques et données fonctionnelles telles que « DMO des rotules », « épaisseur des trabécules », « nombre de trabécules », « séparation des trabécules », « volume osseux/volume total » et « score OARSI modifié pour les lésions arthrosiques ») sont les suivants :

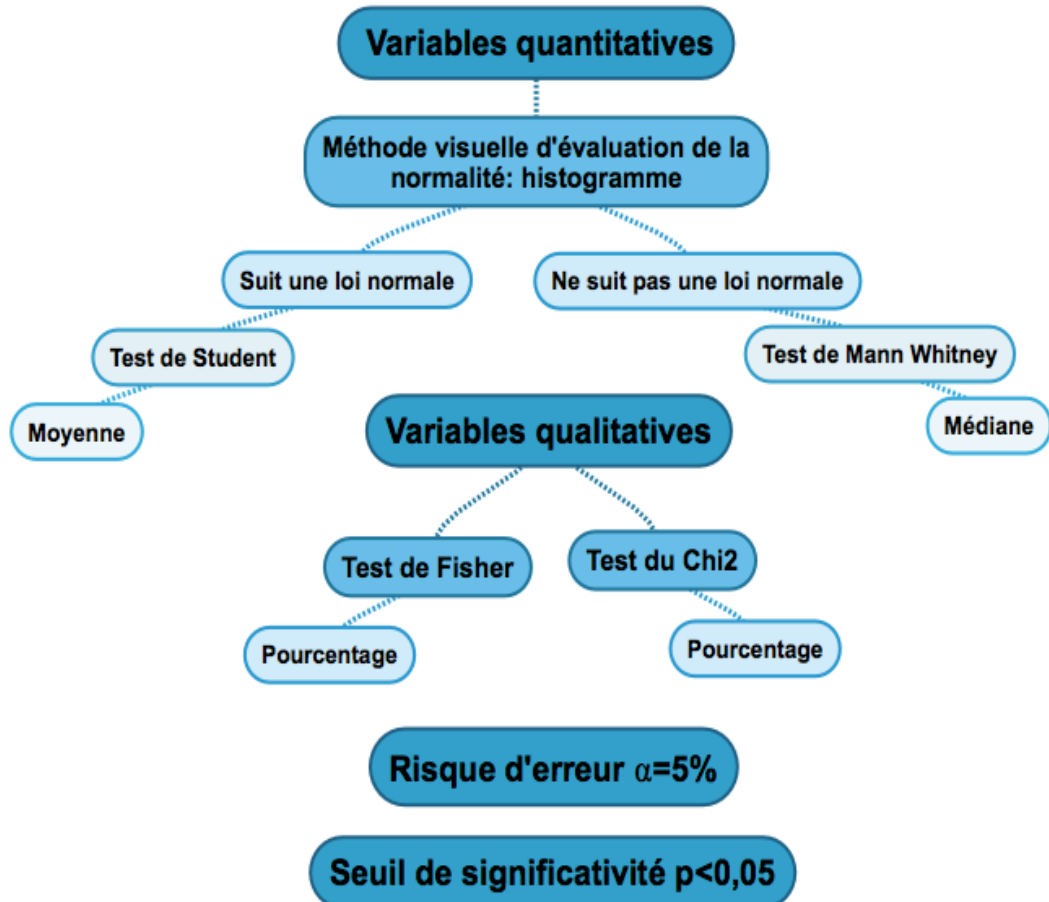
- Test de Mann-Whitney si la distribution du paramètre évalué ne suit pas une loi normale. Le paramètre est alors exprimé en médiane.
- Test de Student si la distribution du paramètre évalué suit une loi normale. Le paramètre est alors exprimé en moyenne.

Concernant les statistiques sur séries appariées (séries de valeurs provenant d'un même individu (courbe de poids...) donc non indépendantes entre elles) si le paramètre évalué est binaire (présent ou non) le test utilisé sera le test de McNemar. Si le paramètre évalué est quantitatif (poids) le test utilisé sera le test de Student pour séries appariées (si le paramètre est exprimé en moyenne) et le test de Wilcoxon pour séries appariées (si le paramètre est exprimé en médiane).

Ces tests sont réalisés après une évaluation préalable de la normalité de la distribution des paramètres par méthode visuelle à l'aide d'un histogramme (site web : <https://www.socscistatistics.com/descriptive/histograms/>) (Fig. 20).

Le seuil de significativité retenu pour l'ensemble des tests est  $p < 0.05$  de manière unilatérale. Le risque d'erreur est fixé à 5 %. Les tests statistiques ont tous été effectués à l'aide du site web BiostaTGV (<https://biostatgv.sentiweb.fr/>).

Figure 20 : Diagramme décisionnel du choix de test statistique





### 3. Résultats

#### A. Faisabilité et innocuité de la procédure chirurgicale

La durée médiane de l'intervention chirurgicale est de :

- 60 min [45 ; 60] pour le groupe AG.
- 20 min [15 ; 30] pour le groupe SS.

Il existe une différence significative entre les deux groupes pour la durée de l'intervention ( $p=0,002$  ; Test de Mann-Whitney).

Les incidents ou accidents observés au cours de chaque procédure sont référencés :

- Concernant l'intégrité de l'autogreffe : rupture du greffon (trop fin) au moment de sa fixation par vis (2 rats). Dans les deux cas, le greffon a été repositionné car de longueur utile suffisante dans une moindre mesure puis vissé à nouveau.
- Concernant la laxité articulaire en tiroir crânial post-opératoire immédiat : franche laxité dans un cas du groupe AG et discrète laxité dans 3 cas du groupe AG.
- Concernant le forage osseux et le glissement du greffon : un cas de difficulté de glissement du greffon (trop large) dans le tunnel tibial. Un cas de forage fémoral trop crânial.
- Concernant les lésions intra-articulaires : un cas de section concomitante du LCCr et LCCd chez un rat du groupe SS.
- Concernant les lésions extra-articulaires : Hémorragie post-section du LCCr chez un cas du groupe AG. Une hémostase est réalisée par compression.

Le nombre de rats utilisables à terme est présenté dans le tableau 11.

**Tableau 11 : Inclusion des animaux dans l'étude**

Nombre de rats Utilisables à terme	Clinique	Histologie, IRM, Scanner	Biologie moléculaire
	14 rats / 28 grassets prélevés (7 SS et 7 AG)	10 rats / 20 grassets prélevés (5 SS et 5 AG)	4 rats / 8 grassets prélevés (2 SS et 2AG)

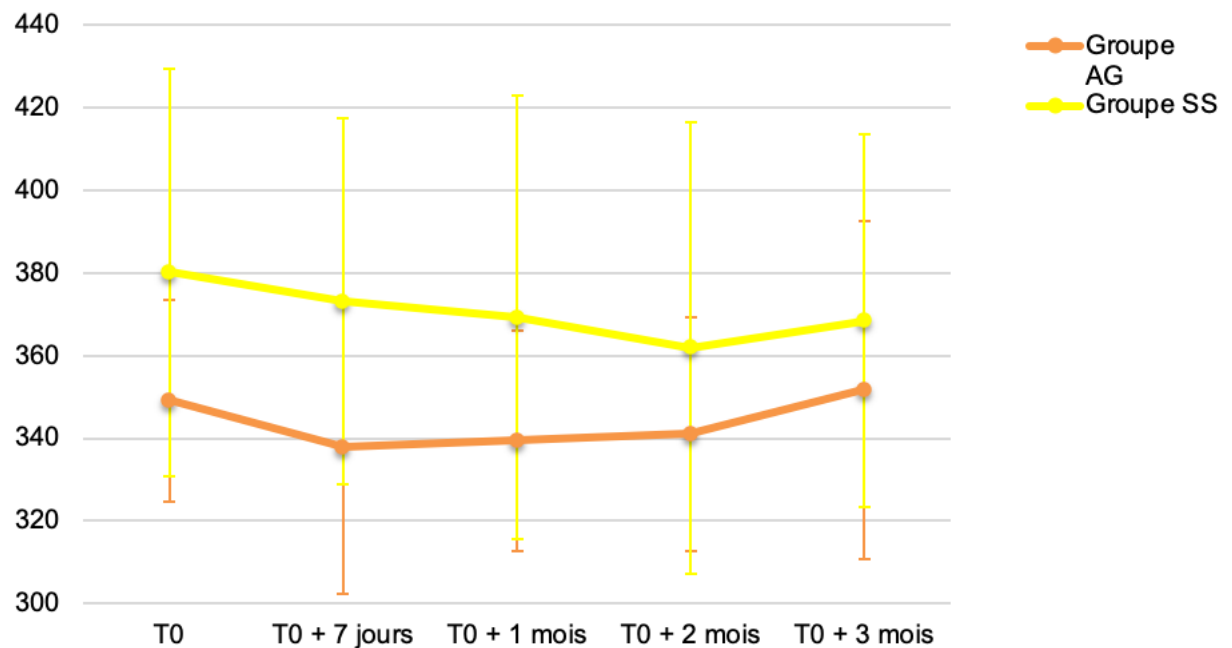
## B. Biofonctionnalité

### a. Évaluation de l'appui

- Évolution des signes fonctionnels
  - [Évolution pondérale \(Fig. 21\)](#)

Les courbes de poids des rats opérés sont globalement linéaires indiquant une prise de nourriture et un état de bien-être correct, d'après le scoring d'Hampshire (Hampshire *et al.*, 2001). On note, pour la majorité des rats implantés avec une autogreffe, une baisse de poids au lendemain de l'intervention chirurgicale.

**Figure 21 : Évolution comparative du poids des deux groupes sur les trois mois post-implantation**



Le poids moyen préopératoire des rats est similaire entre les deux groupes ( $p=0,296$ ; test de Student) avec un poids moyen de 349 g pour le groupe AG et de 363 g pour le groupe SS.

Les poids moyens à  $T_0$ ,  $T_{0+7\text{jours}}$ ,  $T_{0+1\text{mois}}$ ,  $T_{0+2\text{mois}}$ ,  $T_{0+3\text{mois}}$  entre le groupe AG et SS sont significativement différents ( $p=0,35$ ; Test de Student pour séries appariées).

Le poids moyen des rats ayant reçu l'autogreffe tend à augmenter au cours des trois mois post-implantation, jusqu'à dépasser le poids initial, avec une prise de poids plus marquée sur le dernier mois. Au contraire, au cours des deux premiers mois post-chirurgicaux, les rats à section simple ont plutôt tendance à perdre du poids. Même si une reprise est constatée chez ces derniers au cours du dernier mois, leur poids initial n'est pas rejoint, contrairement aux rats ayant reçu l'autogreffe.

□ Évolution des signes locaux

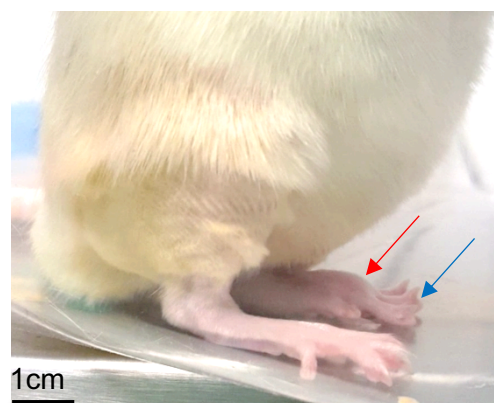
A terme, ( $T_{0+3\text{mois}}$ ), aucun signe local n'est mis en évidence chez les individus des deux groupes. Dès 15 jours après la chirurgie, toutes les plaies sont cicatrisées.

Néanmoins, au cours de la période post-opératoire directe (entre  $T_0$  et  $T_{0+7j}$ ), des signes locaux d'empâtement et d'œdème articulaire ont été relevés chez 6 rats sur 7 du groupe AG (Fig. 21), mais se sont avérés auto-résolutifs.

Chez 5 rats du groupe AG on retrouve une extension permanente des doigts de la patte opérée (Fig 22).

Dans le groupe SS, on observe une plantigradie chez 3 rats sur 7, une déhiscence de plaie (à  $T_{0+2j}$ ) chez un rat (autorésolutive), un hématome sous cutané chez un rat, un empâtement du membre opéré chez un rat et un œdème localisé au grasset chez un rat.

**Figure 22 : Photographie d'un rat du groupe AG à  $T_{0+24h}$**



Noter l'œdème distal présent sur le membre opéré (flèche rouge) par rapport au membre controlatéral. Noter aussi l'extension des doigts du membre opéré (flèche bleue).

□ Évolution orthopédique

La synthèse des résultats du suivi orthopédique sur 3 mois est présentée Tableau 12.

Selon la dichotomie simplifiée présentée au préalable, aucun des rats du groupe AG n'est jugé comme boiteux à la fin de la période post opératoire (0 %). Quatorze pour cent des animaux du groupe SS (soit un rat) présentent une boiterie franche. Cette différence n'est pas significative ( $p > 0,99$  ; Test de Fisher).

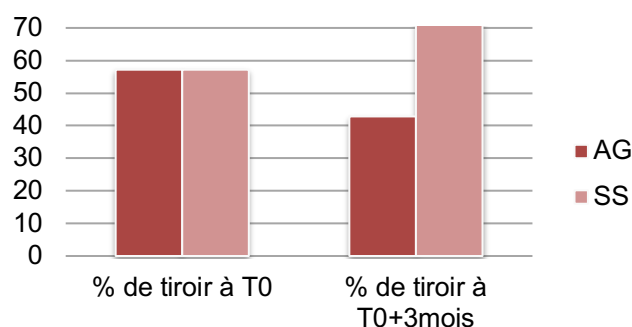
**Tableau 12 : Boiterie par groupe (%) sur 3 mois**

	Pourcentage de boiterie à $T_{0+3\text{mois}}$
Groupe AG	0 %
Groupe SS	14 %

□ Évolution de la laxité articulaire (Fig. 23)

Les résultats (Fig. 23) suggèrent une laxité articulaire augmentée de 14 % dans le groupe SS, et une diminution de 14 % dans le groupe AG. Dans le groupe AG, 3 rats présentaient un signe du tiroir discret en post-opératoire immédiat, un présentait un signe du tiroir franc et les autres ne présentaient pas d'instabilité. 3 mois plus tard, seulement un rat présente un tiroir franc et deux un signe du tiroir discret. Concernant les SS, 5 rats sur 7 présentent au moins un tiroir discret, dont 3 un signe du tiroir modéré. Cette différence à  $T_{0+3\text{mois}}$  n'est pas significative ( $p > 0,99$  ; Test de Fisher).

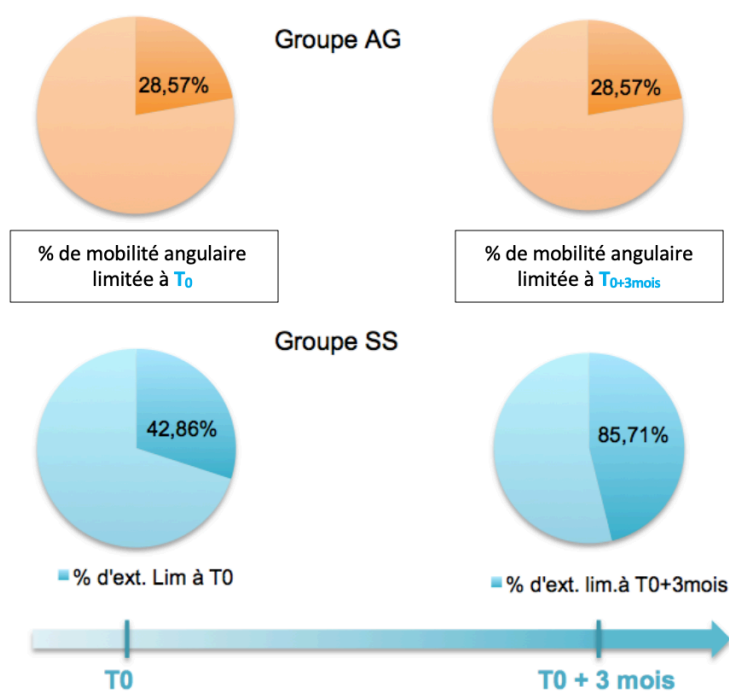
**Figure 23 : Évolution de la laxité articulaire dans les deux groupes**



□ Évolution de la mobilité angulaire articulaire (Fig. 24)

Vingt-huit pour cent des rats du groupe AG présentent une mobilité angulaire diminuée ( par rapport au contro-latéral) du genou opéré en post-opératoire immédiat, contre 42 % des rats du groupe SS (figure 24). Cette différence entre les deux groupes n'est pas significative ( $p=0,8$  ; Test de Fisher). La proportion d'animaux présentant une extension diminuée reste stable dans le groupe AG au cours des 3 mois post-opératoire, mais augmente fortement dans le groupe SS (85 %). Cette différence n'est pas significative entre les deux groupes ( $p=0,7$  ; Test de Fisher). La différence de l'évolution de l'amplitude sur les 3 mois post-opératoire n'est pas significative ( $p=0,3$ ; Test de Student pour séries appariées).

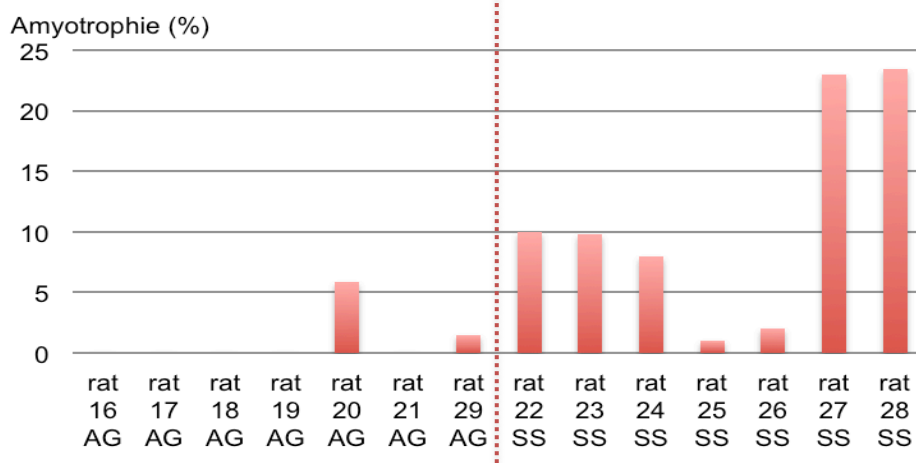
**Figure 24 : Évolution de la mobilité angulaire articulaire dans chaque groupe**



□ Évaluation de l'amyotrophie (Fig. 25)

La figure 25 présente le pourcentage d'amyotrophie calculé chez chaque individu, selon la formule présentée au 2.3.1. Il existe une différence significative entre les pourcentages d'amyotrophie des deux groupes à T0+3mois ( $p= 0,006$  ; Test de Mann-Whitney). Le pourcentage d'amyotrophie maximal est de 23 ce correspond à une différence de diamètre du quadriceps de 20mm, perdus pendant la période de 3 mois post-implantatoire chez un rat du groupe SS.

**Figure 25 : Pourcentage d'amyotrophie calculé par individus**



Le pourcentage d'amyotrophie moyen pour chaque groupe est présenté tableau 13. Le pourcentage d'amyotrophie moyen du groupe SS est 11 fois plus élevé que le groupe AG.

**Tableau 13 : Amyotrophie moyenne par groupe**

	Pourcentage d'amyotrophie moyen
Groupe AG	1 %
Groupe SS	11,03 %

- *Résultats tomodensitométriques*

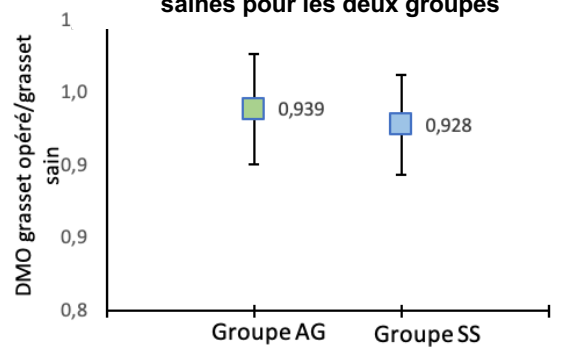
Au total, 10 grassets gauches opérés et 10 grassets droits controlatéraux non opérés ont été évalués par tomodensitométrie après prélèvement. Les résultats de l'étude pilote, correspondant aux valeurs en post-opératoire immédiat (T0) sont rapportés ici à titre d'indication.

**Densité minérale osseuse (DMO) (Fig. 26)**

Le rapport de la DMO des rotules gauches opérées et des rotules controlatérales saines est similaire pour les 2 groupes ( $p=0,547$ ; test de Mann-Whitney). Il est en médiane de :

- **0,939** [0,899 ; 0,951] pour le **groupe AG**
- **0,928** [0,894 ; 0,956] pour le **groupe SS**
- **0,992** pour le rat pilote.

**Figure 26 : Comparaison du rapport de la DMO des rotules opérées et des rotules saines pour les deux groupes**

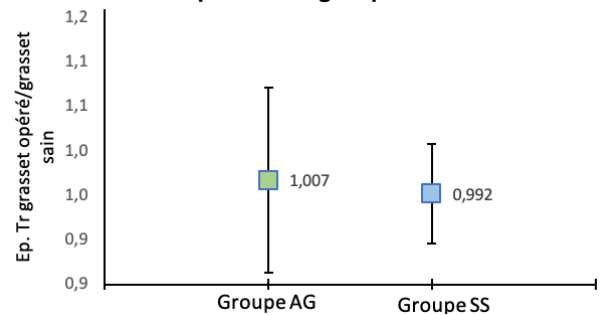


### Épaisseur trabéculaire (Fig. 27)

Le rapport de l'épaisseur trabéculaire des rotules gauches opérées et des rotules controlatérales saines est similaire pour les 2 groupes ( $p=0,547$  ; test de Mann-Whitney). Il est en médiane de :

- $1,007 \pm 0,105$  pour le **groupe AG**
- $0,992 \pm 0,06$  pour le **groupe SS**
- **0,938** pour le rat pilote.

Figure 27 : Comparaison du rapport de l'épaisseur trabéculaire des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes

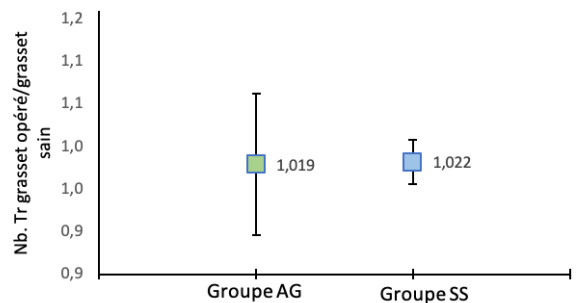


### Nombre de trabécules (Fig. 28)

Le rapport du nombre de trabécules des rotules gauches opérées et des rotules controlatérales saines est similaire pour les 2 groupes ( $p=1$  ; test de Mann-Whitney). Il était en médiane de :

- $1,019 \pm 0,083$  pour le **groupe AG**
- $1,022 \pm 0,026$  pour le **groupe SS**
- **1,042** pour le rat pilote.

Figure 28 : Comparaison du rapport du nombre de trabécules des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes

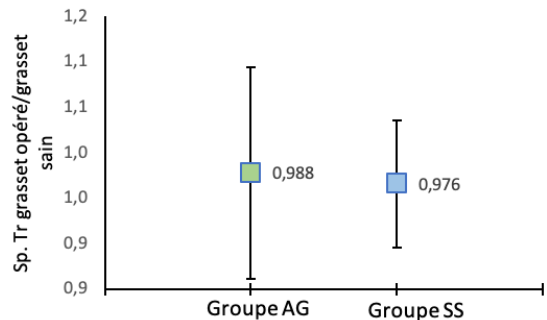


### Séparation trabéculaire (Fig. 29)

Le rapport de la séparation trabéculaire des rotules gauches opérées et des rotules controlatérales saines est similaire pour les 2 groupes ( $p=1$  ; test de Mann-Whitney). Il était en médiane de :

- $0,988 \pm 0,116$  pour le **groupe AG**
- $0,976 \pm 0,07$  pour le **groupe SS**
- **1,099** pour le rat pilote.

Figure 29 : Comparaison du rapport de la séparation des trabécules des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes

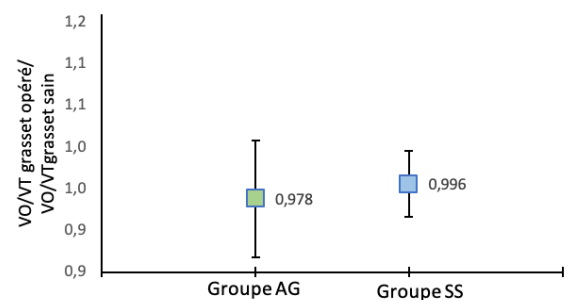


### Volume osseux/ Volume total (Fig. 30)

Le rapport volume osseux/volume total des rotules gauches opérées et des rotules controlatérales saines est similaire pour les 2 groupes ( $p=0,690$  ; test de Mann-Whitney). Il était en médiane de :

- $0,978 \pm 0,079$  pour le **groupe AG**
- $0,996 \pm 0,004$  pour le **groupe SS**
- **0,979** pour le rat pilote.

Figure 30 : Comparaison du rapport VO/VT des rotules opérées et des rotules saines pour les 2 groupes



## **b. Évaluation de l'intégrité du renfort**

- *Résultats IRM*

Au total, 5 grassets gauches opérés et 5 grassets droits controlatéraux non opérés ont été évalués par IRM après prélèvement. Sur les 5 grassets du groupe AG, 3 autogreffes sont jugées intègres, 1 est totalement rompue et une est partiellement rompue à plus de 50 % (Tab. 14, Fig. 31).

Tous les LCCr des grassets contro-latéraux sont jugés intègres.

Le taux de rupture global sur l'ensemble du groupe est de 20 % en prenant en compte tout greffon avec rupture complète.

**Tableau 14 : Type de rupture des autogreffes**

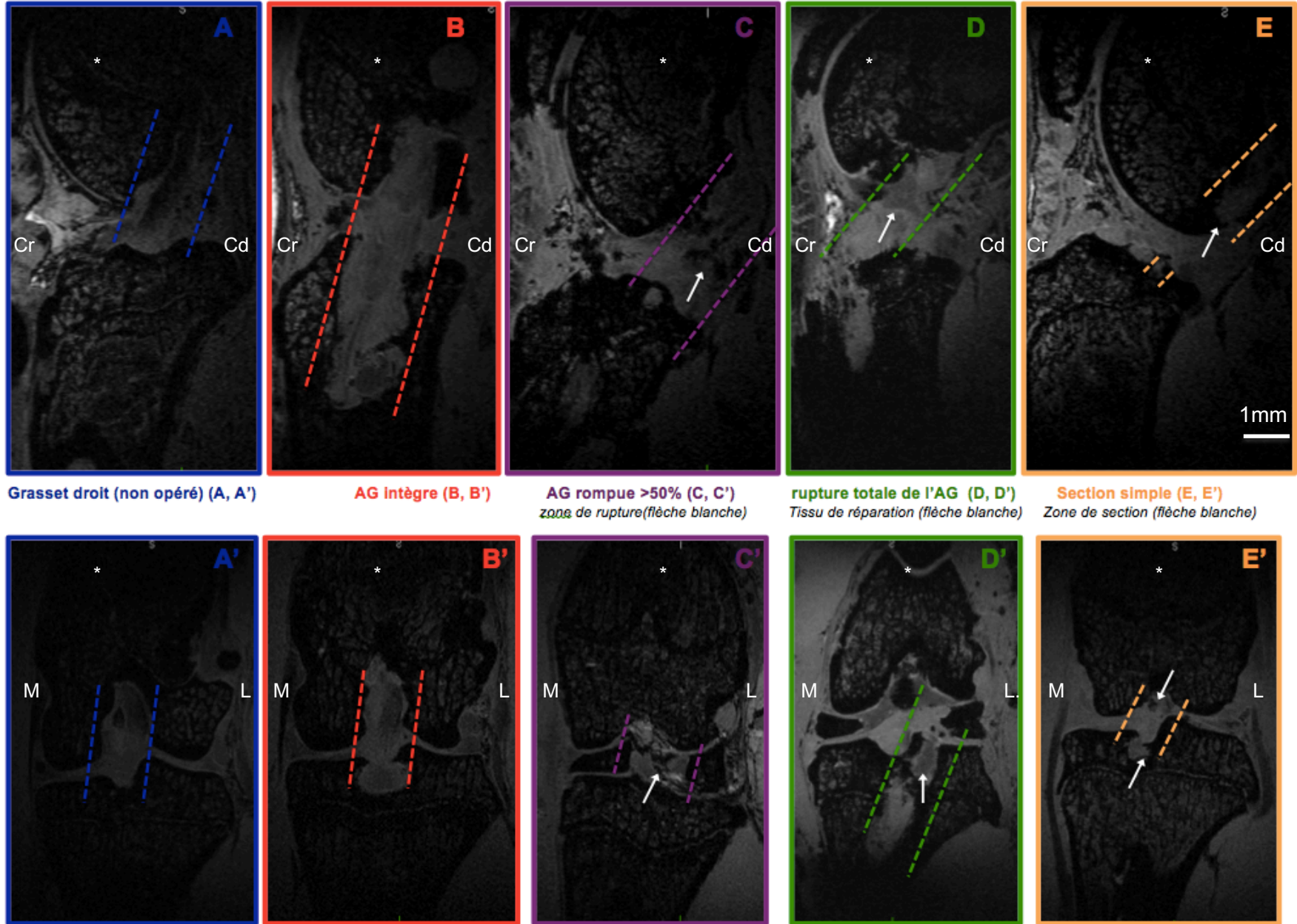
Autogreffe Intègre	Autogreffe lésée		
	Rupture partielle <50 %	Rupture partielle >50 %	Rupture totale
3/5	0/5	1/5	1/5

Etant donné l'évaluation de ce paramètre chez le seul groupe AG (les individus du groupe SS ont par définition 100 % de rupture totale), il n'est pas réalisé de test statistique pour ce paramètre.

**Figure 31** : Coupes sagittales et coronales respectivement : (A, A') LCCr intact (traits bleus) grasset non opéré. (B, B') AG intègre (traits rouges). (C, C') AG rompue à plus de 50 % (traits violets). Noter la déchirure multidirectionnelle, profonde et centrale (flèches blanches). (D, D') AG totalement rompue (traits verts). Noter la solution de continuité tissulaire sur le trajet de l'AG (flèches blanches). (E, E') SS (traits oranges). Noter les extrémités distinctes du LCCr (flèches blanches). Grasset (\*).



Figure 31 : Coupes IRM en séquence FISP des AG, SS et témoins.



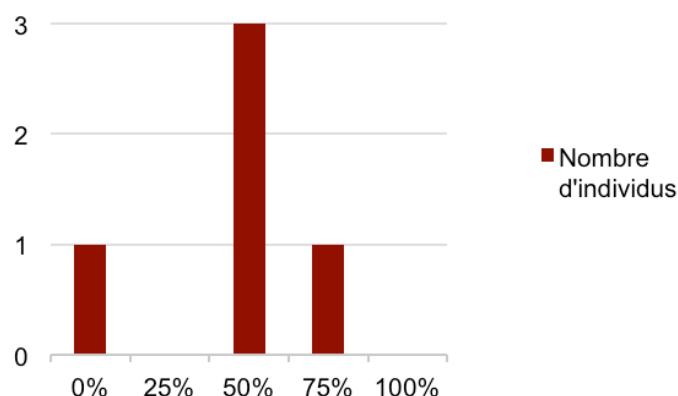


- *Résultats de l'ostéointégration par évaluation histologique (Fig. 32)*

Nos résultats indiquent que dans la majorité des cas autogreffés, une intégration osseuse modérée (50 %, 3 cas sur 5) s'est mise en place. Seul un animal n'a présenté aucune formation osseuse au sein de son greffon (0 %), et un a présenté une infiltration osseuse profonde (75 %) de son greffon.

Étant donnée l'évaluation de ce paramètre chez le seul groupe AG, il n'est pas réalisé de test statistique pour ce paramètre.

**Figure 32 : Importance de l'ostéointégration chez les animaux AG**



## C. Bioactivité : Réaction inflammatoire

### a. Résultats histologiques

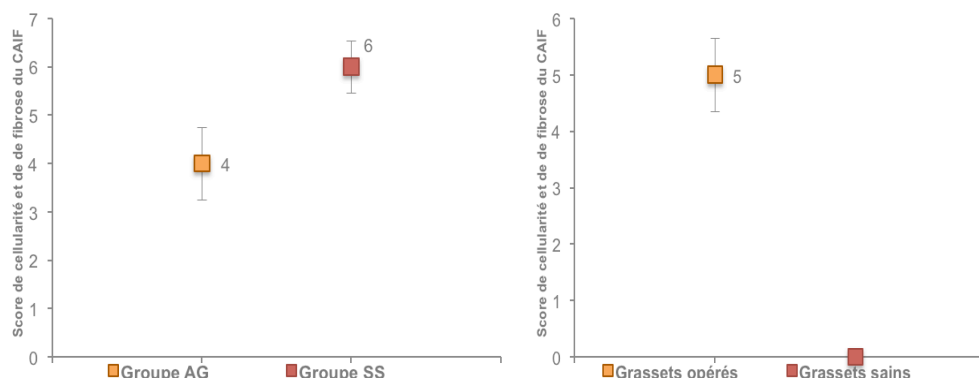
Le rat 18 appartenant au groupe AG a été exclu du paramètre « score de cellules géantes en localisation intra-articulaire » car l'autogreffon tendineux n'était pas présent sur les coupes analysées (rupture totale).

- Le score de CAIF (Fig. 33)

Le score du CAIF des grassets opérés est similaire pour les 2 groupes ( $p=0,3643$  ; test de Mann-Whitney). La médiane est de :

- $4 \pm 1,51$  pour le groupe AG
- $6 \pm 0,19$  pour le groupe SS

**Figure 33 : Comparaison du score du CAIF des grassets opérés pour les deux groupes (graphique de gauche) et comparaison du score du CAIF des grassets opérés et des grassets sains (graphique de droite)**



Le score de CAIF comparé des grassets opérés et non opérés est significativement différent ( $p=0,007$ ; test de Mann-Whitney). La médiane est de

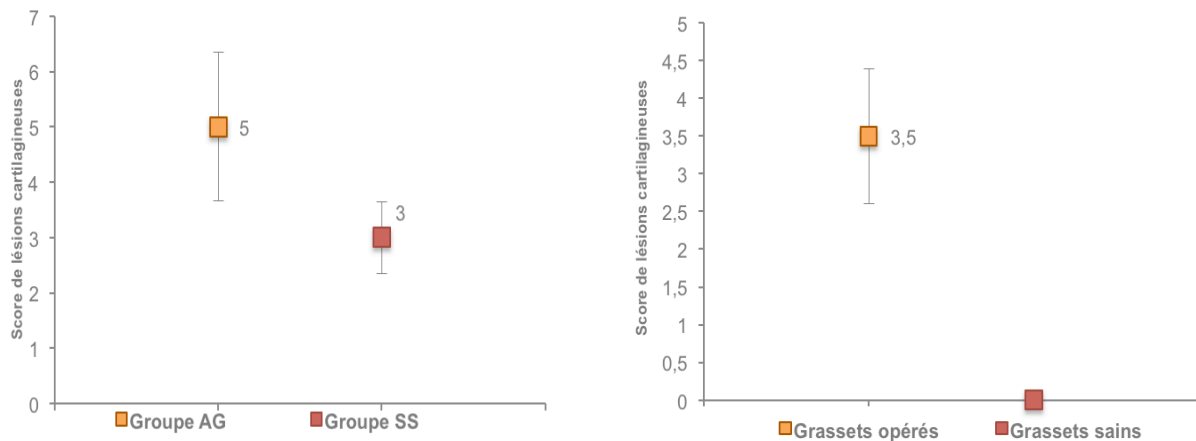
- $5 \pm 1,31$  pour l'ensemble des grassets opérés
- 0 pour l'ensemble des grassets non opérés

- Les lésions cartilagineuses (Fig. 34)

Le score d'évaluation des lésions cartilagineuses (Mankin modifié) est similaire pour les 2 groupes ( $p=0,2873$  ; test de Mann-Whitney). La médiane est de :

- $5 \pm 2,07$  pour le groupe AG
- $3 \pm 1,30$  pour le groupe SS

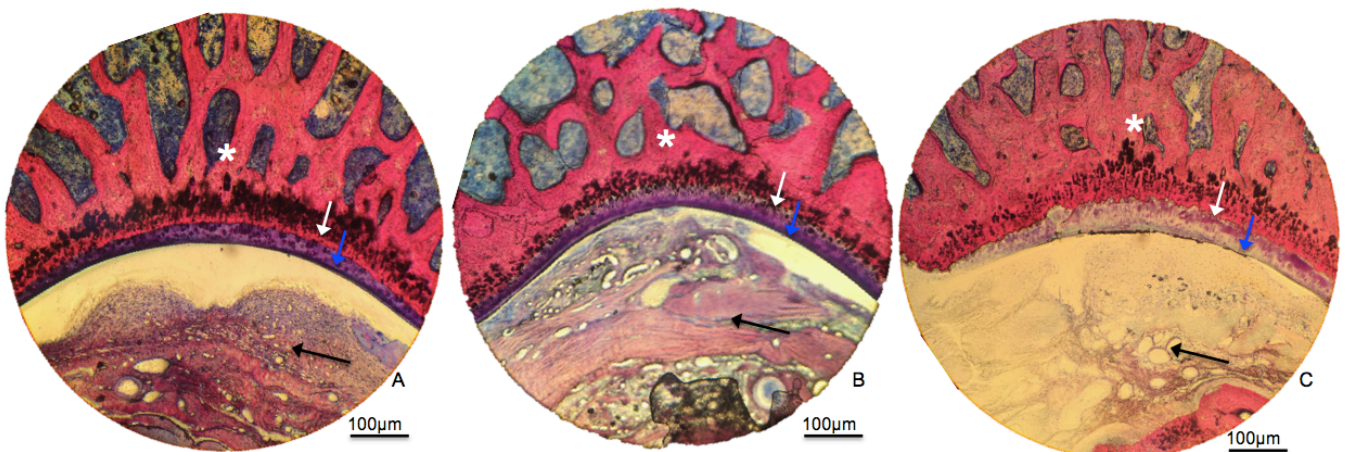
**Figure 34 : Comparaison du score de Mankin modifié des grassets opérés pour les deux groupes (graphique de gauche) et comparaison du score de Mankin modifié des grassets opérés et des grassets sains (graphique de droite).**



Le score d'évaluation des lésions cartilagineuses (Fig. 35) comparé des grassets opérés et non opérés est significativement différent ( $p=0,007$ ; test de Mann-Whitney). La médiane est de

- $3,5 \pm 1,79$  pour l'ensemble des grassets opérés
- 0 pour l'ensemble des grassets non opérés

**Figure 35 : Coupes histologiques parapatellaires intra-articulaires en zone trochléaire.**



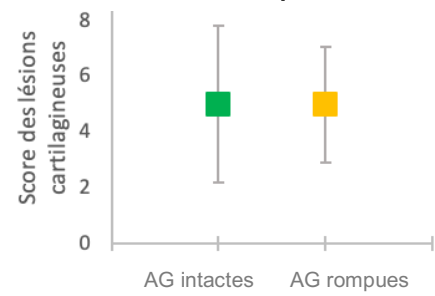
\* blanches : os fémoral. Flèche blanche : ligne de transition (tidemark) entre le cartilage calcifié et la zone radiale. Flèche bleue : zone superficielle. Flèche noire : coussinet adipeux. A : grasset non opéré. B : grasset opéré du groupe AG. C : grasset opéré du groupe SS. Noter la décoloration sévère et l'irrégularité de la ligne de transition pour le grasset SS (C). Noter la désorganisation du CAIF (B et C).

A titre d'indication dans le groupe AG, les scores des lésions cartilagineuses entre les autogreffons intacts et les autogreffons rompus, en dépit du peu de valeur statistique, ont été comparés (Fig. 36).

Ce score est similaire pour les 2 groupes ( $p=0,8$  ; test de Mann-Whitney). La médiane est de :

- $5 \pm 2,08$  pour les autogreffons intacts
- $5 \pm 2,82$  pour les autogreffons rompus

**Figure 36 : Comparaison des lésions cartilagineuses des autogreffons intacts et rompus**

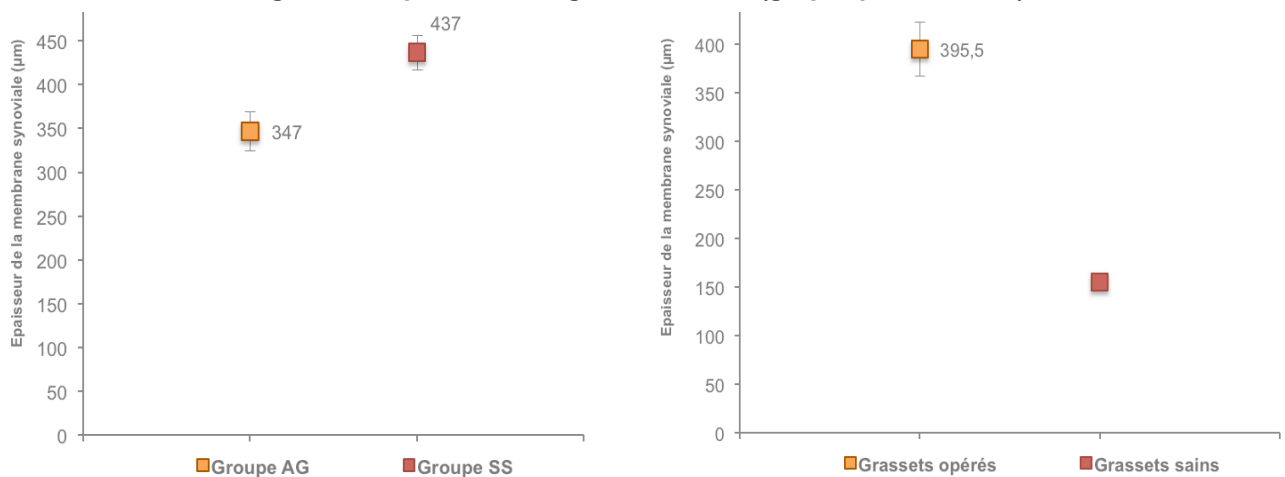


- L'épaisseur des membranes synoviales (Fig. 37)

L'épaisseur des membranes synoviales des grassets opérés est significativement différente pour les 2 groupes ( $p=0,03$  ; test de Mann-Whitney). La médiane est de :

- $347 \pm 45,1$  pour le groupe AG
- $437 \pm 39,4$  pour le groupe SS

**Figure 37 : Comparaison de l'épaisseur des membranes synoviales des grassets opérés pour les deux groupes (graphique de gauche) et comparaison de l'épaisseur des membranes synoviales des grassets opérés et des grassets sains (graphique de droite).**



L'épaisseur des membranes synoviales comparée des grassets opérés et non opérés est significativement différente ( $p=0,0079$  ; test de Mann-Whitney). La médiane est de

- $395,5 \pm 56,2$  pour l'ensemble des grassets opérés
- $155,5 \pm 17,4$  pour l'ensemble des grassets non opérés

- Le degré de colonisation cellulaire du greffon (concernant uniquement le groupe AG)

- Organisation fibrillaire du greffon

L'organisation fibrillaire du greffon des grassets opérés est significativement supérieure à celle du greffon du rat pilote ( $p=0,007$  ; test de Mann-Whitney). La médiane du score de l'organisation fibrillaire est de :

- $1 \pm 0,68$  pour l'ensemble des grassets opérés
- 0 pour le grasset du rat pilote (par définition)

- Cellularité du greffon (Fig. 38)

La cellularité du greffon des grassets opérés est significativement supérieure à celle du greffon du rat pilote ( $p=0,0074$  ; test de Mann-Whitney). La médiane du score de cellularité est de :

- $1,75 \pm 0,38$  pour l'ensemble des grassets opérés
- 0 pour le greffon du rat pilote (par définition)

- Nombre de cellules géantes envahissant le greffon

Le nombre de cellules géantes comparée des grassets opérés est significativement supérieure à celle du greffon du rat pilote ( $p=0,007$  ; test de Mann-Whitney). La médiane est de :

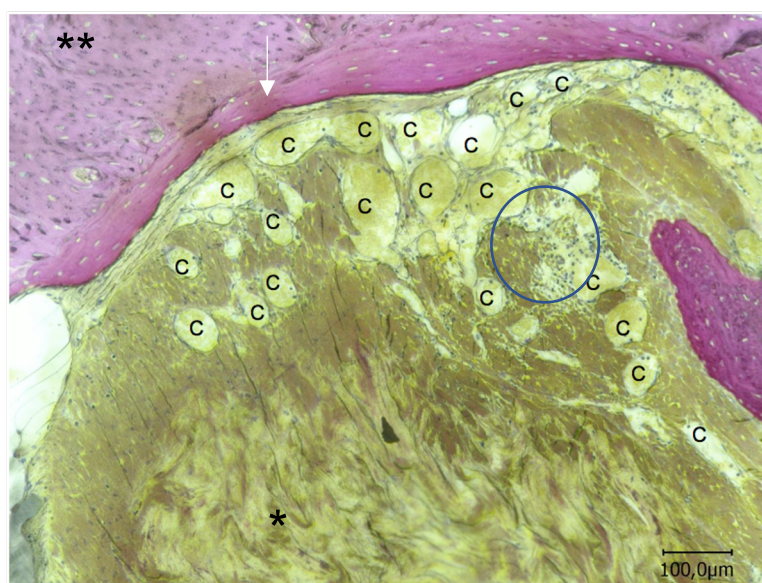
- $1,33 \pm 0,69$  pour l'ensemble des grassets opérés
- 0 pour le greffon du rat pilote (par définition)

- Score de vascularisation du greffon (Fig. 38)

Le score de vascularisation du greffon comparée des grassets opérés est significativement supérieure à celle du greffon du rat pilote ( $p=0,007$  ; test de Mann-Whitney). La médiane du score de vascularisation est de :

- $0,75 \pm 0,64$  pour l'ensemble des grassets opérés
- 0 pour le greffon du rat pilote (par définition)

**Figure 38 : Coupe histologique parapatellaire d'un grasset opéré du groupe AG (x100) montrant la cellularité et la vascularisation au sein de l'autogreffe**



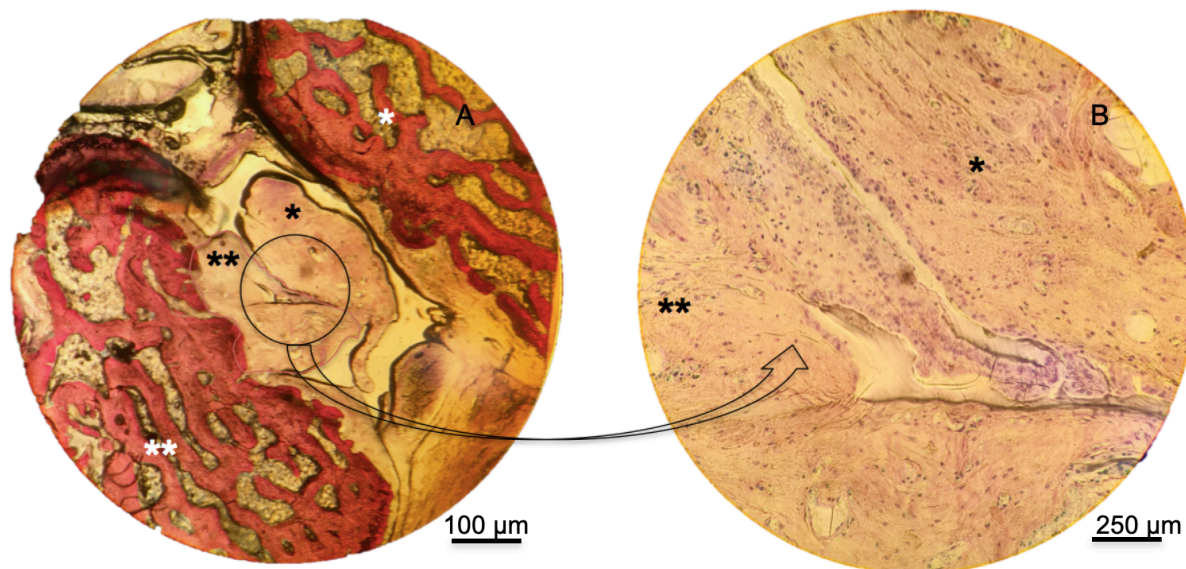
Noter la vascularisation importante (capillaire : C) au sein de l'autogreffe (\*), en périphérie de l'interface os/autogreffe (flèche blanche). Os fémoral (\*\*). Noter la cellularité (cercle bleu).



- Les restes ligamentaires

Les restes ligamentaires sont évalués de façon inconstante c'est pourquoi seule une analyse descriptive est réalisée ici. Concernant le groupe AG, les restes ligamentaires du LCCr sectionné sont visibles de façon inconstante et rare (sur deux animaux), plutôt sur des coupes parapatellaires. Sur la figure 39, un contact étroit entre le LCCr résiduel et l'autogreffe est visualisé, avec une densification cellulaire en regard du contact entre les deux structures (Fig. 39B).

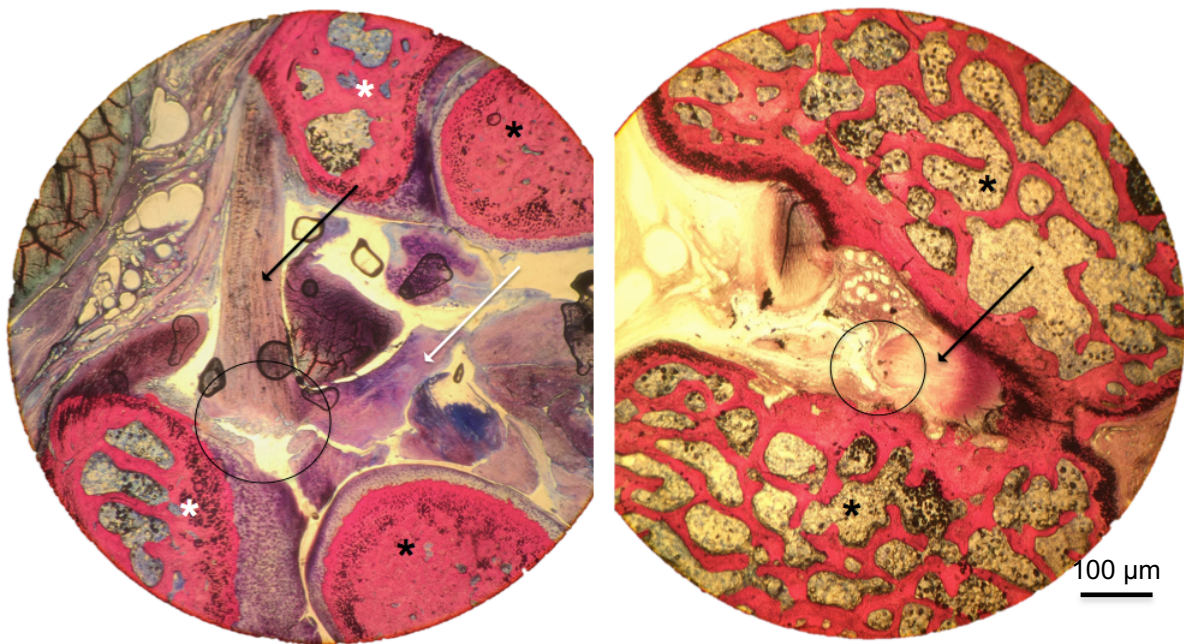
**Figure 39 : Coupe parapatellaire d'un grasset opéré du groupe AG au grossissement x40**



*Noter le contact étroit avec prolifération cellulaire entre l'autogreffe (\* noire) et le LCCr natif résiduel (\*\* noires).  
\* blanche : condyle fémoral médial. \*\* blanches : condyle fémoral latéral.*

Concernant le groupe SS, les deux extrémités sectionnées du LCCr sont également visibles mais façon inconstante entre les différentes coupes d'un même grasset (lié à la technique histologique). Le comportement tissulaire (atrophie, reconstruction) n'est donc pas réellement évaluable d'un point de vue histologique. Il a été possible de visualiser sur une coupe en flexion le LCCr sectionné et sa zone de section (Fig. 40), néanmoins cela reste une découverte fortuite et non répétable.

**Figure 40 : Coupe du grasset en flexion (A) et coupe parapatellaire (B) d'un grasset opéré du groupe SS.**



condyles fémoraux ; \* : condyles tibiaux. Noter la visualisation longitudinale du LCCr (flèches noires), son extrémité sectionnée (cercles noirs) et les résidus tissulaires (flèche blanche).

### ***b. Résultats biomoléculaires***

- Marqueurs de l'inflammation (Fig. 41)

Les grassetts prélevés sur 2 rats dans chacun des groupes AG et SS sont comparés au témoin (ligament sain du membre controlatéral non opéré). Du fait du faible nombre de sujets, aucun test statistique n'a été réalisé. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne et d'écart-types malgré le faible nombre de sujets.

L'expression relative de MMP1 par rapport au témoin était en moyenne de :

- **0,864 ± 0,026** pour le **groupe AG**
- **0,835 ± 0,231** pour le **groupe SS**

L'expression relative de MMP13 par rapport au témoin était en moyenne de :

- **0,659 ± 0,125** pour le **groupe AG**
- **0,45 ± 0,108** pour le **groupe SS**

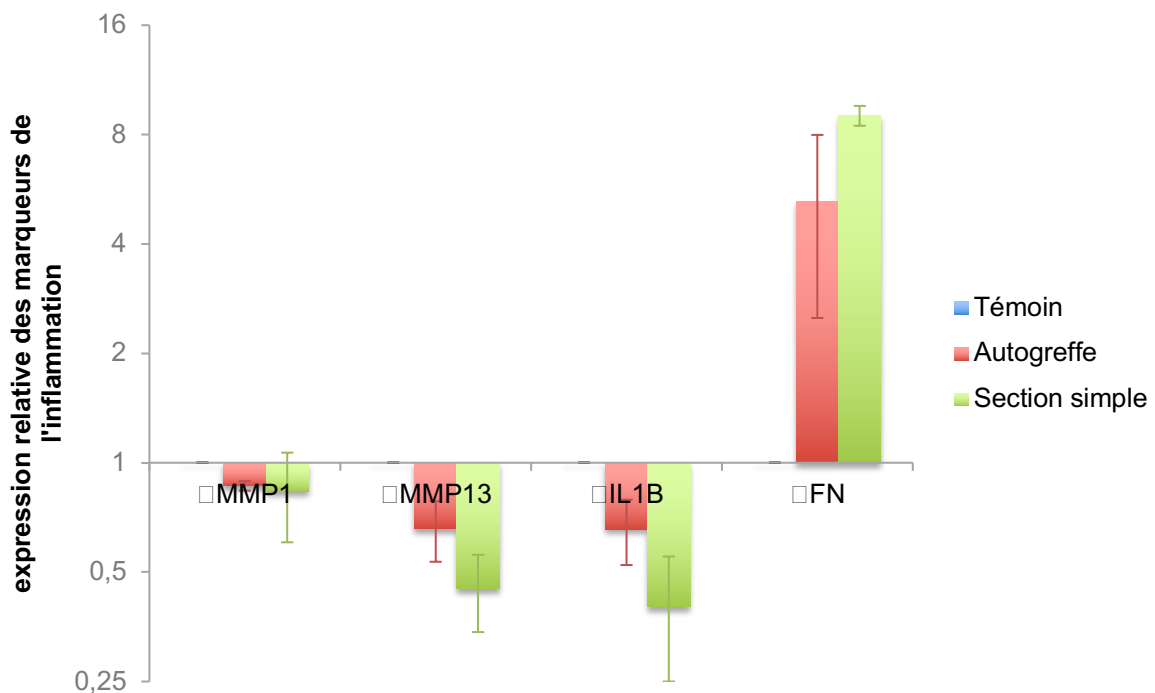
L'expression relative de IL1B par rapport au témoin était en moyenne de :

- **0,657 ± 0,134** pour le **groupe AG**
- **0,401 ± 0,151** pour le **groupe SS**

L'expression relative de FN par rapport au témoin était en moyenne de :

- **5,244 ± 2,741** pour le **groupe AG**
- **9,028 ± 0,567** pour le **groupe SS**

**Figure 41 : Comparaison de l'expression relative des différents marqueurs de l'inflammation pour les groupes AG et SS.**



On note :

- Une forte augmentation de l'expression du gène FN pour les deux groupes par rapport au témoin, plus importante pour le groupe SS que pour le groupe AG.
- Une modification très faible dans l'expression de MMP1, MMP13 et IL1B entre les deux groupes et le témoin.

- Marqueurs de la colonisation tissulaire

- Marqueurs spécifiques des ligaments/Tendons (Fig. 42)

L'expression relative de Scx par rapport au témoin était en moyenne de :

- **0,749 ± 0,09** pour le **groupe SS**
- **0,772 ± 0,132** pour le **groupe AG**

L'expression relative de Tnmd par rapport au témoin était en moyenne de :

- **0,788 ± 0,224** pour le **groupe SS**
- **0,856 ± 0,012** pour le **groupe AG**

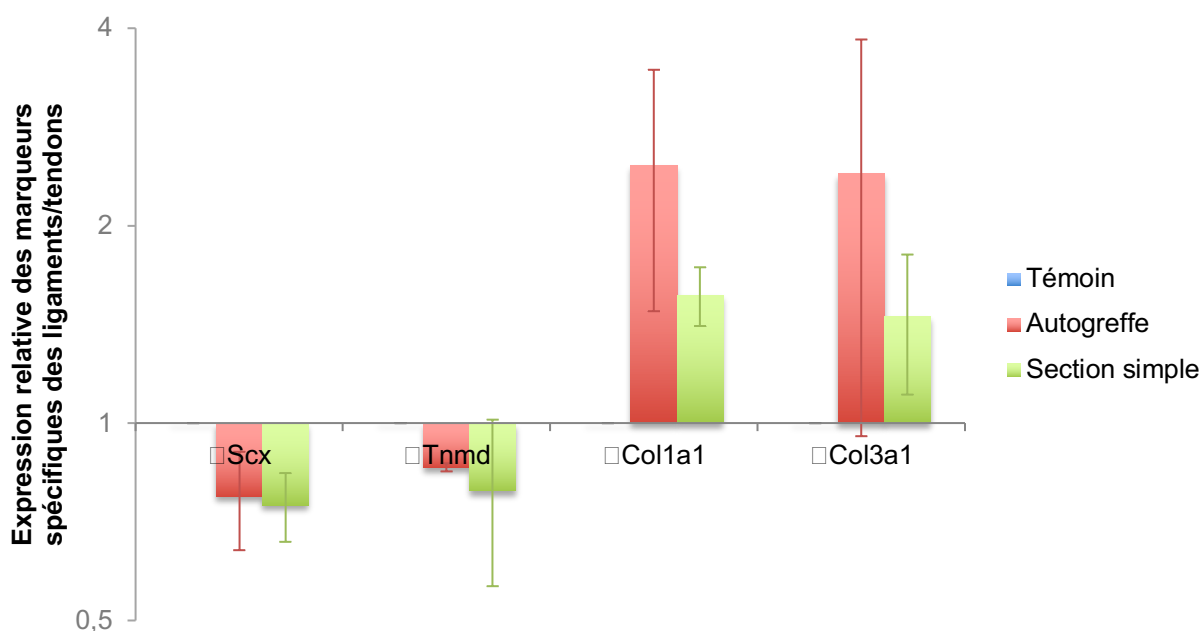
L'expression relative de Col1 $\alpha$ 1 par rapport au témoin était en moyenne de :

- **1,567 ± 0,161** pour le **groupe SS**
- **2,469 ± 0,988** pour le **groupe AG**

L'expression relative de Col3 $\alpha$ 1 par rapport au témoin était en moyenne de :

- **1,456 ± 0,351** pour le **groupe SS**
- **2,4 ± 1,445** pour le **groupe AG**

**Figure 42 : Comparaison de l'expression relative des différents marqueurs spécifique des ligaments/tendons pour les groupes AG et SS.**



On note :

- Une modification faible de l'expression des gènes de Scx et Tnmd par rapport au témoin.
- Une forte augmentation de l'expression des gènes de collagène I et III pour le groupe AG par rapport au groupe SS et au témoin, à moduler compte tenu du faible nombre d'animaux étudiés.

▪ Marqueurs spécifiques du cartilage (Fig. 43)

L'expression relative de Sox9 par rapport au témoin était en moyenne de :

- **1,031 ± 0,039** pour le **groupe SS**
- **1,113 ± 0,134** pour le **groupe AG**

L'expression relative de Aggrecan par rapport au témoin était en moyenne de :

- **0,965 ± 0,036** pour le **groupe SS**
- **1,026 ± 0,053** pour le **groupe AG**

L'expression relative de Col2 $\alpha$ 1 par rapport au témoin était en moyenne de :

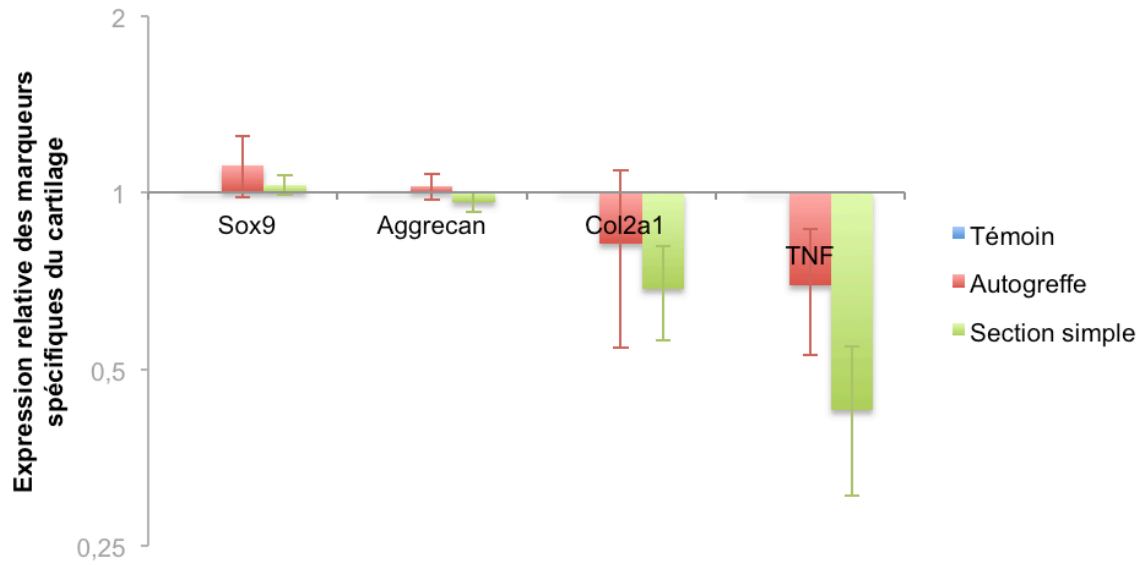
- **0,686 ± 0,125** pour le **groupe SS**
- **0,817 ± 0,273** pour le **groupe AG**

L'expression relative de TNF par rapport au témoin était en moyenne de :

- **0,426 ± 0,122** pour le **groupe SS**
- **0,697 ± 0,169** pour le **groupe AG**



**Figure 43 : Comparaison de l'expression relative des différents marqueurs spécifiques du cartilage pour les groupes AG et SS.**



On note une faible modification de l'expression des gènes des gènes du cartilage des deux groupes par rapport au témoin.

## 4. Discussion

### A. Originalité du travail

Cette étude a permis l'élaboration d'un modèle original de renfort ligamentaire chez le rat basé sur l'utilisation d'une autogreffe constituée du tendon du muscle fléchisseur profond des doigts. Nos hypothèses étaient que cette autogreffe constituait un renfort pour la réparation d'une section simple du LCCr, en assurant son rôle de stabilisateur fonctionnel tout en évitant une réaction inflammatoire anormale et en favorisant l'interaction biologique et mécanique avec le LCCr résiduel.

Des modèles de renfort ligamentaire ont déjà été décrits chez la brebis, le lapin et le cochon (Kiapour *et al.*, 2015 ; Mahapatra *et al.*, 2018 ; Sun *et al.*, 2013 ; Takahashi *et al.*, 2016), mais chez le rat seuls des modèles de remplacement ligamentaire ont été développés jusqu'à présent (Kawakami *et al.*, 2017). La conservation du ligament résiduel, la mise en place d'un renfort tendineux fixé par vis faisant office de vis d'interférence (et non pas par simple suture comme proposé dans la littérature) décrits dans ce travail constituent un modèle de renfort ligamentaire de pertinence clinique chez le petit animal de laboratoire. Ce modèle a permis par ailleurs la première utilisation rapportée de la micro-IRM pour évaluer l'intégrité de l'autogreffe en tant que renfort dans un modèle rat.

### B. Conformité du modèle : réponse au cahier des charges pré-défini

Le modèle développé dans cette étude remplit le cahier des charges défini préalablement :

- L'articulation du rat présente des similitudes avec l'articulation humaine, permettant la mise en place de techniques de renfort endo-capsulaire et d'envisager nos évaluations de nouveaux renforts ligamentaires dans une perspective d'utilisation chez l'homme.
- L'articulation du rat constitue un modèle en charge avec appui fréquemment bi-podal, plus proche du genou humain que d'autres petits animaux (brebis, lapin), sollicitant ainsi plus la reconstruction ligamentaire que ce qui est le cas dans d'autres modèles chez le petit animal de laboratoire (le lapin maintient son membre en hyperflexion en mobilisant ainsi peu son grasset)
- La petite taille des échantillons de notre modèle a permis des évaluations micro-IRM, micro-scanner, et histologique rapides à mettre en place (inclusion histologique plus rapide par exemple, facilité de transport des pièces prélevées jusqu'au laboratoire) et avec une rapidité d'obtention des résultats.
- Les coûts associés à notre étude ont été réduits, et permettront d'évaluer de nouveaux biomatériaux sur un plus grand nombre d'animaux que s'il s'agissait d'un grand animal de laboratoire.
- Notre modèle s'est avéré être bien toléré cliniquement avec une morbidité réduite en termes de stabilité articulaire et de réaction inflammatoire.
- Enfin, le modèle élaboré est bien caractérisé aussi bien sur les plans fonctionnels que biologique (inflammation générée) et permet aux études ultérieures qui seront menées sur de nouveaux biomatériaux de bénéficier de contrôles positifs (autogreffe) et négatifs (section ligamentaire simple) indispensables à leur évaluation.

Le matériau de référence actuellement utilisé chez l'homme dans les techniques de réparation du LCA chez l'homme est l'autogreffe tendineuse. Le greffon idéal doit posséder une structure microscopique et des caractéristiques biomécaniques similaires à celles du LCCr natif. Le site normal d'insertion du LCCr est une zone hautement spécialisée qui permet la transmission

progressive des contraintes exercées sur les tissus durs aux tissus mous. Le LCCr natif s'attache à la surface de l'os par une insertion directe, qui contient quatre zones histologiques distinctes :

- 1) ligament
- 2) fibrocartilage non calcifié
- 3) fibrocartilage calcifié
- 4) os

Il n'y a pas de situation analogue, chez l'animal ou chez l'homme, à une greffe de tendon au sein d'un tunnel osseux (Benjamin *et al.*, 1986). La greffe idéale de LCCr devrait donc permettre une réadaptation précoce tout en protégeant les points d'ancrage et en évitant le glissement de la greffe. Concernant le choix de l'autogreffe dans notre étude, le fléchisseur profond des doigts apparaît comme la solution idéale en termes de stabilité ; l'extenseur profond des doigts s'insérant sur le fémur, l'instabilité créée par son retrait aurait constitué un biais d'interprétation non négligeable.

## **C. Conformité du modèle : Biofonctionnalité et bioactivité**

### **a. Biofonctionnalité**

La biofonctionnalité a été évaluée ici au travers de l'appui (résultats cliniques, densité minérale osseuse et microarchitecture osseuse), de la stabilité de l'articulation et de la résistance de l'autogreffe à la rupture.

- Évaluation au travers de l'appui
  - Résultats cliniques

Une boiterie n'est objectivable visuellement que chez 14 % des animaux du groupe SS, ce qui ne constitue pas une différence significative avec le pourcentage de boiterie des rats du groupe AG (0 % ;  $p > 0,99$  Test de Fisher). Ces résultats illustrent une potentielle compensation dissymétrique avec report de poids sur le membre controlatéral. Néanmoins, il est important de noter que les rats du groupe SS présentent une laxité articulaire et une amyotrophie plus importantes en post-opératoire, suggérant une moindre utilisation du membre opéré dans cet effectif. Ces observations sont confortées par le fait que le poids initial de chaque rat du groupe SS n'est jamais rejoint individuellement, contrairement aux rats du groupe AG. Une plus grande facilité de déplacement et une douleur atténuée après cicatrisation chez les rats ayant subi un renfort pourraient en être les causes majeures.

La prise de greffe n'en demeure pas moins plus délabrante comme en témoigne la perte de poids post-opératoire ( $T_0$  et  $T_{0+3j}$ ) plus marquée chez les animaux ayant reçu un renfort, potentiellement générée par une anorexie de stress post-opératoire. On retrouve le même phénomène de perte de poids post-opératoire chez les rats ayant subi une section simple, néanmoins la perte est moindre, probablement due à une procédure anesthésique et chirurgicale moins lourde, ainsi qu'un protocole moins traumatisant.

- Densité minérale et microarchitecture osseuse

La densité minérale osseuse et la microarchitecture trabéculaire de l'os sont des outils fréquemment utilisés en clinique et en expérimentation animale pour évaluer la solidité osseuse et l'importance de l'appui sur le membre ((Bayar *et al.*, 2008a ; Di Martino *et al.*, 2012 ; Lelovas *et al.*, 2008)). Une ostéoporose péri-articulaire résultant d'un défaut d'utilisation du membre en post-opératoire et

potentiellement de l'acte chirurgical en lui-même est en effet fréquemment associée au traitement chirurgical des ruptures du LCA (Bayar *et al.*, 2008a ; Järvinen et Kannus, 1997). Les mesures ont été réalisées en considérant la rotule dans son intégralité comme région d'intérêt car celle-ci est mise en jeu à chaque mouvement du grasset sans qu'elle n'ait subi aucune intervention chirurgicale délabrante (forage de tunnels osseux). Sa structure n'est donc pas altérée par le geste chirurgical et reflète avec fidélité l'utilisation du grasset. De plus, l'exploitation de la rotule comme région d'intérêt assure une bonne reproductibilité et une bonne fiabilité des mesures (Bayar *et al.*, 2008). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 2 groupes pour ces paramètres évalués par tomodensitométrie. Notons une discrète tendance du groupe AG à présenter des résultats plus proches du rat pilote (aucune lésion osseuse encore établie, évaluation en post-opératoire immédiat) supposant un appui sur le membre plus prononcé par rapport aux rats du groupe SS. Pour l'ensemble de ces paramètres, un nombre plus important de sujets aurait probablement pu aboutir à une significativité des résultats.

- Stabilité articulaire et résistance de l'autogreffe

L'intégrité du renfort a été évaluée par imagerie à résonance magnétique. L'IRM est, chez l'homme, l'un des outils les plus utilisés et les plus performants pour le diagnostic des affections touchant le genou en post-opératoire de ligamentoplastie, (Walz, 2016). Sa sensibilité et sa spécificité pour la détection de ruptures complètes dans le cadre de l'autogreffe sont respectivement de 50 et 100 % (Walz, 2016). Une discontinuité de la greffe en coupes sagittale et coronale est le critère le plus spécifique d'une rupture complète. C'est ce critère qui a permis d'établir un taux de rupture complète de 20 % dans notre étude. Ce chiffre est plus élevé que celui rapporté dans la littérature : 7- 16 % chez des rats Sprague-Dawley (Bedi *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2019). Les rats Sprague-Dawley présentent un développement musculaire plus rapide que les rats Wistar (Kühn *et al.*, 1983), favorisant probablement la stabilité de l'articulation. Ce taux de rupture plus élevé dans notre étude peut également s'expliquer par la durée post-opératoire plus longue (sacrifices à 3 mois) que celle généralement décrite dans la littérature (sacrifices à 3 et 6 semaines). L'étude de Ma *et al.*, (2019) utilisant un greffon identique (fléchisseur profond des doigts) et rapportant un taux de rupture de 7- 8 %, repose sur l'utilisation de broches filetées pour la fixation de l'autogreffe. La technique de fixation de l'autogreffe peut en effet, si le pas de vis est tranchant, endommager le greffon. Il serait alors souhaitable de fabriquer des vis d'interférence à pas de vis mousse, envisageable avec l'impression 3D. Enfin, la tension appliquée à l'autogreffe au moment de sa fixation influence significativement le taux de rupture (Ma *et al.*, 2019), et il pourrait être intéressant dans les études ultérieures de mesurer la tension appliquée à la greffe lors de sa fixation.

### **b. Bioactivité**

La bioactivité de l'implant s'exprime au travers de sa recolonisation tissulaire, qui est évaluée ici via l'importance de la revascularisation, de la cellularité et de l'organisation des fibres de collagène à son contact.

- Évaluation histologique

Les scores d'évaluation histologique (score de CAIF, lésions cartilagineuses, colonisation tissulaire) se sont avérés supérieurs chez tous les grassets opérés, en comparaison des grassets non opérés. Cela confirme les lésions cartilagineuses engendrées par la technique chirurgicale et par l'instabilité générée par la section ligamentaire. En effet, la section du LCCr seule ou combinée à une ménissectomie induit chez le rat des lésions cartilagineuses sévères associées à une sclérose de l'os sous-chondral (Hayami *et al.*, 2006). Quelle que soit la technique chirurgicale utilisée, la section

du LCCr provoque des dommages détectables à la surface du cartilage, une perte de protéoglycanes dès une semaine après la chirurgie, suivie d'une néovascularisation intra-cartilagineuse (évaluation de deux techniques chirurgicales différentes dans l'étude de Hayami *et al.* (2006).

Aucune différence significative n'a été relevée entre les deux groupes concernant les paramètres histologiques précédents. La stabilisation par autogreffe n'a donc pas d'impact significatif sur la survenue des lésions chondrales. Il est rapporté dans la littérature une quantification des lésions cartilagineuses par une évaluation de la quantité de protéoglycanes dans le cartilage sous-chondral, fortement diminuée par une immobilisation de l'articulation. La mobilité articulaire étant un élément déterminant dans la préservation du cartilage articulaire, ces résultats soulignent l'effet néfaste de l'immobilisation du membre (Ma *et al.*, 2019).

La stabilisation articulaire permise par la reconstruction ligamentaire a néanmoins un impact positif puisque l'épaisseur de la membrane synoviale est le seul paramètre significativement inférieur chez les individus du groupe AG. Or, toute agression articulaire inflammatoire, mécanique ou infectieuse, va engendrer des modifications de la membrane synoviale (synovite), illustrées histologiquement par une hyperplasie cellulaire, une infiltration inflammatoire, une fibrose et une augmentation de la vascularisation, donc un épaississement global de la membrane synoviale. L'histologie a en effet été précédemment décrite comme examen de référence pour la mise en évidence de synovite. D'après ces résultats, l'autogreffe offre donc un avantage sur l'incidence de la survenue de synovite par rapport à la section simple.

La préservation du LCCr résiduel définit le caractère de renfort de notre modèle. Celui-ci a autorisé une prolifération cellulaire au contact de l'autogreffe, la mise en place d'une néovascularisation, et une colonisation fibrillaire, qui laisse suggérer la possibilité d'une reconstitution ou du moins d'une préservation du potentiel proprioceptif par l'intermédiaire de la conservation des mécanorécepteurs et des fibres nerveuses du LCCr (Dhillon *et al.*, 2012).

Néanmoins, l'analyse de la cellularité reste semi-quantitative en raison de l'impossibilité de distinguer précisément les différents types cellulaires et notamment de différencier les populations mononuclées et fibroblastiques. Cette distinction, envisageable notamment à l'aide de marquage par immunohistochimie, aurait pu permettre d'évaluer plus finement la réponse inflammatoire et la réponse fibroblastique.

Un défaut d'intégration de la greffe est responsable d'un nombre conséquent d'échecs de reconstruction chirurgicale du LCA (Deehan et Cawston, 2005). Les sites d'attachement de la greffe sont souvent considérés comme le point faible de la reconstruction ou du renforcement, en particulier au cours de la période de cicatrisation précoce. Un des objectifs biologiques principaux de la reconstruction est une adhérence stable de la greffe à travers les tunnels osseux, et ce sur une surface la plus large possible. Cet aspect est un point crucial de la stabilité fonctionnelle de toute greffe (Noyes *et al.*, 1983). Nos résultats indiquent que dans la majorité des cas autogreffés, une intégration osseuse modérée (50 % d'ostéointégration : 3 cas sur 5) s'est mise en place, favorisant la solidité de l'adhérence et de la fixation chez ces individus. Lors de la mise en parallèle avec les résultats cliniques, le rat ayant présenté au cours de ses évaluations cliniques hebdomadaires une position fléchie de son grasset très fréquente, s'est avéré présenter une ostéointégration importante de son greffon (75 %). Cela suggère qu'une ostéointégration excessive du greffon pourraient affecter les caractères de laxité et de souplesse nécessaire à un renforcement efficace.

- Évaluation biomoléculaire

En ce qui concerne les résultats de biologie moléculaire, l'augmentation de l'expression du gène FN (gène codant pour des molécules de la réaction inflammatoire) chez les animaux des deux groupes montrent qu'il est le gène principal impliqué dans la réaction inflammatoire, et son augmentation plus élevée chez les rats du groupe SS confirme que la section simple seule engendre une réaction inflammatoire supérieure à l'autogreffe.

De plus, une forte augmentation de l'expression des gènes de collagène I et III pour le groupe AG par rapport au groupe SS et au témoin est notée. Le ligament étant principalement constitué de collagène I et III, ces résultats indiquent une meilleure réponse cellulaire de l'organisme pour le ligament greffé que pour l'autogreffe. Des implantations complémentaires sont néanmoins nécessaires (et en cours) pour compléter les effectifs destinés à la biologie moléculaire et confirmer l'ensemble des résultats.

#### **D. Aspects bénéfiques fonctionnels et biologiques du modèle**

La comparaison des deux groupes étudiés permet de mettre en lumière plusieurs aspects bénéfiques de la reconstruction ligamentaire sur le plan fonctionnel et notamment sur la stabilisation articulaire. En effet, la ligamentoplastie du groupe AG a permis :

- une amplitude de mobilité angulaire mieux préservée (moins de fibrose capsulaire)
- une laxité en tiroir moindre qui se répercutent d'ailleurs sur les scores de boiterie
- le maintien de la masse musculaire
- la préservation de la DMO rotulienne (par rapport au rat pilote)

Les caractéristiques bénéfiques de ce modèle s'étendent au plan biologique:

- une inflammation minorée (mise en évidence à l'examen local et biomoléculaire) se traduisant cliniquement par un meilleur score de boiterie et une prise de poids plus rapide (tendance).
- Une recolonisation tissulaire (mise en évidence à l'examen histologique) se traduisant par une préservation de l'intégrité de la greffe (IRM ; taux de rupture de 20 %).

L'ensemble de ces aspects souligne les avantages du renfort ligamentaire présenté ici, et la bonne caractérisation du modèle, tant sur le plan fonctionnel que biologique.

Enfin, il a été possible de visualiser histologiquement dans de rares cas les restes de ligament natif. Chez un rat du groupe AG un contact étroit entre les restes de ligament sectionné et l'autogreffe a été mis en évidence, et une densification cellulaire était visible à la jonction entre les deux structures. Le rat en question a présenté à l'évaluation IRM une autogreffe intacte, une stabilité articulaire (pas de signe du tiroir à  $T_{0+3\text{mois}}$ , pas de diminution de la mobilité angulaire articulaire par rapport au controlatéral à  $T_{0+3\text{mois}}$ ) et aucune boiterie à l'examen orthopédique. En dépit du peu de puissance statistique du fait de la faible répétabilité de cette observation, ces résultats suggèrent que le rétablissement de la continuité entre l'autogreffe et les restes du ligament natif permet d'améliorer la résistance de l'autogreffe, la préservation de la mobilité angulaire et optimiserait les résultats cliniques. Cela accentue l'importance du concept de renfort ligamentaire et ses avantages par opposition au remplacement ligamentaire. Ce rétablissement de continuité n'a pas été mis en évidence dans le groupe des sections simples. Celui-ci impliquerait une cicatrisation spontanée du

ligament, qui, avec certaines prises en charge thérapeutique (programmes spécifiques de rééducation fonctionnelle) a été possible (Costa-Paz *et al.*, 2012), mais reste très controversée et non envisageable pour la majorité des auteurs (Andersson *et al.*, 1989).

## **E. Limites du modèle**

### **a. Limites liées à la taille et au nombre d'animaux**

Une limite importante est le nombre d'animaux dans chaque groupe qui a probablement été responsable de l'absence de différence significative pour certains paramètres avec la mise en évidence seulement d'une tendance pour certains des critères. De plus, la petite taille de notre modèle conduit à des inconvénients non négligeables en termes de conséquences fonctionnelles. Les incidents mineurs associés à la procédure chirurgicale entraînent des lésions intra-articulaires (section concomitante du LCCd, hémorragie, lésions cartilagineuses), retrouvées lors des évaluations histologiques. De plus, le ratio surface/poids du rat est très élevé, toujours à cause de sa petite taille, ce qui provoque une grande sensibilité de cette espèce à l'hypothermie, nécessitant des procédures chirurgicales à durée limitée.

### **b. Limites liées aux méthodes d'évaluation**

La principale limite liée aux méthodes d'évaluation est la difficulté à évaluer aussi bien macroscopiquement, que par IRM ou par analyse histologique les restes du ligament natif et leur restauration (sans doute liées à la très petite taille des échantillons). En effet, cette évaluation constituait un des objectifs de cette étude, pour estimer les bénéfices de la préservation du ligament natif.

En outre, le taux de rupture au cours de la période post-implantatoire, a pu estomper les différences entre les groupes sur certains paramètres (en particulier les lésions chondrales).

- **Évaluation clinique**

Dans le cadre de l'évaluation de la mobilité angulaire articulaire, il aurait été intéressant d'utiliser un matériel spécifique d'évaluation de la laxité, permettant une quantification plus précise. (Robert *et al.*, 2009).

A propos de l'évaluation clinique orthopédique, la difficulté de mise en œuvre de l'examen orthopédique et nombre d'observateurs entraînent un manque de précision et de neutralité (évaluateur) de l'évaluation (Berryman *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2017 ; Kloefkorn *et al.*, 2017 ; Parvathy et Masocha, 2013). Il aurait été intéressant de réaliser une évaluation orthopédique plus précise par l'intermédiaire d'un dispositif d'évaluation digitale de la marche : un tapis de course associé à une caméra haut débit reliée à un logiciel d'exploitation, avec un système de mesure de pression des empreintes de pas des animaux, type CatWalk (Parvathy et Masocha, 2013). Ces dispositifs ont néanmoins un coût élevé. Un logiciel tel qu'AGATHA (Automated Gait analysis through hues and areas), analysant une vidéo de la marche, pouvant calculer la vitesse de marche, la symétrie temporelle entre les contacts au sol des postérieurs, la longueur des foulées, la fréquence des pas, aurait également pu être mis à profit dans notre expérimentation (Kloefkorn *et al.*, 2017).

Il existe néanmoins des méthodes indirectes d'évaluation de la marche : mesure des angles de flexion/extension, mesure de la DMO. Cette dernière en particulier, quantifie l'importance de l'appui sur le membre d'intérêt (Bedi *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2019 ; Zong *et al.*, 2017).



Ainsi, en dépit de la subjectivité de l'analyse visuelle de la marche, cette étude a mis en œuvre différents critères indirects (DMO, masse musculaire, évaluation pondérale) permettant de pallier en partie à ce manque de sensibilité.

- Évaluation tomodensitométrique

Concernant les mesures de densité minérale osseuse, même si les résultats s'affranchissent de la variation individuelle (par le rapport grasset opéré/grasset sain), le report de poids sur le membre contro-latéral engendre un biais de confusion pour l'interprétation des données.

- Évaluation par imagerie à résonance magnétique

L'évaluation IRM de l'intégrité de l'autogreffe s'est avérée difficile en raison de la petite taille de l'articulation, de la difficulté à visualiser le point d'ancrage fémoral de l'autogreffe et de la colonisation de l'autogreffe par du tissu natif, pouvant masquer une potentielle rupture partielle, une reconstruction ou une atrophie. Il est rapporté dans la littérature que la précision diagnostique de l'IRM pour la détection de ruptures partielles pour un autogreffon tendineux est faible, une modification locale du calibre de la greffe s'avérant être le signe utile le plus observé (Naraghi et White, 2014). L'intégrité de la greffe est difficile à évaluer sur la totalité de son trajet interarticulaire macroscopiquement lors du prélèvement du grasset et il est probable que l'évaluation par IRM ne soit pas un bon indicateur de l'intégrité de la greffe dans un contexte de rupture partielle. Enfin, l'apport d'une mesure par IRM de la surface musculaire évaluant l'amyotrophie musculaire aurait été non négligeable mais n'a pas pu être réalisé en raison de la taille trop insuffisante pour une évaluation correcte.



# Conclusion

---

Le modèle développé dans cette étude est un modèle original de renfort du LCCr par autogreffe chez le rat. Ce modèle a pour vocation de permettre l'évaluation future de nouveaux matériaux, utilisables comme renfort dans la réparation de ruptures du LCA chez l'homme. Nos résultats montrent que le modèle élaboré répond au cahier des charges fixé : c'est un modèle de pertinence clinique, de faible morbidité et bien caractérisé sur les plans clinique, fonctionnel, histologique, biomoléculaire et des examens d'imagerie (IRM et tomodensitométrie). Les résultats obtenus dans le modèle élaboré confirment la pertinence de l'autogreffe comme modèle de renfort ligamentaire, et soulignent le bénéfice fonctionnel de cette stratégie comparée à des sections simples isolées sans renfort du LCCr. Cependant, un certain nombre de limites inhérentes à ce modèle, en particulier liées à sa petite taille, en font un modèle à réserver aux études préliminaires permettant de trier différents matériaux de renfort avant d'évaluer la solution la plus pertinente chez le grand animal.



# Liste des références bibliographiques

---

- AMIEL D., KLEINER J.B., ROUX R.D., HARWOOD F.L., AKESON W.H. (1986) The phenomenon of Ligamentization: Anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J. Orthop. Res.* 4(2), 162-172
- ANDERSON M.J., BROWNING W.M., URBAND C.E., KLUCZYNSKI M.A., BISSON L.J. (2016) A Systematic Summary of Systematic Reviews on the Topic of the Anterior Cruciate Ligament. *Orthop. J. Sports Med.* 4(3), 232596711663407
- ANDERSSON C., ODENSTEN M., GOOD L., GILLQUIST J. (1989) Surgical or non-surgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament. A randomized study with long-term follow-up. *J. Bone Joint Surg. Am.* 71(7), 965-974
- BAYAR A., SARIKAYA S., KESER S., *et al.* (2008a) Regional bone density changes in anterior cruciate ligament deficient knees: A DEXA study. *The Knee* 15(5), 373-377
- BAYAR A., SARIKAYA S., KESER S., *et al.* (2008b) Regional bone density changes in anterior cruciate ligament deficient knees: a DEXA study. *The Knee* 15(5), 373-377
- BEDI A., KOVACEVIC D., FOX A.J., *et al.* (2010) Effect of Early and Delayed Mechanical Loading on Tendon-to-Bone Healing After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: *J. Bone Jt. Surg.-Am.* Vol. 92(14), 2387-2401
- BENJAMIN M., EVANS E.J., COPP L. (1986) The histology of tendon attachments to bone in man. *J. Anat.* 149, 89-100
- BERRYMAN E.R., HARRIS R.L., MOALLI M., BAGI C.M. (2009) Digigait quantitation of gait dynamics in rat rheumatoid arthritis model. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 9(2), 89-98
- BORSA P.A., LEPHART S.M., IRRGANG J.J., SAFRAN M.R., FU F.H. (1997) The Effects of Joint Position and Direction of Joint Motion on Proprioceptive Sensibility in Anterior Cruciate Ligament-Deficient Athletes. *Am. J. Sports Med.* 25(3), 336-340
- CARBONE A., CARBALLO C., MA R., *et al.* (2016) Indian hedgehog signaling and the role of graft tension in tendon-to-bone healing: Evaluation in a rat ACL reconstruction model: INDIAN HEDGEHOG IN ENTHESIS REPAIR. *J. Orthop. Res.* 34(4), 641-649
- CARSON E., ANISKO E., RESTREPO C., *et al.* (2010) Revision Anterior Cruciate Ligament Reconstruction – *Etiology of Failures and Clinical Results.* *J. Knee Surg.* 17(03), 127-132
- CHEN H., DU J., ZHANG Y., BARNES K., JIA X. (2017) Establishing a reliable gait evaluation method for rodent studies. *J. Neurosci. Methods* 283, 92-100
- COLOMBET P., NEYRET P., TROJANI C., *et al.* (2007) Traitement arthroscopique des échecs des reconstructions du ligament croisé antérieur. *Rev. Chir. Orthopédique Réparatrice Appar. Mot.* 93(8), 54-67
- COSTA-PAZ M., AYERZA M.A., TANOIRA I., ASTOUL J., MUSCOLO D.L. (2012) Spontaneous

- Healing in Complete ACL Ruptures: A Clinical and MRI Study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 470(4), 979-985
- DEEHAN D.J., CAWSTON T.E. (2005) The biology of integration of the anterior cruciate ligament. *J. Bone Joint Surg. Br.* 87-B(7), 889-895
- DHILLON M.S., BALI K., VASISTHA R.K. (2010) Immunohistological evaluation of proprioceptive potential of the residual stump of injured anterior cruciate ligaments (ACL). *Int. Orthop.* 34(5), 737-741
- DHILLON M.S., BALI K., PRABHAKAR S. (2012) Differences among mechanoreceptors in healthy and injured anterior cruciate ligaments and their clinical importance. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2(1), 38-43
- DI MARTINO A., FRANCESCHI F., PAPALIA R., *et al.* (2012) Increased bone mineral density in the non-resurfaced patella after total knee arthroplasty: A clinical and densitometric study. *The Surgeon* 10(1), 20-24
- FIGUEROA D., FIGUEROA F., CALVO R., *et al.* (2015) Platelet-Rich Plasma Use in Anterior Cruciate Ligament Surgery: Systematic Review of the Literature. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* 31(5), 981-988
- FUNAKOSHI Y., HARIU M., TAPPER J.E., *et al.* (2007) Periarticular ligament changes following ACL/MCL transection in an ovine stifle joint model of osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 25(8), 997-1006
- GHALAYINI S.R.A., HELM A.T., BONSHAHI A.Y., *et al.* (2010) Arthroscopic anterior cruciate ligament surgery: Results of autogenous patellar tendon graft versus the Leeds-Keio synthetic graft. *The Knee* 17(5), 334-339
- GOEBEL J.C., BOLBOS R., PHAM M., *et al.* (2010) In vivo high-resolution MRI (7T) of femoro-tibial cartilage changes in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis: a cross-sectional study. *Rheumatology* 49(9), 1654-1664
- HAMIDO F., MISFER A.K., AL HARRAN H., *et al.* (2011) The use of the LARS artificial ligament to augment a short or undersized ACL hamstrings tendon graft. *The Knee* 18(6), 373-378
- HAMPSHIRE V.A., DAVIS J.A., MCNICKLE C.A., WILLIAMS L., ESKILDSON H. (2001) Retrospective comparison of rat recovery weights using inhalation and injectable anaesthetics, nutritional and fluid supplementation for right unilateral neurosurgical lesioning. *Lab. Anim.* 35(3), 223-229
- HARNER C.D., GIFFIN J.R., DUNTEMAN R.C., ANNUNZIATA C.C., FRIEDMAN M.J. (2001) Evaluation and treatment of recurrent instability after anterior cruciate ligament reconstruction. *Instr. Course Lect.* 50, 463-474
- Haute Autorité de Santé (2008) Prise en charge thérapeutique des lésions méniscales et des lésions isolées du ligament croisé antérieur du genou chez l'adulte. *Rev. Chir. Orthopédique Réparatrice Appar. Mot.* 94(8), 787-791
- HAYAMI T., PICKARSKI M., ZHUO Y., *et al.* (2006) Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 38(2), 234-243

- HILDEBRAND C., ÖQVIST G., BRAX L., TUISKU F. (1991) Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat. Rec.* 229(4), 545-555
- HULET C., SONNERY-COTTET B., STEVENSON C., *et al.* (2019) The use of allograft tendons in primary ACL reconstruction. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 27(6), 1754-1770
- JADEJA H., YEOH D., LAL M., MOWBRAY M. (2007) Patterns of failure with time of an artificial scaffold class ligament used for reconstruction of the human anterior cruciate ligament. *The Knee* 14(6), 439-442
- JÄRVINEN M., KANNUS P. (1997) Injury of an extremity as a risk factor for the development of osteoporosis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 79(2), 263-276
- KAPLAN E.B. (1962) Some aspects of functional anatomy of the human knee joint. *Clin. Orthop.* 23, 18-29
- KAWAKAMI Y., TAKAYAMA K., MATSUMOTO T., *et al.* (2017) Anterior Cruciate Ligament–Derived Stem Cells Transduced With BMP2 Accelerate Graft-Bone Integration After ACL Reconstruction. *Am. J. Sports Med.* 45(3), 584-597
- KIAPOUR A.M., FLEMING B.C., MURRAY M.M. (2015) Biomechanical Outcomes of Bridge-enhanced Anterior Cruciate Ligament Repair Are Influenced by Sex in a Preclinical Model. *Clin. Orthop.* 473(8), 2599-2608
- KIRWAN J.R., BYRON M.A., WINFIELD J., ALTMAN D.G., GUMPEL J.M. (1979) CIRCUMFERENTIAL MEASUREMENTS IN THE ASSESSMENT OF SYNOVITIS OF THE KNEE. *Rheumatology* 18(2), 78-84
- KLOEFKORN H.E., PETTENGILL T.R., TURNER S.M.F., *et al.* (2017) Automated Gait Analysis Through Hues and Areas (AGATHA): A Method to Characterize the Spatiotemporal Pattern of Rat Gait. *Ann. Biomed. Eng.* 45(3), 711-725
- KÜHN E., BELLON K., HUYBRECHTS L., HEYNS W. (1983) Endocrine Differences between the Wistar and Sprague-Dawley Laboratory Rat: Influence of Cold Adaptation. *Horm. Metab. Res.* 15(10), 491-498
- LAMPROPOULOU-ADAMIDOU K., LELOVAS P., KARADIMAS E.V., *et al.* (2014) Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 24(3), 263-271
- LELOVAS P.P., XANTHOS T.T., THOMA S.E., LYRITIS G.P., DONTAS I.A. (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp. Med.* 58(5), 424-430
- LOHMANDER L.S., ENGLUND P.M., DAHL L.L., ROOS E.M. (2007) The Long-term Consequence of Anterior Cruciate Ligament and Meniscus Injuries: Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* 35(10), 1756-1769
- MA R., SCHAER M., CHEN T., *et al.* (2019) The Effects of Tensioning of the Anterior Cruciate Ligament Graft on Healing after Soft Tissue Reconstruction. *J. Knee Surg.* , s-0039-1700842
- MAHAPATRA P., HORRIAT S., ANAND B.S. (2018) Anterior cruciate ligament repair - past, present and future. *J. Exp. Orthop.* 5(1), 20



- MAYR H.O., WEIG T.G., PLITZ W. (2004) Arthrofibrosis following ACL reconstruction? reasons and outcome. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 124(8), 518-522
- MIFUNE Y., OTA S., TAKAYAMA K., *et al.* (2013) Therapeutic Advantage in Selective Ligament Augmentation for Partial Tears of the Anterior Cruciate Ligament: Results in an Animal Model. *Am. J. Sports Med.* 41(2), 365-373
- MISTRY H., METCALFE A., COLQUITT J., *et al.* (2019) Autograft or allograft for reconstruction of anterior cruciate ligament: a health economics perspective. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 27(6), 1782-1790
- NARAGHI A., WHITE L.M. (2014) MR imaging of cruciate ligaments. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* 22(4), 557-580
- NAU T., LAVOIE P., DUVAL N. (2002) A new generation of artificial ligaments in reconstruction of the anterior cruciate ligament: TWO-YEAR FOLLOW-UP OF A RANDOMISED TRIAL. *J. Bone Joint Surg. Br.* 84-B(3), 356-360
- NOYES F.R., BUTLER D.L., PAULOS L.E., GROOD E.S. (1983) Intra-articular cruciate reconstruction. I: Perspectives on graft strength, vascularization, and immediate motion after replacement. *Clin. Orthop.* n°172, 71-77
- PANAHIFAR A., JAREMKO J.L., TESSIER A.G., *et al.* (2014) Development and reliability of a multi-modality scoring system for evaluation of disease progression in pre-clinical models of osteoarthritis: celecoxib may possess disease-modifying properties. *Osteoarthritis Cartilage* 22(10), 1639-1650
- PARVATHY S.S., MASOCHA W. (2013) Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system. *BMC Musculoskelet. Disord.* 14(1)
- PERSSON L.G., BERGLUNDH T., LINDHE J., SENNERBY L. (2001) Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin. Oral Implants Res.* 12(6), 595-603
- PRITZKER K.P. (1994) Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann. Rheum. Dis.* 53(6), 406-420
- RAMME A., LENDHEY M., STRAUSS E., KENNEDY O. (2018) A Biomechanical Study of Two Distinct Methods of Anterior Cruciate Ligament Rupture, and a Novel Surgical Reconstruction Technique, in a Small Animal Model of Posttraumatic Osteoarthritis. *J. Knee Surg.* 31(01), 043-049
- ROBERT H., NOUVEAU S., GAGEOT S., GAGNIÈRE B. (2009) Nouveau système de mesure des laxités sagittales du genou, le GNRB®. Application aux ruptures complètes et incomplètes du ligament croisé antérieur. *Rev. Chir. Orthopédique Traumatol.* 95(3), 207-213
- SACCOMANNI B. (2011) RETRACTED ARTICLE: Graft fixation alternatives in anterior cruciate ligament reconstruction. *Musculoskelet. Surg.* 95(3), 183-191
- STOKES E.L., FLECKNELL P.A., RICHARDSON C.A. (2009) Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab. Anim.* 43(2), 149-154
- SUN L., WU B., TIAN M., LIU B., LUO Y. (2013) Comparison of graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction with and without a preserved remnant in rabbits. *The Knee* 20(6), 537-544

- TAKAHASHI T., KONDO E., YASUDA K., *et al.* (2016) Effects of Remnant Tissue Preservation on the Tendon Graft in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Biomechanical and Histological Study. *Am. J. Sports Med.* 44(7), 1708-1716
- THOMAS A.C., WOJTYS E.M., BRANDON C., PALMIERI-SMITH R.M. (2016) Muscle atrophy contributes to quadriceps weakness after anterior cruciate ligament reconstruction. *J. Sci. Med. Sport* 19(1), 7-11
- UDO M., MUNETA T., TSUJI K., *et al.* (2016) Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems. *Osteoarthritis Cartilage* 24(7), 1284-1291
- VAN DER LIST J.P., DIFELICE G.S. (2016) Preservation of the Anterior Cruciate Ligament: A Treatment Algorithm Based on Tear Location and Tissue Quality. *Am. J. Orthop. Belle Mead NJ* 45(7), E393-E405
- WALZ D.M. (2016) Postoperative Imaging of the Knee. *Radiol. Clin. North Am.* 54(5), 931-950
- XEROGEANES J.W., FOX R.J., TAKEDA Y., *et al.* (1998) A Functional Comparison of Animal Anterior Cruciate Ligament Models to the Human Anterior Cruciate Ligament. *Ann. Biomed. Eng.* 26(3), 345-352
- YU S.-B., YANG R.-H., ZUO Z.-N., DONG Q.-R. (2014) Histological characteristics and ultrastructure of polyethylene terephthalate LARS ligament after the reconstruction of anterior cruciate ligament in rabbits. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7(9), 2511-2518
- ZONG J.-C., MA R., WANG H., *et al.* (2017) The Effect of Graft Pretensioning on Bone Tunnel Diameter and Bone Formation After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in a Rat Model: Evaluation With Micro-Computed Tomography. *Am. J. Sports Med.* 45(6), 1349-1358
-



# Annexe 1 : Protocoles de biologie moléculaire

---

Récupération des grassets de rat dans 500 $\mu$ L de tampon RNAlater de Qiagen.  
Conservation à 4°C.  
Retrait du RNAlater, lavage des grassets 3 fois au PBS Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup> 1X stérile.

Dissociation des grassets à la collagénase (de *Clostridium histolyticum* (type IA) Sigma-Aldrich®, réf. C9891), diluée à 1 %.

Incubation à 37°C pendant une heure, jusqu'à détachement des fibres de PCL.  
Dilution de la collagénase dans du PBS Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup> 1X (ajout de 500 $\mu$ L).  
Centrifugation à 1200rpm, pendant 5 minutes.  
Retrait du surnageant, délicatement, sans perturber le culot cellulaire.  
Mélange du culot dans 350 $\mu$ L de tampon RLT (Kit RNeasy mini-kit Qiagen®).

Extraction d'ARN (selon le protocole du kit Qiagen®) :

Ajout d'un volume d'EtOH 70 % a chaque échantillon. Homogénéisation à la pipette.  
Dépôt des échantillons sur les colonnes de purification du kit.  
Centrifugation à 10000rpm, 15 secondes.  
Élimination de l'éluat.  
Ajout de 700 $\mu$ L de Tampon RW1 a chaque colonne.  
Centrifugation à 10000rpm, 15 secondes.  
Élimination de l'éluat.  
Ajout de 500 $\mu$ L de Tampon RPE a chaque colonne.  
Centrifugation à 10000rpm, 15 secondes.  
Élimination de l'éluat.  
Ajout de 500 $\mu$ L de Tampon RPE a chaque colonne.  
Centrifugation à 10000rpm, 2 minutes.  
Élimination de l'éluat.  
Centrifugation 1 minute à 10000rpm.  
Transférer les colonnes sur les tubes de collecte Rnase free.  
Ajouter 30 $\mu$ L d'eau Rnase free a chaque colonne.  
Centrifugation 1 minute à 10000rpm.  
Reprendre les 30 $\mu$ L d'eau dans les tubes et les remettre sur la colonne pour concentrer l'ARN.  
Centrifugation 1 minute à 10000rpm.  
Dosage des ARN.  
Conservation des ARN à -20°C jusqu'à la Reverse Transcription.

Reverse transcription : Selon le protocole du kit High capacity cDNA reverse transcription Life Technologies®.

Component	Volume/Reaction ( $\mu$ L)
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8

10× RT Random Primers	2.0
RNase Inhibitor	1.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease-free H2O	qsp 13,2
ARN	Cf II.F.v.
Total per reaction	20uL

RT programme : 10 minutes 25°C, 120 minutes 37°C, 5 minutes 85°C et la fin à 4°C.  
Les RT sont diluées au 1/10 avec de l'eau Rnase/Dnase free, et stockées à -20°C.

Programme qPCR : 20 secondes 95°C, 40 cycles de 3s à 95°C + 30s à 60°C, puis calculs des melt curve (températures de fusion) 15s à 95°C + 1 minute à 60°C + 15s à 95°C.

Les analyses des qPCR sont effectuées selon les calculs suivants :

$\Delta Ct = Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène endogène (GAPDH)}$  (pour chaque échantillon et témoin)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ témoin}$  (pour chaque gène)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  correspond à l'expression relative du gène cible pour l'échantillon à analyser.

## Annexe 2 : Résultats d'histologie

### ○ Vascularisation : résultats par animal

	IA1	IA2	IA3	T1	T2	T3	Total IA	Total T	Total IA + T
16	1	1	2	2	2	2	1,3333	2	1,6666667
17	1	1	2,5	2	2	1,5	1,5	1,8333	1,6666667
18	0	0	0	2	0	0	0	0,6667	0,3333333
19	0	1	1	0	0	1	0,6667	0,3333	0,5
20	0	0,5	2	2	0	0	0,8333	0,6667	0,75
TO AG	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### ○ Organisation fibrillaire : résultats par animal

	IA1	IA2	IA3	T1	T2	T3	Total IA	Total T	Total IA + T
16	1	1	1	2	1	0	1	1	1
17	0	3	0	1	1	1	1	1	1
18	0	1	0	0			0,333333	0	0,1666667
19	2	2,5	2	2	2	2	2,166667	2	2,0833333
20	2	1	1	1,5	0	0	1,333333	0,5	0,9166667
TO AG	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### ○ Cellularité : résultats par animal

	IA1	IA2	IA3	T1	T2	T3	Total IA	Total T	Total IA + T
16	0	1	1	2	1,5	1	0,666667	1,5	1,0833333
17	2	2	2,5	2	2,5	1	2,166667	1,8333333	2
18	2	1,5	1	1	2	3	1,5	2	1,75
19	2,5	3	3	0,5	0,5	2	2,8333333	1	1,9166667
20	2,5	2	3	1	0	0	2,5	0,3333333	1,4166667
TO AG	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### ○ Nombre de cellules géantes : résultats par animal

	IA1	IA2	IA3	T1	T2	T3	Total IA	Total T	Total IA + T
16	0	0	0	2	2	0	0	1,333333	0,6666667
17	0	2	4	1	3	2	2	2	2
18	2	0	0	0	0	8	0,66667	2,666667	1,6666667
19	0	2	0	0	0	0	0,66667	0	0,3333333
20	0	0	5	3	0	0	1,66667	1	1,3333333
TO AG	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### Evaluation histologique du CAIF : résultats par animal

	G	D	Total G	
16	1+2	0	3	Groupe AG
17	2+1	0	3	
18	3+3	0	6	
19	2+2	0	4	
20	3+3	0	6	
22	3+3	0	6	Groupe SS
23	3+3	0	6	
24	2+2	0	4	
25	2+2	0	4	
26	3+3	0	6	
<b>T0 AG</b>	0+0	0	0	
<b>T0 SS</b>				

X+Y résultats du scoring avec X : infiltration cellulaire à la surface du CAIF ; Y : Fibrose dans le corps du CAIF

### Evaluation histologique de l'ostéointégration : résultats par animal

	IA1	IA2	IA3	T1	T2	T3	Total T
							%
16	/	/	/	25	25	25	25
17	/	/	/	50	50	50	50
18	/	/	/	50	50	50	50
19	/	/	/	25	0	50	25
20	/	/	/	0	0	0	0
<b>T0 AG</b>	0	0	0	0	0	0	0

Evaluation uniquement en intra-osseux

### Mesures de l'épaisseur des membranes synoviales

	Rotule G	Rotule D	G/D	
16	347	169	1,053	Groupe AG
17	337	153	1,203	
18	434	128	2,391	
19	315,5	160	0,972	
20	355,8	143	1,488	
22	392	167	1,34730539	Groupe SS
23	460	158	1,91139241	
24	399	149	1,67785235	
25	437	140	2,12142857	
26	418	190	1,2	



**Scoring utilisé pour l'évaluation histologique du cartilage et résultats par animal**

	Mankin		
	G	D	
16	3+1+0+1	0	Groupe AG
17	2+3+1+1	0	
18	2+1+0+0	0	
19	5+0+0+1	0	
20	0+1+0+1	0	
22	0+1+0+1	0	Groupe SS
23	1+0+2+1	0	
24	2+1+1+1	0	
25	1+1+0+1	0	
26	1+0+0+1	0	

Paramètres évalués	Score
<b>Structure</b>	
· Normale	0
· Surface irrégulière	1
· Pannus et surface irrégulière	2
· Fentes dans la zone de transition	3
· Fentes dans la zone radiaire	4
· Fentes dans la zone calcifiée	5
· Désorganisation complète	6
<b>Cellules</b>	
· Normales	0
· Hypercellularité diffuse	1
· Clones cellulaires	2
· Hypocellularité	3
<b>Coloration</b>	
· Normale	0
· Diminution légère	1
· Diminution modérée	2
· Diminution sévère	3
· Aucune coloration	4
<b>Intégrité de la ligne de séparation</b>	
· Intacte	0
· Traversée de vaisseaux sanguins	1



# Annexe 3: Résultats de TDM

## Densité minérale osseuse et BV/VT– résultats par rat et par rotule

	DMO			
	Rotule G	Rotule D	G/D	G-D/D
16	0,9606	1,0229	0,939	-0,061
17	1,0087	1,079	0,935	-0,065
18	1,0035	1,0669	0,941	-0,059
19	1,0154	1,0566	0,961	-0,039
20	0,9503	1,1026	0,862	-0,138
22	1,03	1,0602	0,972	-0,028
23	0,9813	1,0594	0,926	-0,074
24	0,9522	1,0884	0,875	-0,125
25	1,0056	1,0812	0,930	-0,070
26	0,9886	1,065	0,928	-0,072
TO AG	1,0084	1,0162	0,9924	-0,008

	BV/VT (%)	Total IA	
	Rotule G	Rotule D	Total IA
16	75,84	66,83	1,135
17	77,05	80,69	0,955
18	81,13	82,44	0,984
19	72,78	74,44	0,978
20	82	87,73	0,935
22	76,51	76,49	1,000
23	84,6764 2	85,0292 9	0,996
24	74,8833 5	76,9026 7	0,974
25	78,1811 8	74,6659 4	1,047
26	76,3229 2	81,3876 3	0,938
TO AG	78,38	80,09	0,97864 9

Groupe	Moyenne	Médiane	Écart type	Varianc e
AG	0,927	0,939	0,0381	0,0014 5
SS	0,926	0,928	0,0343	0,0011 8

Groupe	Moyenn e	Médiane	Ecart type
AG	0,997	0,978	0,07935 5
SS	0,991	0,996	0,040

p=0,547

p=0,69  
0

	Microarchitecture osseuse rotule						Total Ep Tr	Total Nb Tr	Total Sep Tr
	Épaisseur trabéculaire		Nombre de trabécules		Séparation des trabécules				
	G	D	G	D	G	D			
16	0,3914	0,3658	1,9379	1,8267 4	0,19556	0,25747	1,06987	1,06086 25	0,75954 5
17	0,3911	0,4174	1,9702	1,9334 2	0,19399	0,21099	0,93696 1	1,01903 88	0,91942 7
18	0,4246	0,4137	1,9109	1,9928 1	0,18919	0,18398	1,02637 4	0,95891 73	1,02831 8
19	0,3286	0,3262	2,2146	2,2823 1,8742	0,22129	0,21153	1,00760 4	0,97035 45	1,04614
20	0,3752	0,4681	2,1857	2,1874 7	0,14614	0,14783	0,80147 8	1,16616 6	0,98856 8
22	0,3472	0,3497	2,2039	2,1874 5	0,19721	0,20261	0,99273 6	1,00752 93	0,97334 8
23	0,3937	0,3968	2,151	2,1428 2,1534	0,14671	0,15009	0,99208 7	1,00380 34	0,97748
24	0,3291	0,3571	2,2757	2,2757 5	0,19697	0,19416	0,92145 3	1,05676 47	1,01447 3

25	0,3738	0,3651	2,0913	2,0451 2	0,17175	0,19926	1,02396 7	1,02257 57	0,86193 9
26	0,372	0,4195	2,0516	1,9400 8	0,19436	0,18489	0,88679 7	1,05748 22	1,05122
T0 AG	0,3817	0,407	2,0533	1,9677 2	0,19985	0,18189	0,93781 9	1,04351 23	1,09874 1

**Epaisseur**

**r** **p=0,547**

Groupe	Moyenne	Médiane	Ecart type	Varianc e
AG	0,9685	1,0076	0,1049	0,0110 1
SS	0,9634	0,9921	0,057	0,0032 4

**Nb** **p=1**

Groupe	Moyenne	Médiane	Ecart type	Varianc e
AG	1,0351	1,019	0,0838	0,0070 2
SS	1,0296	1,0226	0,0261	0,0006 8

**Séparati  
on**

**p=1**

Groupe	Moyenne	Médiane	Ecart type	Varianc e
AG	0,9484	0,9886	0,1163	0,0135 1
SS	0,9757	0,9775	0,071	0,0050 4

**Arthrose** **p=0,547**

Groupe	Moyenne	Médiane	Ecart type	Varianc e
AG	2,301	2,429	0,5233	0,2738 5
SS	2,871	2,800	1,1317	1,2808 4

# MISE AU POINT D'UN MODÈLE DE RENFORT LIGAMENTAIRE ENDOCAPSULAIRE CHEZ LE RAT

---

**AUTEUR : Diane PICHARD**

**RÉSUMÉ :** Les ruptures du ligament croisé antérieur (LCA) sont fréquentes chez l'homme. Les solutions thérapeutiques actuelles, reposant sur le remplacement ligamentaire, sont encore associées à des inconvénients majeurs notamment en termes de résultats cliniques. De nouvelles techniques émergent aujourd'hui pour pallier aux défauts thérapeutiques, reposant sur la préservation des restes du ligament croisé rompu, sa suture lorsqu'elle est possible, et l'utilisation d'un renfort pour guider la régénération tissulaire et maintenir la stabilité de l'articulation pendant la cicatrisation du ligament. Ce projet propose ainsi de développer un modèle de renfort ligamentaire chez le rat.

Les objectifs étaient de mettre au point un modèle original de renfort ligamentaire chez le rat après section du ligament croisé crânial, d'évaluer dans ce modèle l'impact de la fonctionnalisation de l'autogreffe par l'évaluation de sa biofonctionnalité et sa bioactivité.

L'hypothèse formulée est la suivante : l'autogreffe remplit sa fonction de renfort ligamentaire.

Deux groupes de 7 rats Wistar femelles sont constitués de façon aléatoire : un groupe est implanté avec l'autogreffe, selon le modèle de section et renfort ligamentaire préalablement établi, et un groupe voit son LCCr sectionné de façon isolée. L'évaluation effectuée au cours du suivi et au moment du sacrifice des animaux 3 mois après l'intervention a porté sur la comparaison, pour les 2 groupes : du résultat fonctionnel (présence d'une boiterie, d'une laxité en tiroir antérieur, d'une altération des amplitudes de mobilité articulaire, analyse tomodensitométrique des rotules et caractérisation de l'intégrité du renfort par IRM) ; de l'inflammation générée (examen histologique des membranes synoviales, du coussinet adipeux infra-patellaire, du renfort en site osseux et articulaire, biologie moléculaire pour des marqueurs de l'inflammation, diamètre des tunnels osseux) et des lésions chondrales ; de la recolonisation tissulaire du renfort en site osseux et articulaire (examen histologique des renforts en site osseux et intra-articulaire et biologie moléculaire).

Ce travail a permis d'élaborer un modèle de renfort ligamentaire original chez le rat. Les résultats obtenus dans ce modèle montrent que l'autogreffe constitue un renfort satisfaisant sur le plan fonctionnel. En dépit de la pertinence clinique du modèle élaboré, la petite taille du rat en limite l'utilisation aux évaluations préliminaires de nouveaux matériaux de renfort.

## **MOTS CLÉS :**

RUPTURE LIGAMENTAIRE / LIGAMENT CROISÉ ANTÉRIEUR / LIGAMENT CROISÉ CRANIAL / TECHNIQUE CHIRURGICALE / RENFORT LIGAMENTAIRE / GREFFE / MODÈLE ANIMAL / RAT

## **JURY :**

Président : Pr Nicolas DE PROST

1<sup>er</sup> Assesseur : Pr Véronique VIATEAU

2<sup>nd</sup> Assesseur : Dr Eve LALOY

# DEVELOPEMENT OF A MODEL OF ENDOCAPSULAR LIGAMENT ENHANCEMENT IN RATS

---

**AUTHOR:** Diane PICHARD

**SUMMARY:** Ruptures of the anterior cruciate ligament (ACL) are common in humans. Current therapeutic solutions are still associated with major drawbacks, especially in terms of clinical outcomes. Emerging techniques are based on the preservation and the suture when possible of the remnants of the cranial cruciate ligament (CCL), and the use of reinforcement to guide tissue regeneration and maintain joint stability during ligament healing.

The goals of this study were to develop an original model of ligament reinforcement in the rat after section of the CCL, and to assess the impact of functionalization of the autograft, by assessing its biofunctionality and bioactivity.

The major hypothesis was that the autograft fulfils its function of ligament enhancement.

Fourteen female Wistar rats underwent section of the CCr ligament and were randomly assigned to one group in which ligament enhancement was performed with an autograft, and one group in which no enhancement was performed. The comparison between the two groups was carried out during the follow-up period and at the time of the animals' sacrifice, 3 months after surgery. It included (i) the evaluation of the functional result (visual gait analysis, cranial drawer, change in range of motion, MRI and CT analysis); (ii) the inflammation generated (histological examination of synovial membranes, infra-patellar adipose pad, bone and joint site reinforcement, molecular biology for inflammation markers, diameter of bone tunnels) and chondral lesions; (iii) tissue recolonization of the graft in bone tunnels and in the intraarticular space (histological examination of the bone and intra-articular site reinforcements and molecular biology).

This work has led to the development of an original cranial cruciate ligament enhancement model based on a tendon autograft in rats. The results obtained in this model show that the autograft is functionally effective. Despite the clinical relevancy of this model, the small size of the rat limits its use for preliminary evaluation of new materials used for enhancement procedures.

## **KEYWORDS:**

LIGAMENT RUPTURE / CRANIAL CRUCIATE LIGAMENT / SURGICAL TECHNIQUE / RAT MODEL / LIGAMENT ENHANCEMENT / GRAFT / ANIMAL MODEL / ENHANCEMENT PROCEDURES

## **JURY:**

Chairperson: Pr Nicolas DE PROST

1<sup>st</sup> Assessor: Pr Véronique VIATEAU

2<sup>nd</sup> Assessor: Dr Eve LALOY