

50376
1982
55

50376
1982
55

N° d'Ordre: 113

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

THÈSE

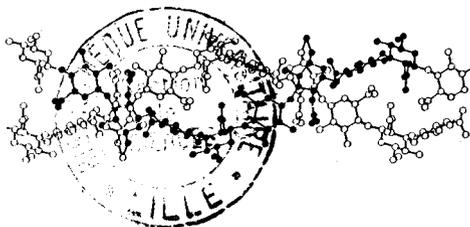
PRÉSENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE LILLE 1
POUR OBTENIR LE TITRE DE

Docteur d'Université en Sciences Naturelles

PAR

Janet L. DENLINGER

METABOLISME DE L'HYALURONATE
DE SODIUM AU NIVEAU DES TISSUS
ARTICULAIRES ET OCULAIRES



Présentée le 11 Mai 1982 devant la Commission d'Examen

JURY: Président : Monsieur J. MONTREUIL
Rapporteurs : Mademoiselle G. SPIK
Monsieur L. ROBERT
Examineurs: Monsieur J. PICARD
Monsieur T. LAURENT



0-10 156209 2

E R R A T A

<u>Page</u>	<u>Ligne</u>	
36	13	<u>pinocytose</u> .
	25	<u>pinocytose</u> du ...
37	1	Le NaHA <u>pinocytosé</u>
43	15	(Balazs, 1965; Laurent, <u>1981</u>).
55	12	insoluble (<u>Laterra</u> et Culp, 1982)
133	6	qu'au moins <u>90%</u> de l'acide
154	Tableau V. Ligne 2/3	... avant l'injection de <u>NaHA</u> dans le ...
	1	Des échantillons d'humeur <u>aqueuse</u> ...
	7	l'humeur <u>aqueuse</u> que ...
155	1	attachement vitréo- <u>lenticulaire</u> normal, ...
170	Fig. 4	Sur l'axe des ordonnés, le NaHA devrait être exprimé en $\mu\text{g/ml}$.
182	6	... la concentration en <u>polysaccharide</u>
184	6	$r_1 = \frac{(m_i + m_{\text{end}}) - m_{18}}{18}$
185	Dernière ligne	NaHA pendant les 18 premières heures est proportionnel à la quantité injectée.
188	6	Donc la vitesse de diffusion <u>dépend seulement de la quantité totale de NIF-NaHA injecté et pas du volume du solvant dans lequel il est dissout.</u>
189	Fig. 9 Ligne 5	à <u>20 mg/ml</u> et après ...
190	23	<u>quantités</u> sous deux volumes différents.
191	Fig. 10	Dans tous ces cas, le volume <u>de lavage</u> injecté était de 0.3 ml.
194	Fig. 11 8/9	... a été calculé (cercles <u>pleins</u>) à ...
	11	été calculé (cercles <u>ouverts</u>) à ...

<u>Page</u>	<u>Ligne</u>	
203	Tableau XIX	Titre : Variation de la concentration en NaHA (<u>mg/ml</u>) dans l'articulation du carpe pendant l'expérience.
211	21	... du NaHA à 40 μ g/ml (0,0004 <u>g/dl</u>).
231	Tableau XXVI	Titre : Teneur en NaHA de la surface du cartilage à des temps différents après l'injection de NIF-NaHA.
245	Tableau XXXI	Dans le rang p_1 , troisième et quatrième colonnes, "NS" remplacé par <u>< 0,01</u> .
280	Tableau XL	Dans la partie descriptive en-dessous du tableau, ligne 9 : l'équation $\ln C/C_0 = -Kt + \ln a$. C_0 est
352	1	<u>Laterra, J. et Culp, L.A. (1982)</u>

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET,
GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE,
LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. CORTOIS

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHCMME Jean	Chimie Organique Biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCCUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGHIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique

M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertziennne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertziennne
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertziennne
M. KREMSSEL Jean	Biochimie
M. LAURENT Francois	Automatique
Mme LICLEROQ Ginette	Catalyse
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertziennne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LODOUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

.../...

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^e MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} NGUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^e PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RACULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^e SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

Le travail présenté dans cette thèse a été aidé par deux différents laboratoires.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude aux directeurs des laboratoires dans lesquels le travail a été mené à bien:

Monsieur le Professeur L. Robert
Directeur du Laboratoire de Biochimie
du tissu Conjonctif
Faculté de Médecine
Université Paris XII
Groupe de Recherche CNRS N°40

Monsieur le Professeur E. Balazs
Matrix Biology Laboratory
Eye Research Division
Columbia Univeristy
New York

Ce sont leur conseils, leurs directives, leur intérêt et leurs encouragements qui ont permis ce travail.

A Monsieur le Professeur Montreuil, qui m'a fait l'honneur d'accepter la Présidence de cette thèse, l'assurance de ma considération.

A Madame le Professeur G. Spik, qui a aimablement accepté d'être le rapporteur de cette thèse, mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Laurent, qui est venu de si loin pour faire partie de ce Jury et qui a toujours été disponible pour me donner de précieux conseils, ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Picard, qui a bien voulu accepter de faire partie du Jury de cette thèse, mes plus sincères remerciements.

A mes coauteurs:

Madame le Docteur J. Labat-Robert, pour le temps passé en projetant et réalisant les expériences sur la fibronectine, et pour la correction grammaticale de cette thèse, ma gratitude la plus sincère et infinie.

Madame S. Briller, pour ses avis en biochimie.

Dr. M. Flood et Dr. J. Forrester, pour l'assistance chirurgicale lors des études sur les singes rhésus.

Dr. B. Jacobson, pour ses conseils en biochimie et en particulier pour les analyses de glycosaminoglycannes.

Dr. D. Stulberg, pour ses conseils et son aide dans l'immobilisation des articulations des lapins.

Dr. C. Weiss, pour son aide dans les techniques chirurgicales orthopédiques et l'évaluation histologique du cartilage.

A tous ceux, qui dans le laboratoire m'ont aidée au cours de diverses étapes des expériences:

Dr. Miklos Szendrofi, de l'Université de Budapest, en stage dans le laboratoire du Tissu Conjonctif,
C. Reynolds-Lasoff, Dr. Thomas, M. Mercandetti, M. Slahetka et D. Deen de Columbia University.

Une mention spéciale à Catherine Robert pour la traduction du texte en français.

A Zsuzsa Korab et John Mack, l'expression de ma sincère gratitude pour les dessins de cette thèse qui furent faits avec imagination et efficacité.

A tous ceux qui m'ont aidée dans l'organisation finale:

Mademoiselle Celia Wallace pour la frappe anglaise et
Mademoiselle Brigitte Rey pour la frappe française,
mes remerciements les plus sincères.

Et enfin, à tous mes amis sans encouragements desquels
ce travail n'aurait pu être mené à bien, ma gratitude
pour leur patience.

Et tout particulièrement à Endre Balazs, mon "Maitre à
penser", mon meilleur ami, mon partenaire scientifique
et mon-coéquipier pour le reste de ma vie, qui a fait
de ce travail une réalité par son imagination et son
travail acharné. J'aimerais lui dédier cette thèse.

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION

GENERALITES	PAGE
I. Structure et fonction du vitré et de l'articulation.	7
A. Le vitré.....	9
1. Gel vitré	
2. Liquide vitré	
B. Tissu synovial.....	14
C. Liquide synovial.....	17
D. Cartilage articulaire.....	20
II. Structure chimique et physique du NaHA.	21
A. Structure chimique.....	21
B. Taille moléculaire.....	24
C. Propriétés rhéologiques.....	26
III. Métabolisme du NaHA.	30
A. Syntèse intracellulaire.....	30
B. Transport dans la matrice.....	33
C. Transport dans le lymphé et le sang.....	34
D. Catabolisme.....	36
IV. Métabolisme de l'hyaluronate de sodium dans l'oeil et l'articulation	39
A. Vitré.....	39
B. Humeur aqueuse.....	42
C. Tissu synovial.....	44
D. Liquide synovial.....	45
E. Surface du cartilage.....	46
V. La fibronectine et son interaction avec les com- posants de la matrice.	48
A. Interaction entre fibronectine et collagène.....	50
1. Collagène dénaturé	
2. Collagène natif	
3. Collagène fibrillaire	
B. Effet et absence d'effet du NaHA sur les inter- actions de la fibronectine.....	53
1. Interaction entre NaHA et FN	
2. Absence d'interaction entre NaHA et FN	
C. La fibronectine dans l'articulation, le vitré et l'humeur aqueuse.....	58
1. Tissu et liquide synoviaux	
2. Cartilage	
3. Humeur aqueuse et vitré	
a. Vitré	
b. Humeur aqueuse	
VI. Modifications pathologiques de la matrice dans les modèles d'arthrite expérimentale.	63
A. Ostéoarthrite induite chirurgicalement.....	66
1. Blessure du cartilage et instabilité de l'articulation	
2. Immobilisation de l'articulation	
B. Exemples d'arthrite induits immunologiquement et chimiquement.....	79
1. Exemples d'arthrite induits par des antigènes	
2. Arthrite induite par la lectine	
VII. Effet thérapeutique de l'acide hyaluronique injecté dans l'articulation et dans l'oeil.	86
A. Effet sur l'arthrite.....	86
1. Modèle animal de l'arthrite	
2. Arthrite traumatique du cheval	
3. Ostéoarthrose humaine	

MATERIELS ET METHODES

I.	Animaux expérimentaux.	91
	A. Singes nocturnes (<u>Aotus trivirgatus</u>).....	91
	B. Macaque rhésus (<u>Macaca mulatta</u>).....	91
	C. Lapins.....	91
	D. Chevaux.....	92
	E. Bétail.....	92
II.	Produits chimiques et réactifs.	93
	A. NaHA.....	93
	1. NaHA non-inflammatoire (NIP-NaHA)	
	a. Pureté	
	b. Immunogénicité	
	c. Impuretés causes d'inflammation	
	d. Solutions de concentrations supérieures	
	à 1%	
	2. Hyaluronate de sodium (NaHA)	
	B. Solution physiologique tamponnée (SPT).....	97
	C. Ovalbumine.....	97
	D. Adjuvant complet bacto de Freund.....	98
	E. Lectines.....	98
	F. α -méthyl-D-mannopyranoside.....	98
	G. Hyaluronidase de sangsue.....	98
	H. Hyaluronidase testiculaire.....	99
	I. Plasma fibronectine et ses anticorps.....	99
III.	Méthodes utilisées dans les expériences sur le	
	liquide vitré.	100
	A. Substitution du liquide vitré: singe nocturne.....	100
	B. Substitution du liquide vitré: macaque rhésus.....	103
	C. Prélèvement d'échantillons de liquide vitré.....	103
	D. Prélèvement d'échantillons d'humeur aqueuse.....	104
	E. Biomicroscopie et ophtalmoscopie.....	104
IV.	Méthodes utilisés pour les expériences sur les	
	articulations.	106
	A. Injection intra-articulaire.....	106
	1. Injection dans l'articulation du lapin	
	2. Injection dans l'articulation du cheval	
	B. Exemples d'arthrite induites chirurgicalement.....	108
	1. Coupe de cartilage sur des zones portantes	
	2. Production d'articulations instables chez	
	le lapin	
	3. Immobilisation de l'articulation du lapin	
	C. Exemples d'arthrites induites immunologiquement	
	et chimiquement.....	112
	1. L'arthrite induite par l'ovalbumine dans des	
	articulations de lapins	
	2. L'arthrite induite par les lectines	
V.	Méthodes cytologiques.	116
	A. Numération cellulaire dans l'humeur.....	116
	B. Evaluation morphologique du traumatisme du	
	cartilage.....	116
	C. Echantillons de cartilage pour electronmicros-	
	copie.....	118

	PAGE
VI. Méthodes biochimiques.	119
A. Détermination du NaHA.....	119
B. Indice de viscosité limite et taille moléculaire.....	128
C. Protéines.....	128
D. Détermination des glycosaminoglycannes (GAG) dans les échantillons tissulaires.....	133
1. Cartilage	
2. Tissu synovial	
E. Prélèvement des couches superficielles du car- tilage bovin et du lapin.....	133
F. Détermination du NaHA dans la couche super- ficielle du cartilage.....	134
G. Méthodes pour les études de fibronectine.....	136
1. Préparation des fibrilles de collagène du vitré	
2. Traitement enzymatique du gel concentré ou des fibrilles en suspension	
3. Méthode d'immunofluorescence indirecte (FN)	
4. Méthode de dosage de la fibronectine par immunonéphélométrie à laser	
VII. Méthodes statistiques.	141
A. Moyenne et erreur standard de la moyenne.....	141
B. Le t statistique.....	142
C. Corrélation: le coefficient de corrélation..... produit-moment de Pearson (r).....	144
D. Régression linéaire.....	145
E. Test du Chi carré.....	145

RESULTATS

I. Le métabolisme du NaHA dans le vitré du singe.	147
A. Singe nocturne.....	148
1. Vitesse d'élimination rapide	
2. Vitesse d'élimination lente	
3. Taille moléculaire ($[\eta]_0$) du NaHA introduit	
4. Rôle du gel vitré cortical antérieur dans l'élimination du NaHA	
5. Influence de la pathologie du vitré sur l'élimination du NaHA	
6. Effet de SPT au liquide vitré sur la con- centration de NaHA de l'humeur aqueuse	
7. Protéines et leucocytes dans le liquide vitré et dans l'humeur aqueuse après intro- duction "intravitréale" de NIF-NaHA et de NaHA	
B. Macaque rhésus.....	164
1. Diffusion du NIF-NaHA à partir du liquide vitré du macaque rhésus	
2. Equilibre du NIF-NaHA injecté entre le gel et le liquide vitré	
3. Taille moléculaire ($[\eta]_0$) du NIF-NaHA injecté	
4. Effet sur la concentration en NaHA de la substitution du liquide vitré par la SPT	
5. Concentration en NaHA de l'humeur aqueuse	
6. Concentration en protéines du vitré et de l'humeur aqueuse après l'introduction intra- vitréale de NIF-NaHA	
II. Prélèvement quantitatif de NaHA à partir des genoux de lapins.	172
A. Technique de lavage de l'articulation.....	172
B. Récupération de liquide de lavage.....	174
C. Effet du volume des lavages individuels.....	177
D. Erreur de la méthode.....	178
E. Taille moléculaire de l'acide hyaluronique endogène.....	179
F. Récupération du NaHA injecté.....	179

	PAGE
III. Métabolisme du NaHA exogène dans l'articulation du genou du lapin.	182
A. Effet de la quantité de NIF-NaHA injecté sur la vitesse de diffusion.....	182
B. L'effet du volume du NIF-NaHA injecté sur sa vitesse de sortie.....	186
C. Temps de demi-vie du NIF-NaHA injecté dans les articulations de lapins.....	190
D. Temps de récupération du contenu en NaHA de l'articulation du genou du lapin après l'injection de NIF-NaHA.....	197
IV. Métabolisme du NaHA exogène dans les articulations du carpe et du jarret des équidés.	201
A. Concentration en NaHA endogène des articulations du carpe et du jarret.....	202
B. Effet de la quantité de NIF-NaHA injecté sur la vitesse de diffusion.....	207
C. Taille moléculaire du NaHA dans le liquide synovial avant et après l'injection de NIF-NaHA endogène.....	211
D. Teneur en protéine du liquide synovial avant et après l'injection intra-articulaire de solution physiologique tamponnée de NIF-NaHA.....	215
E. Temps de demi-vie du NIF-NaHA injecté dans l'articulation du cheval.....	220
V. Hyaluronate de sodium exogène à la surface du cartilage et dans le tissu synovial.	225
A. La surface du cartilage.....	225
B. Tissu synovial.....	234
VI. Effet d'une pathologie induite chirurgicalement sur le métabolisme du NaHA endogène et exogène.	236
A. Introduction d'une aiguille dans l'espace intra-articulaire.....	236
B. Coupes de cartilage sur une zone portante.....	238
C. Instabilité de l'articulation.....	244
D. Immobilisation de l'articulation.....	248
VII. Effet d'une pathologie induite chimiquement sur le métabolisme de NaHA endogène et exogène.	258
A. Effet de l'ovalbumine (albumine de l'oeuf): arthrite induite par un antigène.....	258
B. Effet de la concanavaline A.....	261
VIII. Fibronectine du cartilage articulaire et du vitré.	268
A. Fibrilles du vitré recouverte avec de la fibronectine.....	268
B. Interaction entre fibrilles de collagène purifiées du vitré et de la fibronectine.....	271
C. Interaction entre les fibrilles de collagène du vitré traitées à la trypsine et la fibronectine purifiée.....	272
D. Fibronectine dans la couche superficielle du cartilage articulaire.....	275

DISCUSSION	
I.	Exportation du NIF-NaHA des yeux de singes. 277
II.	Taille moléculaire de NaHA et stabilité de cette molécule dans la matrice extracellulaire. 285
	A. Structure générale..... 285
	B. Le liquide vitré..... 288
	C. Le liquide synovial..... 290
III.	De la teneur en hyaluronate de sodium dans les articulations du cheval et du lapin. 294
	A. Cheval..... 294
	B. Lapin..... 296
IV.	NaHA à la surface du cartilage. 303
V.	Teneur en protéines de l'articulation et réaction inflammatoire provoquée par différents mécanismes de contraintes. 305
VI.	Modifications de la teneur en GAGs du cartilage et du tissu synovial. 312
VII.	Conséquences de l'injection de NIF-NaHA dans l'articulation. 314
VIII.	Du rôle des phagocytes mononucléaires (macrophages) dans le métabolisme du NaHA. 319
IX.	Relation possible entre le métabolisme du NaHA et des protéoglycannes et la réaction inflammatoire. 322
	A. Protéoglycannes..... 322
	B. Réaction inflammatoire..... 323
X.	Interaction entre fibronectine et les fibrilles de collagène du cartilage et du vitré. 327
	A. Cartilage..... 327
	B. Vitré..... 328
	GLOSSAIRE 330
	BIBLIOGRAPHIE 333

INTRODUCTION

Les articulations et l'oeil ont en commun un caractère structural et biochimique très particulier: les deux possèdent un compartiment central liquide, entouré et en contact direct (sans aucune séparation membranaire) avec la matrice solide de tissu conjonctif. De plus, la principale composante du compartiment liquide de ces deux organes est l'hyaluronate de sodium (NaHA).

Au cours des dernières années, des données nouvelles dans deux domaines assez différents ont suscité un grand intérêt dans l'étude du mécanisme de contrôle de métabolisme de NaHA dans différents tissus. De nombreuses études cytologiques et embryologiques ont montré que les molécules de NaHA seules ou en conjonction avec des protéines (fibronectine) ou d'autres glycosaminoglycannes (héparane sulfate et héparine) sont impliquées dans le contrôle de l'adhésion des cellules aux substrats ou à d'autres cellules. Il est également devenu clair, que le NaHA stimule ou inhibe, selon la concentration, beaucoup de fonctions des cellules lymphomyéloïdes. D'autre part, du NaHA hautement purifié est devenu disponible pour l'utilisation thérapeutique et est largement employé dans la chirurgie optique et dans les essais de traitement de pathologies articulaires variées. En conséquence il nous a paru important, d'approfondir nos connaissances sur la manière dont le NaHA contenu dans l'articulation et dans l'oeil est modifié au cours de processus inflammatoires induits expérimentalement, et comment l'excédent de NaHA introduit dans les compartiments des tissus est métabolisé.

Pour cette étude nous avons utilisé des fractions de NaHA apyrogène et très purifié, (NIF-NaHA) à la place de NaHA marqué radioactif. L'intérêt principal était d'accroître et non de marquer le NaHA des compartiments des tissus et donc de simuler les situations pathologiques et thérapeutiques. De plus, même si, les travaux de Laurent et Fraser (1982) ont démontré le succès de l'utilisation de NaHA radioactif pour déterminer le renouvellement de l'hyaluronate dans l'humeur aqueuse et le vitré du lapin, nous n'avons pas pu disposer de suffisamment de NaHA marqué assez pur et stable pour mener à bien nos études. Nous nous sommes proposés d'étudier le métabolisme de cette molécule dans ces deux tissus et d'examiner les moyens par lesquels sa synthèse pourrait être altérée.

La taille moléculaire du NaHA a été étudiée par viscosimétrie. Les glycosaminoglycannes (keratane sulfate, chondroïtine sulfate et NaHA) des échantillons de cartilage et de tissu synovial ont été estimés quantitativement après fractionnement, en utilisant un microdosage spécialement élaboré pour de petits échantillons. Des billes de verre poreux ont été utilisées pour la colonne de fractionnement du NaHA, selon sa taille moléculaire.

Le singe nocturne (Aotus trivirgatus), qui possède un vitré presque entièrement liquide, a été choisi comme animal d'expérience pour les recherches portant sur le métabolisme de NaHA dans le vitré. L'articulation du genou de lapin a également été utilisée pour l'étude in vivo du métabolisme et de la stimulation de la production d'acide hyaluronique par les cellules synoviales. Un autre primate, le macaque rhésus (Macaca mulatta) sélectionné pour son vitré très similaire à celui de l'homme, nous a servi pour quelques expériences sur le métabolisme du NaHA. Nous avons également étudié, sur les articulations des chevaux, le métabolisme du NaHA exogène. La taille élevée de ces articulations et le grand nombre de prélèvements ont permis d'une part de suivre l'expérience de très près et d'autre part de fractionner le NaHA selon sa taille moléculaire.

Deux types d'expérience de remplacement du vitré nous ont servi pour l'étude de l'importance du gel antérieur cortical dans le métabolisme du NaHA de l'oeil: dans la première nous avons brisé la barrière et dans la deuxième nous l'avons laissée intacte. Dans le premier cas, la moitié de vitré (1 ml) du singe nocturne a été remplacée par une solution de 1% de NaHA non phlogogène (NIF-NaHA). La concentration en NaHA qui était ainsi élevée à cent fois au-dessus de la normale par le NaHA exogène, est revenue au niveau normal au bout de sept jours. Dans le second cas, le retour à la normale ne s'est fait qu'au bout de 90 jours après l'injection. Chez le singe rhésus le gel cortical antérieur au vitré est très épais. Il ne peut être altéré facilement sans dommage grave pour l'oeil. Le NaHA injecté s'élimine du vitré par diffusion à travers le gel cortical antérieur et par la chambre postérieure, d'où il passe dans l'humeur aqueuse par le canal de Schlemm, qui peut être considéré pour l'oeil comme un système de drainage lymphatique et le retour à la normale ne se fait qu'au bout de 90 jours.

Etant donné que par aspiration directe avec une aiguille, on ne récupère que très peu de liquide synovial de l'articulation du lapin, nous avons mis au point une technique de lavage permettant d'obtenir de l'acide hyaluronique de l'articulation. Nous avons contrôlé cette technique par des expériences de récupération du NaHA et la nature du NaHA récupéré a été étudiée à l'aide d'enzymes spécifiques (hyaluronidase testiculaire et de sangsue). Nous avons également mis au point une méthode pour étudier la couche superficielle du cartilage articulaire selon un protocole d'épongeage suivi de l'éluat des éponges, de la détermination de la concentration de NaHA dans l'éluat et enfin du contrôle avec la hyaluronidase de sangsue.

Les études de renouvellement avec les articulations du lapin et du cheval montrent qu'il faut de 3 à 7 jours pour que le NaHA injecté s'élimine. Cette différence dans le temps

d'élimination de NaHA dans ces deux tissus conjonctifs est sans doute due aux forces mis en jeu par les mécanismes d'élimination. Les mouvements de mixage dans l'oeil sont très limités, en conséquence l'acide hyaluronique s'élimine du vitré par diffusion, ce qui est parfois facilité quand le gel cortical antérieur est "disloqué". Pour l'articulation, au contraire, le liquide synovial est sujet à brassage à la suite des grands mouvements de l'articulation elle-même. L'acide hyaluronique s'élimine du tissu et du liquide synovial par écoulement et passe dans les vaisseaux lymphatiques. Il n'y a aucune trace d'enzymes extracellulaires ou de phénomène d'oxydo-réduction susceptibles d'altérer la molécule de NaHA. Nous n'avons trouvé aucun catabolisme du NaHA injecté dans aucun de ces compartiments. La taille moléculaire de la substance injectée reste la même dans le vitré, dans la chambre antérieure de l'oeil et dans les échantillons des lavages synoviaux.

Des expériences effectuées sur des articulations immobilisées nous ont permis d'établir l'influence des mouvements de l'articulation sur l'élimination ("exportation") du NaHA des tissus conjonctifs (vers l'extérieur). Le NaHA a été injecté dans les articulations non immobilisées. Nous avons trouvé une différence du simple au double dans le taux de renouvellement de NaHA entre les articulations du genou immobilisées et non immobilisées.

Nous avons également étudié la pénétration du NaHA exogène dans la couche superficielle du cartilage et dans la membrane synoviale. Il s'avère qu'il est possible de provoquer une élévation du taux de NaHA de ces tissus de plusieurs fois leur concentration normale, et plusieurs jours sont nécessaires avant que la concentration revienne à la normale.

Afin de recréer les conditions dans lesquelles se développe l'arthrite, nous avons fait subir aux articulations quelques traumatismes dans le but de stimuler la production de NaHA. Habituellement la crise d'arthrite inflammatoire provoque une surproduction de NaHA par les cellules synoviales. L'hyaluronate est en général de taille moléculaire plus petite que l'hyaluronate présent dans des articulations normales. Nous avons montré que toute stimulation de la membrane synoviale, même la moins agressive, telle que l'insertion d'une aiguille stérile, deux fois par semaine, provoque une stimulation de la production de NaHA. Les stimuli chimiques tels que la concanavaline A et l'ovalbumine, injectées dans l'articulation provoquent tous une augmentation de la production d'hyaluronate. Par ailleurs, des traumatismes mécaniques du cartilage et de la membrane synoviale tels que des entailles, de même que l'immobilisation de l'articulation, provoquent un accroissement de la synthèse du NaHA par les cellules synoviales.

Il apparaît que l'élément principal des états inflammatoires aussi bien dans l'oeil (vitré) que dans les articulations (synovial) est l'invasion cellulaire: l'interposition des cellules (habituellement phagocytes mononucléaires) entre les molécules de NaHA et les matrices des tissus conjonctifs. A la suite de la constatation d'une concentration plus élevée de fibronectine (FN) dans le liquide synovial que dans le plasma de patients atteints d'osteoarthrite et d'arthrite rhumatoïde, il a été suggéré que dans de telles conditions les cellules synoviales synthétisent la FN. De plus de la FN a été trouvée dans la matrice du cartilage régénéré et dans la matrice du cartilage d'embryon. Alors que la FN est localisée dans le liquide vitré de l'embryon de poulet, sa présence dans le liquide vitré de l'adulte n'a pas été observée. L'un des buts de cette thèse était d'établir la présence ou l'absence de FN liée ou libre dans le liquide vitré de l'adulte normal et en cas de présence de définir sa relation avec le réseau de collagène et avec

le NaHA pour ces deux compartiments du tissu conjonctif. L'un des principaux objectifs de cette thèse a été de déterminer la présence ou l'absence de fibronectine dans le vitré et la couche superficielle du cartilage articulaire (pannus). L'explication du rôle éventuel du NaHA dans le contrôle de l'invasion cellulaire doit se faire en fonction de la présence et de la répartition de fibronectine dans ces tissus et de son interaction avec les fibrilles de collagène et les molécules périfibrillaires du NaHA. Cette thèse fait donc état de la localisation par immunofluorescence de fibronectine insoluble et de la détermination quantitative de fibronectine soluble dans ces tissus.

I. Structure et fonction du vitré et de l'articulation

Les matrices intercellulaires de l'espace vitré et de l'articulation ont plusieurs structures et fonctions communes importantes. En premier lieu, les deux sont constituées à la fois d'une partie solide et d'une partie liquide. Dans l'articulation, le cartilage articulaire, le tissu synovial et les ligaments intra-articulaires représentent les parties solides, et le liquide synovial, la partie liquide. Dans l'espace vitré des yeux des primates qui ont servi pour cette expérience, c'est à dire le macaque rhésus (Macaca mulatta) et le singe nocturne (Aotus trivirgatus), les compartiments solides et liquides sont représentés respectivement par le gel vitré et le liquide vitré. Par ailleurs, dans ces deux compartiments la matrice intercellulaire, les matrices solides et liquides sont en contact direct les unes avec les autres, ce qui signifie qu'elles se sont pas séparées par des lames basales ou des couches de cellules. L'articulation et le corps vitré ne sont pas uniques de ce point de vue; nous citerons à titre d'exemple d'autres

systemes matriciels solides et liquides en contact les uns avec les autres comme le tendon et le liquide qui entoure à l'intérieur des capsules tendineuses ou l'espace articulaire et le liquide séparant les fascia (Balazs 1974). Ces interfaces matricielles solides et liquides sont très différentes des tissus contenant des composants liquides comme le péricarde, le péritoine et la plèvre. Ici les liquides péricardial, péritoneal et pleural séparent deux compartiments de tissu conjonctif, solide, qui sont tous les deux bordés de cellules endothéliales et épithéliales sous la lame basale. Une troisième caractéristique commune importante de ces compartiments consiste en l'existence de cellules spécialisées. Dans des conditions normales les matrices liquides ne contiennent pas d'éléments cellulaires. Le tissu conjonctif solide qui l'entoure, le tissu synovial dans l'articulation, le gel vitré cortical dans le vitré, contiennent des phagocytes mononucléaires très spécialisés. Dans le gel vitré cortical ces cellules sont appelées des hyalocytes (Balazs, 1959) et sont responsables de la synthèse de Na-hyaluronate à haut poids moléculaire (Balazs, Sundblad and Toth, 1958; Hultsch et Balazs, 1973). Des cellules de morphologie similaire bordent la couche interne de la membrane synoviale et sont également responsables de la synthèse de l'hyaluronate de Na.

La similarité la plus importante entre le vitré et l'articulation, celle qui a retenu notre attention au

cours de ces expériences, c'est la présence de NaHA dans les matrices liquides et la couche supérieure de cellules qui entourent les matrices solides. Cette présence de NaHA de haut poids moléculaire confère l'unique caractéristique de viscoélasticité à ces matrices liquides. Ce travail a été grandement stimulé par les propriétés rhéologiques inhabituelles de ces deux matrices liquides et par leur importance biologique et médicale.

A. Vitré.

Dans toutes les espèces, le vitré est ou bien solide, ou bien une combinaison de liquide et de solide. Le liquide vitré, s'il est présent est entouré par une couche de gel vitré qui est attaché à la lame basale de la rétine au corps ciliaire et au cristallin. L'épaisseur de la couche de gel varie non seulement en fonction de l'espèce mais également en fonction de l'âge de l'individu de l'espèce considérée. Chez la plupart des singes étudiés, et chez les chevaux, les bovidés, les moutons, les chiens, les chats, les lapins et rongeurs l'espace vitré entier est rempli, pendant toute la vie de l'animal, de gel vitré. Chez l'homme, le macaque rhésus, le singe nocturne, le galago, chez tous les oiseaux et tous les poissons, seulement une partie du vitré adulte est remplie de gel. Le vitré de ces animaux se forme à l'état embryonnaire comme un gel, mais pendant le développement postnatal l'accroissement du volume du gel ne se fait pas à la même vitesse que l'augmentation du volume du globe de l'oeil

et de l'espace vitré. Par conséquent l'espace est rempli de liquide vitré.

1. Gel vitré.

Le gel vitré est caractérisé par la présence de fibrilles de collagène insoluble dans l'eau, qui sont responsables de l'état du gel. Ces fibres de 10 - 20 μm de diamètre forment un réseau d'orientation quasi complètement au hasard et ne sont pas pontées les unes avec les autres. Elles sont similaires au collagène du type II, ce qui signifie que la macromolécule de tropocollagène est faite de trois chaînes d' α_1 (II), comme les fibrilles de la matrice du cartilage. Les similitudes des fibrilles de collagène de ces deux tissus ont été démontrées par la composition en amino acides (Swann, Constable et Harper, 1972), par la longueur des régions hélicoidales (Olsen, 1965) et par la distribution des amino acides polaires le long de ces séquences hélicoidales (Swann et Sotman, 1980). Il a été également démontré (Snowden et Swann, 1980) que la structure des fibrilles du cartilage et du vitré sont très similaires.

Les fibrilles du vitré ont été parmi les premières à être identifiées grâce à la microscopie électronique (Matoltsy, Gross et Grignolo, 1951; Schwarz, 1951a, 1951b). Comme il n'est pas possible de distinguer les terminaisons et que les fibres ne sont pas branchées, nous pouvons supposer que chaque fibre est ancrée dans la lame basale de la rétine, de l'épithélium ciliaire, ou du cristallin (Balazs, 1960, 1973).

Balazs (1954) a introduit le concept d'une variation topographique dans les composants du vitré qui a, plus tard été reconnu dans les matrices de beaucoup de tissus (cornée, sclérotique, cartilage, peau, aorte). Les fibrilles de collagène sont plus denses dans le gel cortical autour de l'épithélium ciliaire et près de la rétine à l'ora serrata. La concentration est moins dense dans d'autres secteurs de la rétine, de la chambre postérieure, et du cristallin, de même qu'au centre et à côté du gel cortical antérieur (Balazs, 1954; 1960; Balazs, Laurent, Laurent, DeRoche et Bunney, 1959; Balazs, Toth, Jutheden et Collins, 1965; Bettelheim et Balazs, 1968; Balazs et Flood, 1978).

Les régions postérieures du gel vitré cortical contiennent également des cellules du vitré ou des hyalocytes (Balazs, 1959), qui sont des histiocytes (phagocytes mononucléaires) situés en permanence dans le tissu conjonctif. Du point de vue morphologique et fonctionnel elles sont similaires à quelques unes des cellules du tissu synovial (Balazs et Denlinger, 1979). Le nombre de cellules de la surface du gel cortical varie avec l'espèce, l'âge et la localisation (Balazs, Toth, Eckl et Mitchell, 1964).

Un autre composant qui varie avec la localisation est le Na-hyaluronate (Balazs, 1954, 1960, 1965; Balazs, Laurent, DeRoche et Bunney, 1959; Schweer et Karell, 1956; Schweer, Grunkorn et Michalik, 1956; Berman et

Michaelson, 1964; Österlin et Balazs, 1968). Sa concentration est la plus forte là où se localisent les hyalocytes (gel cortical postérieur). Sa concentration varie selon un gradient qui va du centre vers la périphérie l'espace retro-cristallinien, ce qui est dû principalement, à la sécrétion de Na-hyaluronate par les hyalocytes dans la matrice entourant les cellules, et en second lieu par les barrières s'opposant au passage du Na-hyaluronate, que représentent les lames basales entre le gel vitré et l'espace intercellulaire de la rétine, le corps ciliaire et le cristallin, et enfin à la relative facilité du passage de la molécule de Na-hyaluronate du gel vitré cortical antérieur exempte de lame basale, vers la chambre postérieure (Balazs et Denlinger, 1982).

La concentration en protéines varie également en fonction de la localisation et son schéma de distribution est pour l'essentiel similaire à celui du Na-hyaluronate (Balazs, 1954, 1960). Ces protéines proviennent principalement des vaisseaux sanguins de la rétine et du corps ciliaire. Une petite partie des protéines proviennent des cellules vitré et des cellules des tissus voisins.

Des glycosaminoglycannes contenant du sulfate de galactosamine (chondroïtine-4-sulfate et heparane-sulfate sous sulfatée) ont été identifiés dans le vitré humain et chez les bovins (Balazs, Sundblad et Toth, 1958; Breen, Bizzell et Weinstein, 1977; Allen, Otterbein et Wardi,

1977)). La concentration de ces galactosaminoglycannes dans le vitré de l'adulte représente moins de 5% de la teneur totale en NaHA.

2. Liquide vitré.

La partie liquide du vitré est un fluide visqueux qui se trouve entre les fibres de collagène. Il contient de l'hyaluronate de Na et une faible concentration en protéines, surtout des protéines seriques. Quand cette phase liquide du vitré est présente, comme dans les yeux des humains adultes, des singes rhésus, des singes nocturnes, des oiseaux et des poissons il est toujours emprisonné dans une couche de gel vitré d'épaisseur variable. Autrement dit, il ne touche jamais la membrane basale du cristallin, le corps ciliaire, ou la rétine. Chez les trois primates mentionnés, le liquide vitré n'est pas présent à la naissance mais apparaît pendant le développement postnatal du globe oculaire. Chez la plupart des espèces animales telles que le lapin, le chien, le chat, la vache, le mouton, et les rongeurs, le liquide vitré n'apparaît jamais (Balazs, Laurent, Laurent, DeRoche et Bunney, 1959).

Le liquide vitré ne contient pas de fibrilles de collagène et ne ressemble pas à l'humeur aqueuse et au plasma sanguin, ni chimiquement ni rhéologiquement (Österlin et Balazs, 1968; Balazs et Flood, 1978; Denlinger, Eisner et Balazs, 1980). Il est plus visqueux que ces deux liquides et cette viscosité est

dûe entièrement à la présence du Na-hyaluronate.

La concentration en protéines solubles non-collagéniques du liquide vitré du singe nocturne est plus basse que dans le gel vitré, et montre une distribution localisée avec la concentration la plus faible dans l'aire centrale (Österlin et Balazs, 1968). Comme nous l'avons trouvé (résultats non publiés), la concentration en protéines du liquide vitré du macaque rhésus est plus basse que celle du gel vitré. Une petite quantité de polysaccharides est probablement présente dans le liquide vitré mais cela n'a pas été encore étudié ni chez l'homme ni chez les deux espèces de singe mentionnées plus haut.

B. Tissu synovial

La surface interne de l'articulation diarthrodiale à l'exception de la surface du cartilage, est recouverte de tissu synovial. La fonction de ce tissu est de métaboliser le liquide synovial et d'agir comme une "structure barrière" qui médie à l'inflammation. Le tissu synovial est divisé en deux parties: une couche intérieure de bordure adjacente à la cavité articulaire (l'intima synoviale ou bordure synoviale) et une couche de tissu conjonctif de support appelée habituellement tissu subsynovial. Cette couche de support est continue avec le tissu conjonctif dense de la capsule fibreuse (Ghadially, 1978).

Les caractéristiques microscopiques et ultrastructurelles du tissu synovial ont déjà été étudiées en détail (Castor, 1960; Barland, Novikoff et Hamerman, 1962; Ghadially et Roy, 1966; Roy et Ghadially, 1967a; Schumacher, 1975; Ghadially, 1978; Hasselbacher, 1981).

L'intima synoviale est faite de cellules mêlées de façon assez lâche à la matrice. Il n'y a pas de membrane basale qui séparerait l'intima synoviale de l'espace synovial ou du tissu subsynovial (Barland, Novikoff et Hamerman, 1962; Coulter, 1962. Ghadially et Roy, 1966, 1969; Roy et Ghadially, 1967a; Roy, Ghadially et Crane, 1966). Key en 1928 a classé les tissus subsynoviaux comme fibreux, adipeux et aréolaire, mais a souligné qu'il s'amalgamaient sans arrêt les uns avec les autres.

Deux types principaux de cellules ont été identifiés dans l'intima synoviale (Barland, Novikoff et Hamerman, 1962). Le type de cellules que l'on rencontre les plus fréquemment est le type A caractérisé par de nombreuses et larges vacuoles, microvillosités et des mitochondries, des fibrilles intracellulaires, un appareil de Golgi important et une pynocytose évidente. Ces cellules contiennent peu de réticulum endoplasmique rugueux. Les cellules de type B, plus rares, sont caractérisées par un réticulum endoplasmique rugueux abondant, un nombre peu élevé de vacuoles, de microvillosités et microvésicules et par un appareil de Golgi moins important. Il existe aussi un type de

cellules intermédiaires qui possèdent à la fois un réticulum endoplasmique rugueux important et un appareil de Golgi important.

Par leurs fonctions, les cellules de type A ont généralement été classées comme cellules phagocytiques alors que les cellules de type B l'ont été comme cellules sécrétrices. Toutefois il est nécessaire de souligner que ce sont seuls les macrophages au repos qui présentent moins de réticulum endoplasmique; les macrophages stimulés présentent au contraire, une hypertrophie du réticulum endoplasmique rugueux (Ghadially, 1975). Dans le tissu synovial pathologique, où l'activité phagocytaire est accrue, on trouve un nombre accru de cellules intermédiaires et de cellules de type B. Ceci semble être le résultat d'un accroissement du réticulum endoplasmique des cellules de type A mais non une substitution de ces cellules par les cellules intermédiaires et les cellules de type B. (Ghadially, 1978).

Les cellules de type A et de type B possèdent les fonctions de phagocytose et de sécrétion, mais ce sont les cellules de type A qui sont les plus actives en phagocytose (Mitnick, Hoffstein et Weissmann, 1978). Ce sont aussi probablement les cellules de type A qui sont responsables de la synthèse du NaHA identifié par autoradiographie dans l'appareil de Golgi et les grandes vacuoles sécrétrices (Roy et Ghadially, 1967b). Les cellules de type B riches en réticulum endoplasmique rugueux produisent

probablement les protéines spécifiques du tissu. Quand il y a un accroissement de la concentration en protéines dans le liquide synovial il y a aussi un accroissement des cellules de type B et des cellules intermédiaires. (Roy et Ghadially, 1967a). Il a déjà été souligné (Balazs et Denlinger, 1979), qu'il existe des similarités morphologiques entre les hyalocytes du liquide vitreux et les cellules de l'intima (surtout en ce qui concerne les cellules de type A).

C. Liquide synovial

Le liquide synovial est en fait une matrice intercellulaire très similaire au liquide vitré de l'oeil. Ces deux liquides contiennent principalement un seul GAG, l'hyaluronate de sodium, et leur viscosité est due à leur contenu en NaHA. Ces deux compartiments liquides sont entourés par un réseau fibrillaire de collagène de type II, contenant un petit nombre de cellules très spécifiques, (hyalocytes ou cellules synovial de bordure (A et B). Dans les deux cas les compartiments ne sont pas séparés des compartiments voisins solides par des lames basales. La fonction principale du liquide synovial est de protéger la surface du cartilage et d'assurer le transport des métabolites à partir et vers le cartilage (pour compte rendu, voir Sundblad, 1965; Balazs, 1974; Swann, 1978). Le liquide synovial a été décrit comme un plasma dialysé (Nettelbladt, Sundblad

et Jonsson, 1963). Pour toutes les espèces étudiées, le contenu en protéines du liquide synovial est moins important que celui du sérum (Schubert et Hamerman, 1968). Pour les genoux d'humains normaux et pour les articulations de bétail, la concentration en protéines ne change pas avec l'âge (Balazs, 1968b), mais s'accroît dans les cas inflammatoires. Dans ces conditions, la présence de protéines d'abord absente du liquide synovial mais présentes dans le plasma (telles les fibrinogènes) devient évidente (Balazs, 1974). Dans les maladies de dégénérescence articulaire la concentration des protéines s'accroît, mais le liquide qui en résulte ne ressemble pas nécessairement au plasma comme dans les cas d'inflammation articulaire. De plus, les concentrations en enzymes et en complexes immuns s'accroissent également dans les cas d'inflammation du liquide synovial. La présence de NaHA dans le liquide synovial ayant déjà été étudié en détail (voir Sundblad, 1965; Balazs, 1974; Swann, 1978), nous n'allons donc qu'en parler brièvement ici. La concentration varie selon les articulations, selon les espèces et selon l'âge. La taille moléculaire du NaHA ne change pas avec l'âge, du moins en ce qui concerne l'articulation du genou humain (Balazs, Watson, Duff et Roseman, 1967). Le liquide synovial normal est élastique et visqueux, propriétés qui changent rapidement avec l'âge et dans des conditions pathologiques (Balazs, 1968b, Balazs et Gibbs, 1970; Balazs, 1974). Le liquide synovial normal est visqueux, surtout pour des contraintes

à faible fréquence et élastique pour des contraintes à haute fréquence. Les propriétés rhéologiques du NaHA du liquide (élastique et viscosité) changent avec l'âge et si l'articulation est atteinte d'arthrite. Le liquide synovial devient progressivement moins rigide et moins visqueux. Il a été suggéré que le liquide synovial altéré n'est pas capable de protéger efficacement la surface du cartilage des contraintes mécaniques (Seppälä, 1965; Balazs, Watson, Duff et Roseman, 1967; Seppälä et Balazs, 1969; Balazs et Gibbs, 1970; Balazs, 1974, 1977).

D. Cartilage articulaire

La surface du cartilage qui se situe vers l'espace synovial, ne contient pas de cellules et n'est pas recouvert de membrane basale. Plusieurs auteurs ont appelé cette couche supérieure "zone tangentielle", "zone superficielle", ou "couche de surface" (pour le compte rendu voir Clarke, 1971). Pour l'aspect structural, cette couche superficielle est comparable au gel vitré: pour les deux tissus le NaHA est le seul GAG présent, et le NaHA imbibe un réseau de collagène. Dans le cartilage cette couche de collagène est mieux organisée (Broom et Myers, 1980), que dans le gel vitré où le réseau est relâché, avec quelques fibres parallèles à la surface.

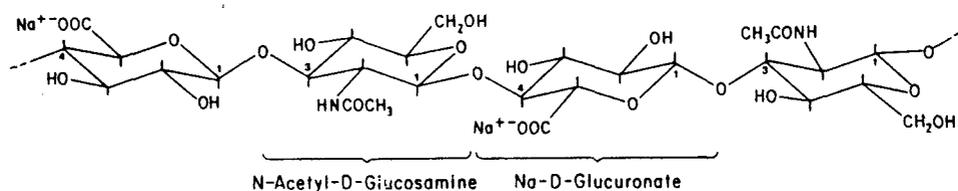
Les histologistes utilisant également le terme de "lamina splendens" pour décrire cette partie du cartilage qui se colore de façon différente des couches cellulaires

profondes. Cette couche se colore moins bien avec les colorants cationiques que les couches profondes. Dans l'articulation bovine adulte, (métacarpe ou métatarse) cette couche superficielle a une épaisseur approximative de 10 μm et est divisée en deux parties. La partie supérieure a une épaisseur de 1 μm et présente après fixation au glutaraldéhyde un précipité amorphe à la surface qui pénètre partiellement un fin réseau de filaments. Ces filaments épais de 6 à 9 μm forment une structure feutrée qui s'interpénètre avec les particules amorphes (Balazs, Bloom et Swann, 1966). La surface humide du cartilage articulaire bovin a également été étudiée par microscopie optique interférentielle (Broom et Myers, 1980). Avec un agrandissement maximal utilisable d'environ 2000X, une structure fibreuse a été observée sur la surface humide. Ces fibres sont parallèles à la surface et ne sont pas orientées au hasard. Les auteurs insistent sur la nature "disciplinée" de cet arrangement fibreux qui ne peut être décrit comme possédant "une forme d'onde géométrique". Cette forme peut être en rapport avec la fonction du cartilage sous jacent (supporter un poids).

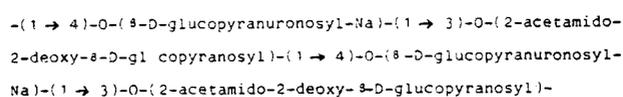
II. Structure chimique et physique du NaHA

A. Structure chimique

Le NaHA est un polysaccharide contenant une unité répétitive de disaccharide composé de D-glucuronate -Na et de N-acetylglucosamino-2-acetamido-2-desoxy-D-glucose liés ensemble par une liaison $\beta 1 \rightarrow 3$ glucosidique. Ces disaccharides liés par une liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ glucosidique forment une longue chaîne de polysaccharide non branchés.



Tetrasaccharide de NaHA



Le hyaluronate de sodium (NaHA) appartient au groupe de polysaccharides appelés glycosaminoglycannes (GAG), c'est à dire des polysaccharides contenant des amino -sucres. Deux différences fondamentales existent entre la structure des autres GAG du tissu animal (chondroïtine 6-S et 4-S, dermatane sulfate, heparane sulfate, heparine, keratane sulfate et chondroïtine) et le NaHA. Les autres GAGs

sont de relativement petites molécules de polysaccharide liés aux protéines avec des liaisons de covalence (MW : $1-4 \times 10^4$). En conséquence, les molécules natives ne sont pas des polysaccharides purs , mais des polysaccharides (parfois de différents types) accrochés à une chaîne peptidique. La molécule résultante est appelée un protéoglycane. Au contraire, le NaHA est une très grande molécule de polysaccharide (MW : $2,6 \times 10^6$) qui pour autant que nous le sachions aujourd'hui n'a pas de liaison covalente avec des peptides ou des protéines. En tout cas des molécules de très grande taille ont été préparées à partir de tissus différents avec seulement de faibles traces d'acides aminés (Balazs et Sundblad, 1959; Balazs, 1979).

La structure primaire du NaHA a d'abord été rapportée par Meyer et Palmer (1934, 1936) et finalement établie par Meyer et ses collègues, par digestion enzymatique et hydrolyse acide (Rapport, Weissmann, Linker et Meyer, 1951; Weissmann et Meyer, 1954; Weissmann, Rapport, Linker et Meyer 1953; Weissmann, Meyer, Sampson et Linker, 1954; Linker, Meyer et Weissmann, 1955; Linker, Meyer et Hoffman, 1956; Hoffman, Linker, Sampson, Meyer et Korn, 1957). L'hydrolyse acide coupe préférentiellement la liaison N-acétylglucosamidique ($\beta 1 \rightarrow 4$). L'endohexosamidase hyaluronidase testiculaire (un mauvais terme car elle n'est pas spécifique de l'acide hyaluronique), coupe exclusivement cette liaison. D'un autre côté, l'hyaluronidase de sangsue (une endoglucuronidase)

hydrolyse exclusivement la liaison glucuronidique (β 1 \rightarrow 3). A cause de sa spécificité cette enzyme est appelé l'acide hyaluronique β 1 \rightarrow 3 hydrolase. Il y a des endohexosaminidases bactériennes (streptocoque, streptomycète, staphylocoque, clostridium) qui dégradent le NaHA et produisent des disaccharides non-saturés avec des doubles liaisons entre le C₄ et le C₅ de l'acide hexuronique. D'autres chercheurs ont rapportés la présence d'autres sucres (arabinose, fucose) dans les préparations de NaHA (Montgomery et Nag, 1963; Varma, Varma, Allen et Wardi, 1974). De récentes et soigneuses analyses des produits de dégradations mono-et oligosaccharidiques de NIF-NaHA hautement purifié et de poids moléculaire élevé n'ont pas confirmé cette hypothèse (même préparation que celle utilisée dans cette thèse) (Longas et Meyer, 1981). L'analyse du produit ou dégradation enzymatique du NaHA (99,6% de rendement) confirme que ce polysaccharide est un polymère non branché de Na-glucuronate et de N-acétylglucosamine dans un rapport molaire de 1 à 1 (à 1% près). S'il contenait des sucres neutres (arabinose, fucose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, ribose et xylose) la concentration de chacun d'entre eux devait être inférieure à <0,02% de la somme des deux composants majeurs.

B. Taille moléculaire

La taille moléculaire du NaHA a été évaluée par plusieurs méthodes: diffusion de la lumière, viscosimétrie, par sédimentation et diffusion, et toutes ces mesures ont montré de façon incontestable que cette molécule est la plus grande molécule du tissu animal. Les études d'Ogston, Sundblad, Varga, Laurent, Balazs, Cleland et de leurs collègues ont clairement montré que le NaHA, hautement purifié à partir de tissus animaux différents (liquide vitré, cordon ombilical, crête de coq, liquide synovial, liquide de mesothélioma) est polydispersé et que son poids moléculaire est compris entre 1,0 et $6,0 \times 10^6$ (Ogston et Stanier, 1950, 1951, 1952; Sundblad, 1953; Varga, 1955; Varga et Gergely, 1957, Varga, Pietruszkiewicz et Ryan, 1959; Laurent, 1957, 1970; Laurent et Gergely 1955; Balazs et Laurent, 1951; Balazs, 1958; Balazs et Sundblad, 1959; Cleland, 1970, 1971, 1977, 1979; Cleland et Wang, 1970).

Ces auteurs ont également souligné que plusieurs facteurs peuvent causer la dégradation de la chaîne pendant l'extraction et la purification de la molécule ou pendant les mesures des paramètres moléculaires. Cette dégradation artificielle et partielle, donne une plus grande polydispersité des molécules, et par conséquent une valeur plus faible de la taille moléculaire. Les agents produisant cet effet sont: les systèmes d'oxydo-réductions présents dans

les tissus (riboflavine,acide ascorbique, produits de la dégradation de l'hémoglobine),les radicaux libres produits dans l'eau (radiation ionisante),les ions métalliques (Fe et Cu),les forces de cisaillement et la chaleur (>40°C). Donc la difficulté résidait dans le prélèvement, la purification et les mesures des molécules sans causer de dégradation artificielle.

Le NaHA n'est pas seulement la macromolécule la plus grande, mais également la plus importante en volume. Dans le milieu ionique physiologique (force ionique $\sim 0,15$ et pH 7,0-7,5) cette molécule occupe un large domaine (volume hydraté spécifique) dans lequel le volume d'eau est 1 à 4×10^3 fois supérieur au matériel organique. Ce concept hydrodynamique d'un large domaine moléculaire sphérique rempli une grande majorité d'eau, s'accorde bien avec le concept d'une pelotte statistique quelque peu rigide, volumineuse, composée d'un polymère linéaire anionique et non branché.

A cause du grand volume spécifique hydraté de la molécule de NaHA dans les solvants physiologiques, les molécules individuelles (dans des solutions de relativement basse concentration; > 0,1 mg/ml) s'interpénètrent et se mélangent Ceci crée des interactions moléculaires qui déterminent le caractère rhéologique des liquides biologiques contenant du NaHA tels le liquide vitré et le liquide synovial. Les deux qualités rhéologiques sont la thixotropie et la viscoélasticité.

C. Propriétés rhéologiques

La dépendance de la viscosité du cisaillement et le birefringence d'écoulement des solutions contenant du NaHA a donné lieu à de nombreuses investigations (Ogston et Stanier, 1950, 1951, 1953; Sundblad, 1953; Varga et Gergely, 1957; Balazs, 1958 - voir compte rendu, Sundblad, 1965). La thixotropie indique une interpénétration des chaînes non spécifique qui peut être mieux mesurée. Par exemple la viscosité d'une solution de NaHA à 1 mg/ml (MW $1,6 \times 10^6$ force ionique physiologique et pH à 25°C) deviendra indépendante de la force de cisaillement à moins de 300 sec^{-1} . Avec l'augmentation de la concentration les interactions interchaînes (inter- et intramoléculaire) augmentent et la dépendance de la viscosité de la force de cisaillement croît rapidement. A une concentration de 5,5 mg/ml le même NaHA dans le même solvant aura une viscosité indépendante des forces de cisaillement à seulement 3 sec^{-1} (Morris, Rees et Welsh, 1980). Un accroissement de 5 fois de la viscosité donne une solution 100 fois plus dépendante des forces de cisaillement.

Le comportement viscoélastique des solutions de NaHA a également été étudié (Ogston et Stanier, 1950, 1953; Balazs, 1966, 1968b; Gibbs, Merrill, Smith et Balazs, 1968; Balazs et Gibbs, 1970; Lai, Kuei et Mow, 1977, 1978; Anadere, Chemeil et Laschner, 1979). Les solutions de

NaHA de haut poids moléculaire ($MW > 1 \times 10^6$) à une concentration de 0,5 - 4,0 mg/ml dans un milieu ionique physiologique sont de prédominance visqueuses quand elles sont exposés à des forces de cisaillement de basse fréquence et deviennent à prédominance élastique quand elles sont exposés à des forces de cisaillement de haute fréquence. Cette transition se passe sur un relativement court intervalle de fréquence (1 - 10 radians sec^{-1}). Pour le caoutchouc naturel et les élastomeres synthétiques, cette transition se produit dans un intervalle de fréquence de plusieurs décades. La transition viscoélastique de la solution de NaHA purifiée du liquide synovial (humain et bovin) a été expliquée par la dislocation et la reformation rapide d'un réseau moléculaire à interaction hydrogène. Les chaînes moléculaires subissent sous basse fréquence, progressivement, et de plus en plus fort un déroulement segmentaire et une relaxation. Sous haute fréquence, la réassociation des pelottes n'est pas complète, et la déformation qui en résulte signifie que l'énergie mécanique est stocké sous forme d'élasticité.

Il a été souligné (Balazs et Gibbs, 1970) que le rapport de l'énergie emmagasiné et dissipé par le NaHA dans le liquide synovial bovin et humain dépend de la concentration et de la taille de la molécule et de la fréquence. La fréquence à laquelle un tel fluide passe d'un état à prédominance visqueuse à un comportement à prédominance élastique est comprise dans un intervalle comparable à la

fréquence de tension subie par exemple par l'articulation du genou humain pendant la marche ($0,2 \text{ cycles sec}^{-1}$) et la course ($2,5 \text{ cycles sec}^{-1}$). Dans le liquide synovial du genou d'un jeune homme (18 à 24 ans) à $2,5 \text{ cycles sec}^{-1}$, 70-80 % de l'énergie dépensée est gardée, stockée sous la forme d'élasticité. Avec le vieillissement les propriétés élastiques du liquide d'articulation normale diminuent, et dans les liquides âgés (> 40 ans) seulement 40-50% de l'énergie est mis en réserve. Pour tous les liquides pathologiques étudiés pour leur viscoélasticité, le changement le plus dramatique était souvent la diminution et souvent la disparition complète du comportement élastique. Le comportement viscoélastique du liquide synovial et des solutions pures de NaHA a été directement relié au paramètre de recouvrement des pelottes (concentration de NaHA $\times [\eta]_0$; Balazs, 1968b; Morris, Rees et Welsch, 1980), ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle l'association moléculaire (chaîne à chaîne) est le principal responsable du comportement viscoélastique. Il a été souligné que les solutions de NaHA sont plus sensibles à cette association chaîne à chaîne que les polymères synthétiques (Morris, Rees et Welsh, 1980).

Dans la plupart des polymères industriels, la valeur du paramètre de recouvrement ($c \times [\eta]_0$) est comprise entre 10 et 30 au début de l'association. Pour le NaHA les valeurs sont comprises entre 2 et 3. Elles sont proches des valeurs calculées pour les paramètres moléculaires du

NaHA ($c \times [\eta]_0 \approx 1,5$) en admettant que la configuration de la pelotte statistique occupe un large domaine sphérique. Tout ceci indique que la taille moléculaire et la concentration en NaHA des différentes matrices de tissu conjonctif (liquide vitré, tissus articulaires et tissu conjonctif souscutané) sont comprises dans un intervalle tel que les propriétés rhéologiques uniques de ses solutions peuvent être d'une grande importance pour leur fonction biologique (Comper et Laurent, 1978).

III. Métabolisme du NaHA

Le NaHA est le seul GAG à être non seulement un composant ubiquitaire de la matrice du tissu conjonctif des vertébrés et à être présent également dans la capsule de quelques bactéries. La production bactérienne du NaHA a été démontré assez tôt (Kendall, Heidelberger et Dawson, 1937; Seastone, 1939). La biosynthèse bactérienne (streptocoque groupe A) du NaHA dans les systèmes acellulaires a été réalisée par Dorfman et ses collègues (Markowitz, Cifonelli et Dorfman, 1959): Markowitz et Dorfman, 1962; Stoolmiller et Dorfman, 1969). Dans cette brève revue nous allons résumer le métabolisme du NaHA chez les vertébrés.

A. Synthèse intracellulaire

Depuis que Glaser et Brown (1955) ont décrit les premiers la synthèse acellulaire de NaHA par des enzymes particulières des cellules de poulets atteints du sarcome de Rous, plusieurs chercheurs ont contribué à approfondir nos connaissances sur les étapes de cette synthèse (voir pour compte rendu, Jacobson, 1970). L'on sait que deux nucléotides sucres- l'acide UDP-glucuronique (UDP-GlcUA) et l'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) - sont les deux constituants de base. La liaison β 1 \rightarrow 3 entre l'extrémité réductrice du GlcUA et l'extrémité non réductrice du GlcNAc peut être établie par addition de résidus d'acide glucuronique à une longue chaîne non définie d'accepteurs-NaHA (Stoolmiller et Dorfman, 1969). La manière dont la

liaison 81→4 est établie n'est pas très claire. Plusieurs auteurs (Jacobson, 1970; Rodén, 1980) ont souligné que les expériences de synthèse du chondroïtine-sulfate ne permettent pas de comprendre celle du NaHA. Par exemple les hexa et penta saccharides du NaHA n'ont pas de fonction d'accepteur des nucléotides sucres en présence de glycosyl transférases par opposition à ce qu'on sait de la synthèse du chondroïtine sulfate. Ceci peut naturellement faire penser à la participation d'intermédiaire lipidiques comme dans la synthèse de quelques polysaccharides bactériens (Rodén, 1980). Toutefois une étude sur les intermédiaires lipidiques n'a pas donné de résultat à ce jour (Stoolmiller et Dorfman, 1969). La différence entre la synthèse du chondroïtine sulfate et celle du NaHA a également été mise en évidence grâce à l'effet des inhibiteurs de la synthèse des protéines (puromycine et chloramphénicol) sur la formation de ces deux GAGs. Ces inhibiteurs préviennent complètement la synthèse du chondroïtine sulfate mais n'affecte que légèrement la synthèse du NaHA (Matalon et Dorfman, 1968; Smith et Hamerman, 1968; Stoolmiller et Dorfman, 1969). Il est intéressant de noter que les inhibiteurs de la synthèse des peptidoglycannes (Bacitracine) n'ont aucun effet sur la synthèse du NaHA (Siewert et Stominger, 1967).

Des études relativement récentes réalisées par Jacobson (1978a,b,) sont intéressantes surtout parce que

les enzymes de la synthèse du NaHA utilisés, les glycosyl transférasés, ont été préparés à partir des hyalocytes du liquide vitré du bétail. Il a trouvé que l'UDP-[³H]-GlcNAc et l'UDP-[³H]GlcUA s'incorporent dans un NaHA de poids moléculaire élevé en présence des enzymes marqués au cours de ce processus, il pense que cela peut représenter un complexe enzyme-substrat à partir duquel la chaîne de NaHA est libéré lorsque le processus de polymérisation est complet. On suppose que la synthèse du NaHA, ou au moins l'initiation de la chaîne, se passe dans l'appareil de Golgi (Barland, Smith et Hamerman, 1969). On ignore comment cette grande molécule, à volume hydraté de $\sim 0,3 \times 0,1 \mu\text{m}$, réussit à contenir dans le petit espace de l'appareil de Golgi, ou dans n'importe quelle organelle intracellulaire. Naturellement on peut supposer qu'au cours de la synthèse intracellulaire, la molécule n'est pas sous sa forme hydratée désordonnée mais qu'elle est arrangée d'une manière plus dense en hélices parallèle d'une manière similaire à celle que l'on trouve dans les solutions concentrées et dans les couches de NaHA purifié (Morris, Rees et Welsh, 1980). Le NaHA peut être attaché aussi aux protéines (selon toute vraisemblance au système transférasé pendant la synthèse intracellulaire (Jacobson, 1978a). Il a été suggéré (Mikuni-Takagaki et Toole, 1981) qu'une protéine transporteur du NaHA lui est attachée

jusqu'à ce que la grande molécule atteigne la surface de la cellule. Alors, le polyssacharide est rejeté et éventuellement détaché de la protéine libérant le NaHA vers la matrice extracellulaire. Ceci expliquerait que la majeure partie de la grande molécule de NaHA extracellulaire est exempte de protéines.

B. Transport dans la matrice

Le mouvement extracellulaire des grandes molécules de NaHA est contrôlé soit par diffusion, comme dans le liquide vitré ou par masse d'écoulement d'eau comme dans l'humeur aqueuse, ou encore par des mécanismes compliqués de mouvements et de pressions présents dans les tissus comme dans les articulations diarthroïdiales ou synoviales. Le mécanisme de transport qui prévaut dans la matrice dépend de la physiologie du tissu. Excepté pour l'oeil (vitrée et humeur aqueuse) et pour l'articulation (liquide synovial et tissu synovial) le transport de NaHA dans un compartiment donné de la matrice et entre deux compartiments de cette matrice n'a pas été étudié. Comme le thème principal de cette thèse porte sur la diffusion du NaHA exogène de l'oeil et de l'articulation, l'origine cellulaire et le transport du NaHA dans ces deux organes sera étudié séparément (voir Section IV).

Dans la matrice normale, non-perturbée, les grandes molécules de NaHA ne sont pas dégradées pendant le transport. Ceci est évident, car le liquide synovial des articulations

normales de l'homme, au cheval ou des bovins, prélevées stérilement et sans contamination sanguine, est stable à 4 - 37°C. C'est à dire qu'aucun changement de la taille moléculaire du NaHA endogène n'a pu être observé. Nous n'avons pas trouvé non plus dans ces liquides d'éléments qui ajoutés aux grandes molécules de NaHA pourraient causer leur dégradation. La même chose a pu être observée pour le liquide ou le gel vitré des yeux d'homme, de moutons ou de singes en l'absence de hyalocytes. Le liquide vitré des bovins semble être une exception car quand l'oeil est ouvert à l'oxygène atmosphérique et exposé à la lumière, la viscosité du NaHA endogène baisse rapidement. Cette baisse ne commence pas avant l'ouverture de l'oeil, ou avant la cytolysse postmortem des hyalocytes et des autres cellules avoisinantes (voir pour revue, Balazs, 1965 et Sundblad et Balazs, 1966).

C. Transport dans le lymphé et le sang

Il a été suggéré que le NaHA de la matrice du tissu conjonctif de l'articulation passe dans les nodules lymphatiques. Cette suggestion a été basée premièrement sur les changements observés dans les nodules lymphatiques périarticulaires après injection de NaHA dans les articulations (Curri et Campailla, 1967; Tischendorf et Curri, 1958). Plus tard, de la radioactivité a été observé dans les nodules lymphatiques avoisinants après injection de [^{14}C] NaHA dans les articulations (Antonias, Fraser, et Muirden, 1973). Des recherches récentes

(Laurent et Laurent, 1981) ont éyayé cette suggestion en montrant que la concentration en NaHA de la lymphe intestinale et poplitée est beaucoup plus importante que celle du plasma du même animal. Ces auteurs ont trouvé une concentration en NaHA de la lymphe intestinale des agneaux de 40 µg/ml et du plasma de 0,7 µg/ml. Chez le mouton adulte la lymphe poplitée présente une concentration de 11 µg/ml et le sang de 0,4 µg/ml.

La présence de HA dans le plasma de l'homme normal et au cours d'états pathologiques a été discuté par plusieurs auteurs (Deutsch et Mortan, 1956; Shiller et Dewey, 1956). Deutsch (1957) a purifié le NaHA du sérum de patients porteur de tumeurs et a trouvé un poids moléculaire de 58,000 par sédimentation et diffusion. L'analyse électrophorétique des GAGs du plasma humain a également suggéré la présence de petites quantités de NaHA (Friman et Brunish, 1966; Taniguchi, Moriya at Nanbo, 1974). Murata et Horiuchi (1977) ont trouvé qu'à peu près 10% de la teneur en GAGs totaux isolés du plasma est du NaHA (~0,9 g/ml).

Le récent développement d'une méthode de dosage du NaHA dans de petits échantillons de liquides tissulaires et de sang va permettre d'importantes études (Tengblad, 1980). Cette méthode utilise l'affinité spécifique de la protéine de cartilage marquée à l' [¹²⁵I] pour le NaHA. Il a été possible de déterminer avec précision pour la première fois la concentration en NaHA du sang (0,21 µg/ml de sérum humain) (Laurent et Tengblad, 1980). Des analyses plus

détaillées ont montré qu'il n'y a aucune différence dans la concentration en NaHA de l'homme normal en fonction du sexe ($0,32 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ pour les sujets de sexe masculin et $0,33 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ pour ceux du sexe féminin). Il n'y a eu de même aucune différence en fonction de l'âge entre 20 et 54 ans (Laurent et Laurent, 1981).

D. Catabolisme

L'idée que, le système endothélial réticulaire est responsable de la clairance des particules chargées négativement et des grandes molécules polyanioniques des liquides tissulaires est généralement acceptée. Les cellules de ce système exercent cette fonction par phagocytose et par pynocytose. Comme le NaHA est la plus grande molécule polyanionique de la matrice extracellulaire il est possible de supposer qu'elle est pynocytosée par les phagocytes mononucléaires, par les granulocytes ou par des cellules endothéliales. Il n'y a aucune preuve directe que ces cellules prennent le NaHA dans leur environnement. Toutefois il a été montré que du [^3H]-NaHA injecté par voie intraveineuse disparaît rapidement principalement au niveau du foie (80%) (Fraser, Laurent, Pertoft et Baxter, 1981). La radioactivité a été observée principalement dans les cellules non-parynchymateuse. On se serait attendu à ce que les macrophages du foie (cellules de Kupffer) soient responsables de la pynocytose du NaHA du sang.

Le NaHA pynocytosé dans ces cellules est rapidement dégradé. Le ^3H du groupe acetyl marqué apparait dans le plasma sous la forme de $^3\text{H}_2\text{O}$ en 20 minutes. Cette dégradation est rapide et complète. Une petite quantité de [^3H]-NaHA a également été captée par la rate. Les macrophages des nodules lymphatiques peuvent également capter un peu du NaHA qui passe par le système lymphatique (Antonias, Fraser, et Muirden, 1973). Il a également été suggéré que les macrophages du liquide vitré (hyalocytes) pynocytent le NaHA de leur environnement extracellulaire (Freeman, Jacobson et Balazs, 1979). L'excrétion rénale de NaHA représente probablement moins de 10% du NaHA total éliminé du sang journallement dans des conditions normales. Pour le lapin et pour l'homme le poids moléculaire limite supérieur des molécules de NaHA excrétées par le rein est inférieur à 25,000 (Fraser, Laurent, Pertoft et Baxter, 1981; Laurent et Laurent, 1981).

Le temps de demi-vie du [^3H]-NaHA injecté par voie intraveineuse ($\bar{M}_w = 1,2 - 4,7 \times 10^6$) était de 2,5 - 4,5 minutes pour les lapins et de 2,4 - 4,5 minutes pour 4 volontaires humains en bonne santé (Fraser, Laurent, Pertoft et Baxter 1981; Fraser, Laurent, Engström, Laurent et Laurent, 1982). Ces auteurs ont conclu que si la concentration en NaHA du sang humain est de 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ceci signifie que chaque jour 300 - 400 mg de NaHA passe par la circulation sanguine. Chez le lapin cette vitesse de renouvellement est de 10 mg par kg par jour. Mais après avoir rempli le système avec

du NIF-NaHA non-marqué la capacité de clairance a été triplée (Fraser, Laurent, Pertoft et Baxter, 1981).

Les systèmes enzymatiques intracellulaires responsables de cette dégradation complète des grandes molécules de NaHA dans les macrophages sont le plus certainement situés dans les lysosomes des cellules phagocytes.

L'endo- β -N-acetylhexosaminidase est présente dans ces organelles (pour une revue voir - Davidson, 1970).

Les deux exoglucosidases β -D-glucuronidase et β -D-acetylhexosaminidase se trouvent également dans le système lysosomal (pour une revue, voir Rodén, 1980). L'activité catabolique combinée de ces enzymes du NaHA n'est pas connue mais de récentes études de T.C. et de U. Laurent et de leurs collaborateurs ont permis de mieux comprendre les voies cataboliques du NaHA dans le corps entier.

IV. Métabolisme de l'hyaluronate de sodium dans l'oeil et l'articulation

A. Vitré

Le NaHA est synthétisé par les hyalocytes du vitré (Balazs, Sundblad et Toth, 1958; Balazs, 1965) ou par les glycosyl-transférases qui en ont été isolées. (Österlin et Jacobson, 1968; Jacobson, 1975). Les hyalocytes sont des phagocytes mononucléaires (histiocytes) localisés dans le gel cortical du vitré, qui possède des granules basophiles contenant le NaHA (Szirmai et Balazs, 1958; Freeman, Jacobson et Balazs, 1979) et des glycosyl-transférases nécessaire à la synthèse du NaHA (Jacobson, 1978 b; Österlin et Jacobson, 1968). Le NaHA du vitré est radioactivement marqué lorsque le gel vitré contenant les hyalocytes a été incubé in vitro avec du [^{14}C] glucose ou de la [^{14}C] glucosamine (Balazs, Sundblad et Toth, 1958; Balazs, 1965; Berman et Gombos, 1969).

Le métabolisme du NaHA exogène a été également étudié dans le vitré. Du NaHA ($[\eta]_0$: 1200 cc/g) a été injecté dans le vitré du lapin et du mouton. Dans ces deux espèces la diffusion a été très lente, puisque 8 jours plus tard, 65 - 75% du NaHA injecté était encore présent dans le vitré (Widder, 1962).

Toutefois, la plupart des études du métabolisme de NaHA dans le vitré ont été conduites sur les yeux du singe nocturne (*Aotus trivirgatus*). Le vitré de ce primate

comprend un grand volume (~2 ml) de liquide vitré (98% du volume total) et une concentration élevée en NaHA (300-600 µg/ml). Quand des enzymes dégradant le NaHA (hyaluronidases de sangsue ou de testicule sont injectés dans le vitré de cet animal, le poids moléculaire et la concentration en NaHA tombe à un niveau très bas. Les conditions ne reviennent à la normale que 60 à 90 jours plus tard (Balazs, 1968a; Algvere et Balazs, 1974; Hultsch, Freeman et Balazs, 1974). Un temps aussi long est nécessaire pour obtenir une concentration normale en NaHA dans le vitré, après remplacement de la moitié de son volume par de la solution physiologique tamponné stérile, (Sweeney et Balazs, 1964; Österlin, 1968a, 1969; Swann et Constable, 1972). Quand de la [¹⁴C] glucosamine a été injecté par voie intramusculaire, le NaHA extracellulaire de poids moléculaire élevé est radioactif, toutefois il n'y a pas de renouvellement significatif en 72 jours (Österlin, 1968b). L'enlèvement de la moitié du vitré et donc de la moitié du NaHA de ce compartiment et son remplacement par du SPT provoque un accroissement significatif du NaHA radiomarqué suggérant ainsi une stimulation de la synthèse (Österlin, 1968a).

Il est important d'observer que dans les yeux aphaques la concentration en NaHA est très basse comparé à celle de l'oeil normal. Cette baisse de la concentration en NaHA peut être observée après extraction intracapsulaire du cristallin mais pas après l'extraction extracapsulaire

(Österlin, 1977a). Chez les singes nocturnes l'extraction extracapsulaire du cristallin provoque le même effet. Il a été suggéré que le prélèvement de la capsule lenticulaire et le dommage concomittant du gel cortical antérieur du vitré provoque une plus grande section transversale dans la partie antérieure du vitré à travers laquelle le NaHA peut diffuser dans la chambre antérieure. Ceci aura pour résultat une concentration plus faible et stable du NaHA dans le vitré sans aucun changement dans la vitesse de synthèse (Österlin, 1977b, 1978). Une vitesse de diffusion très rapide du NaHA exogène à partir de l'espace du liquide vitré de l'oeil du singe nocturne a tout d'abord été décrite (temps de demi-vie, ~36 heures; Sweeney et Balazs, 1964; Balazs, 1965; Balazs et Sweeney, 1966; Balazs, Freeman et Regnault, 1973). Plus tard un temps de demi-vie plus lent (~ 15 jours) a été observé pour la même espèce de singe, ce qui était probablement dû à une variation technique de l'échange de la moitié du liquide vitré par le même volume de NaHA exogène (Hultsch et Balazs, 1975; Balazs et Hultsch, 1976). Un des buts des études présentés dans cette thèse, a été de suivre la vitesse de diffusion du NaHA exogène à partir du liquide vitré des yeux de primate et de trouver une explication à la grande variation des temps de demi-vie reportés précédemment.

B. Humeur aqueuse

La présence de NaHA dans l'humeur aqueuse des yeux du bétail a été décrite pour la première fois par Meyer et ses collaborateurs (Meyer et Palmer 1936; Meyer, Smith et Gallardo, 1938). Auparavant, une substance visqueuse et acidoprécipitable avait été découverte dans la chambre antérieure de plusieurs espèces de hiboux (Abelsdorff et Wessely, 1909) qui comme on a pu l'observer plus tard pouvait être attaquée par les hyaluronidases (Bárány, Berggren et Vrabec, 1957). Les analyses chimiques ont montré que cette substance visqueuse était du NaHA qui était inégalement distribué dans la chambre antérieure de ces espèces. Il existe une concentration graduellement décroissante de l'endothélium de la cornée au cristallin. Plus tard du NaHA a été découvert dans l'humeur aqueuse de beaucoup d'autres espèces (Balazs, Laurent et Laurent, DeRoche et Bunney, 1959; Laurent, Barany, Carlsson et Tidare, 1969).

Dans l'oeil du singe macaque une fine couche de substance visqueuse a été trouvée sur l'endothélium de la cornée (Wolf, 1968). Les cellules endothéliales de la cornée produisent entre autre GAGs, du NaHA (Yue, Baum et Silbert, 1976, 1978). Des méthodes histochimiques et la microscopie électronique à balayage ont également montré la présence de substances visqueuses polyanioniques à la surface de l'endothélium de la cornée de plusieurs espèces (Vrabec, 1958, 1961; Kloucek, 1967; Jacobsen et

Sperling, 1978).

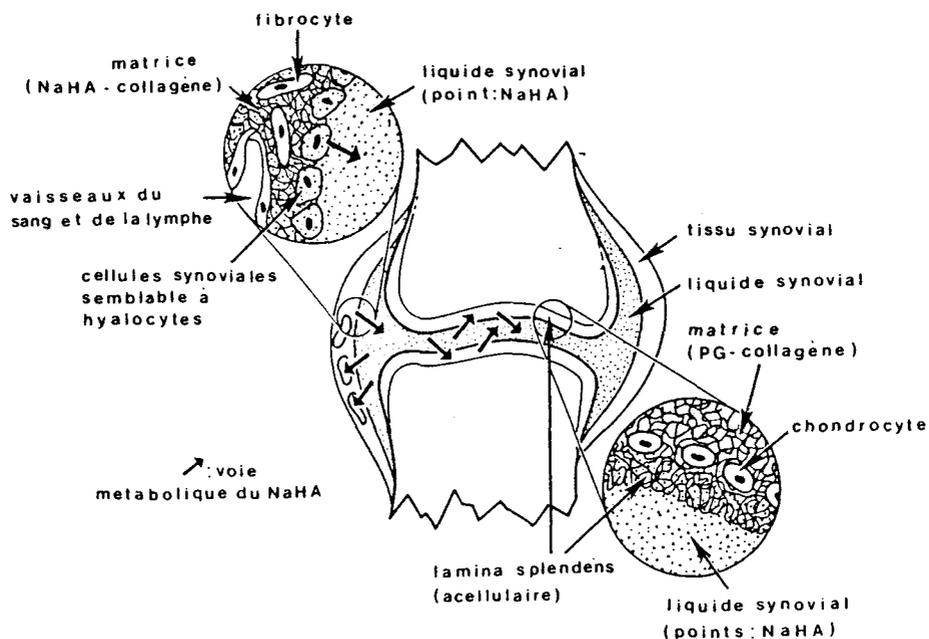
Tous ces résultats suggèrent que l'endothélium de la cornée produit tout ou une partie du NaHA présent dans l'humeur aqueuse. Cette hypothèse a été renforcée par des travaux récents (Laurent et Granath, 1982) qui ont montré que la distribution du poids moléculaire du NaHA du vitré et de l'humeur aqueuse du bétail et du lapin était différente. Dans les deux espèces, les poids moléculaires moyens (\bar{M}_w et \bar{M}_n) sont plus élevés dans l'humeur aqueuse que dans le vitré.

Il semble, d'après la littérature, que le NaHA du liquide vitré passe dans la chambre antérieure. Il a été montré que dans les yeux enucléés du bétail, la concentration en NaHA de la chambre antérieure s'accroît énormément avec le temps post-mortem (Balazs, 1965; Laurent, 1982). Quand la concentration en NaHA du liquide vitré du singe nocturne est augmentée par injection de NIF-NaHA exogène, la concentration en NaHA de la chambre antérieure augmente jusqu'à un maximum 48 heures après l'injection (Balazs, Freeman et Regnault, 1973; Denlinger et Balazs, 1980). Du NaHA radiomarqué injecté dans le liquide vitré apparaît rapidement dans l'humeur aqueuse (Hultsch, Freeman et Balazs, 1974). Quelques recherches décrites dans cette thèse ont eu pour but de mieux expliquer la relation entre le NaHA dans le vitré et l'humeur aqueuse en injectant du NIF-NaHA dans le vitré des primates et en suivant les changements de concentration en NaHA de la chambre antérieure.

C. Tissu synovial

Il est généralement supposé que le NaHA, produit par les cellules synoviales superficielles, passe non seulement dans le liquide synovial mais aussi imprègne le tissu (voir diagramme schématique au-dessous). Aucune preuve expérimentale n'a toutefois jamais été fournie. Les travaux d'Antonias, de Fraser et de Muirden (1973) ont montré que deux heures après injection de NaHA (^{14}C) dans l'articulation du genou du lapin, la radioactivité apparaît dans le tissu synovial et se maintient pendant quarante-huit heures. Elle n'est plus visible après sept jours. En supposant que cette radioactivité représente du NaHA (non dégradé), les résultats obtenus indiquent un déplacement relativement rapide des molécules de NaHA injectées.

Diagramme schématique de la voie métabolique de NaHA dans l'articulation



D. Liquide synovial

La durée de rétention et la vitesse de renouvellement ("turnover") du NaHA dans le liquide synovial n'a pas été rapportée. Après injection de NaHA (^{14}C) dans l'articulation du genou du lapin, la radioactivité a été observée quinze minutes plus tard dans les ganglions lymphatiques poplitéaux.

Trois heures après l'injection, la radioactivité a atteint son plus haut niveau dans le plasma. Après cinq heures, elle n'est qu'à 4% de son niveau le plus élevé (Antonias, Fraser et Muirden, 1973). D'après les auteurs de ces travaux, il n'est pas certain que cette radioactivité soit représentative du NaHA de haut poids moléculaire injecté.

Il n'existe aucune information sur l'origine, la progression ou la régénération du NaHA sur la surface cartilagineuse. Dans l'endo-couche la plus profonde du cartilage articulaire, le temps de progression du NaHA a été estimé à cent vingt heures, soit près de deux fois le temps nécessaire (70 h) au déplacement de ChS dans le même tissu (Handley et Phelps, 1972). L'un des objectifs des études mentionnées dans cette thèse a été de tenter d'expliquer les mouvements et la progression du NaHA injecté dans les articulations.

E. Surface du cartilage

Comme il a été décrit précédemment dans cette thèse (Section I) la surface du cartilage articulaire est un réseau de collagène acellulaire pénétré par du NaHA. La relation entre le liquide synovial et la quantité de NaHA dans cette surface, dans des conditions normales ou pathologiques, n'est pas entièrement comprise. Si la surface du cartilage est traitée avec de la hyaluronidase de sangsue avant la fixation, une épaisseur de $1 \mu\text{m}$ de la surface totale disparaît. La partie la plus profonde de cette couche superficielle (épaisseur $\sim 9 \mu\text{m}$) se réduit après un traitement à la hyaluronidase de sangsue à une épaisseur de $5 - 6 \mu\text{m}$ (Balazs et Gibbs, 1970). Des analyses microchimiques de la surface épaisse de $1 \mu\text{m}$, prélevée par succion indiquent qu'elle contenait principalement du NaHA et des protéines. La partie la plus profonde de cette couche superficielle, prélevée par grattage, a montré que la moitié de sa teneur en GAGs était composée de NaHA et que l'autre moitié était probablement du chondroïtine sulfate (Balazs, Bloom et Swann, 1966). Ces observations suggèrent que le NaHA du liquide synovial adhère ou même pénètre au moins les premiers $10 \mu\text{m}$ de la surface du cartilage. Une partie de ce NaHA de la surface est laissée par le liquide synovial qui n'a pu être enlevé même par des lavage extensifs. Des études au microscope électronique à balayage même sur des surfaces de cartilage lavées ont montré des précipités en flocons ou fibreux qui ont été interprétés comme étant des composants desséchés de

de liquide synovial (Walker, Unsworth, Dowson, Sikorski et Wright, 1970 ; Ghadially, 1978).

Cette fine couche de surface a également été décrite dans les cartilages humains (Weiss, Rosenberg, et Helfet, 1968; Mital et Millington, 1971) et dans les cartilages de lapins adultes (Davies, Barnett, Cochrane et Palfrey, 1962). Il est intéressant de voir qu'après deux semaines d'immobilisation de l'articulation du genou du lapin, cette couche avait complètement disparu (Finterbush et Friedman, 1973).

Ces résultats suggèrent que la surface acellulaire du cartilage ($\approx 10 \mu\text{m}$) a quelques liaisons directes avec le NaHA contenu dans le liquide synovial. Pour cette raison, une méthode a été mise au point et décrite dans cette thèse afin de déterminer semiquantitativement la quantité de NaHA attachée à la surface du cartilage. L'effet du NIF-NaHA exogène sur cette couche a également été étudié.

V. La fibronectine et son interaction avec les composants de la matrice

Il n'est pas dans notre intention de donner une revue complète de la littérature sur la fibronectine (FN). En guise d'introduction pour les expériences qui seront rapportées dans cette thèse, nous allons passer en revue quelques sujets spécifiques seulement, c'est-à-dire la distribution de la fibronectine dans la matrice intercellulaire du vitré et de l'articulation et son interaction avec le collagène et le NaHA.

La fibronectine est présente dans le plasma humain sous la forme d'une glycoprotéine de $4,5 \times 10^5$ dalton composée de deux sous-unités de $2,2 - 2,3 \times 10^5$ daltons. Elle forme facilement des agrégats de haut poids moléculaire, surtout aux faibles températures ($4 - 10^\circ\text{C}$). La fibronectine plasmatique est probablement produite par le foie (pour une revue, voir Pearlstein, Gold et Garcia-Pardo, 1980) bien que d'autres sources restent à envisager.

La fibronectine est aussi présente dans la matrice extracellulaire, surtout liée à des éléments structuraux tels que le collagène, la lame basale, et c'est pourquoi on peut la considérer comme appartenant à la classe des substances dénommées "glycoprotéines de structures" (Robert, Robert et Robert, 1970). Cette forme de fibronectine est produite par les cellules épithéliales, endothéliales, les cellules musculaires lisses et fibrocytes (pour une revue, voir

Labat-Robert, 1981). Sa fonction majeure dans la matrice intercellulaire dans les tissus normaux et pathologiques est en rapport avec la médiation de l'interaction entre cellules et des structures de support telles que lame basale, collagène fibrine.

La fibronectine plasmatique est aussi une opsonine: elle est capable de moduler le processus inflammatoire en enrobant les bactéries et les débris cellulaires ou d'autres particules facilitant ainsi leur phagocytose. Ainsi, la fibronectine est un facteur important dans le fonctionnement du système réticulo-endothélial (pour une revue, voir Mosher, Proctor et Grossman, 1981).

Récemment, d'autres glycoprotéines de structure ont été obtenues à partir du tissu conjonctif: la chondronectine qui médie l'interaction entre les chondrocytes et le collagène du type II dans le cartilage (Hewitt, Kleinman, Pennypacker et Martin, 1980); la laminine qui médie l'interaction entre les cellules de l'épiderme et la lame basale (collagène du type IV) (Terranova, Rohrbach et Martin, 1980). Ainsi, au niveau de la plupart des lames basales il existe deux glyco-protéines de structure: la fibronectine et la laminine, la première n'en faisant vraisemblablement pas partie intégrante.

Cette fibronectine polyfonctionnelle a été le sujet d'études intensives pour identifier les domaines de fixation des membranes cellulaires de l'héparine, du collagène, de la fibrin et des cellules bactériennes (pour revue, voir Pearlstein, Gold et Garcia-Pardo, 1980).

A. Interaction entre fibronectine et collagène

1. Collagène dénaturé

Les fibronectines plasmatique et cellulaire (FN) se lient avec la gélatine (Hooper, Adelman, Gentner et Gay, 1976; Dessau Adelman, Timpl et Martin, 1978; Engvall, Ruoslahti et Miller, 1978). Cette interaction a été utilisée pour la purification de cette molécule sur des billes recouvertes de gélatine (Sephadex, agarose) (Engvall et Ruoslahti, 1977). Les collagènes solubles de type I et type III (peau de fœtus de veau) dénaturés par la chaleur (60° dans l'acide acétique) forment des complexes avec la FN du plasma humain. L'héparine à une concentration de l'ordre de (0,2 - 100 µg/ml) augmente légèrement (20%) la quantité de précipité (Jilek et Hormann, 1979). Il a été montré que du collagène de peau de rat dénaturé par la chaleur et attaché à des grains de Séphadex retient la FN du plasma humain (Johansson et Höök, 1980). La vitesse de liaison était plus rapide en présence d'héparine. Des types génétiques de collagène dénaturés, les type I, II et III lient la FN à peu près au même degré. La liaison par les chaînes A et B des lames basales (collagène type IV) est plus faible (Kleinman, McGoodwin et Klebe, 1976).

2. Collagène natif

Le collagène natif est appelé dans la littérature: collagène soluble purifié, qu'il soit marqué à l'['¹²⁵I] ou

attaché aux grains de Séphadex. L'adjectif natif signifie que le collagène n'était pas dénaturé par la chaleur. Il a été clairement établi par plusieurs chercheurs que le collagène dénaturé par la chaleur (Types I, II et III) et que la gélatine se lient plus facilement à la FN et d'une manière plus rapide que le collagène natif (Jilek et Hörmann, 1979; Ruoslahti, Hayman et Engvall, 1979; Ruoslahti et Engvall, 1980; Johansson et Höök, 1980). L'héparine accélère la liaison et accroît la quantité attachée.

Des types variés de collagène natifs, le type III a l'activité de liaison la plus forte avec la FN. La liaison par les types I et II est 100 fois plus faible et la liaison par le type IV est 70 fois plus faible (Kleinman, McGoodwin et Klebe, 1976; Engvall, Ruoslahti et Miller, 1978). Par comparaison la liaison du fibrinogène et de la fibrine avec la FN est plus faible (1000 fois) que la liaison du collagène type III (Engvall, Ruoslahti et Miller, 1978).

3. Collagène fibrillaire

La liaison in vitro de la fibronectine au collagène fibrillaire c'est à dire aux fibres de collagène natif séparées des tissus et non-solubilisées n'a pas été étudiée. La FN absorbé au collagène dans des tissus qui ont été congelés, sectionnés et fixés, a par ailleurs été établie.

Des méthodes d'immunofluorescence avec de l'antisérum antifibronectine marqué à la fluorescéine ont été utilisées pour visualiser la FN dans les tissus. Chez l'embryon, la

FN est largement distribuée dans la matrice mésenchymateuse. Au cours du développement et de la différenciation du mésenchyme la FN devient abondante. Dans le tissu conjonctif de l'adulte les lames basales présentent la coloration la plus forte (Linder, Stenman, Lehto et Vaheri, 1978; Stenman et Vaheri, 1978; Bray, 1978). Des études récentes ont cependant montré que la FN est seulement associée aux lames basales (Martinez-Hernandez, Marsh, Clark, Macarak et Brownell, 1981; Boselli, Macarak, Clark, Brownell, et Martinez-Hernandez, 1981). Il n'y a pas d'étude détaillée de la relation entre les fibres matures de collagène dans les tissus adultes et la fibronectine. Il y a une très bonne corrélation entre la localisation microscopique de la FN et de la réticuline, mais pas entre FN, fibres de collagène et élastine (Linder, Stenman, Lehto et Vaheri, 1978). Les fibres de réticuline sont définies comme des éléments fibrillaires tenus de la matrice qui croit-on sont des filaments tenus de collagène (Nageotte et Guyon, 1930) possédant une grande affinité pour l'or colloïdal et les particules d'argent. C'est pourquoi ils ont été également appelé fibres argyrophyles. Il a été souligné que pour mettre ces fibres en évidence le tissu devait être fixé par l'acétone et des fixateurs acides, conditions dans lesquelles le NaHA précipite dans la matrice (Balazs, communication personnelle). L'affinité de la réticuline pour l'or colloïdal et l'argent est due à la réduction de ces métaux colloïdaux en particules insolubles sur des surfaces. Toutes les matrices extra-cellulaires qui ont été décrites comme riches en

réticuline contiennent des fibrilles de collagène très fines et non agrégés (diamètre 5 - 15 μm) avec du NaHA entre elles. De tels tissus sont: la matrice mésenchymateuse embryonnaire, la fine matrice du tissu conjonctif entourant les alvéoles du poumon, les cellules glandulaires et les parois capillaires, le vitré et le tissu synovial. Plus important encore, les fibres de réticuline ont été décrites dans les premières étapes des tissus en voie de cicatrisation, dans la matrice entourant les tumeurs et dans les cultures de fibroblastes sur collagène soluble dénaturé (Huzella, 1932, 1937, 1939; Huzella et Lengyel, 1932; Lengyel, 1939). Linder, Stenman, Lehto et Vaheri (1978) utilisant des sections fixées par l'acétone ont trouvé une bonne corrélation entre FN et réticuline dans la matrice conjonctive entourant les tumeurs solides et dans les tissus atteints de réactions inflammatoire chroniques.

Les fibres de réticuline du gel vitré et des tissus synoviaux de beaucoup d'espèces ont été décrites (Szent-Györgyi, 1914, 1917). La localisation de FN dans ces tissus n'a pas été reportée. C'était l'un des buts de cette thèse d'établir si de la FN libre ou liée était présente dans le vitré normal et dans l'articulation et comment elle est reliée à la teneur en NaHA.

B. Effet et absence d'effet du NaHA sur les interactions de la fibronectine

1. Interaction entre NaHA et FN

Les expériences suivantes ont été reportées dans la

littérature qui indiquaient quelques interaction entre NaHA et FN et quelques effets du NaHA sur l'interaction du FN avec d'autres macromolécules.

NaHa provoque l'agglutination de billes de plastique recouvertes de gélatine en présence de FN (Ruoslahti et Engvall, 1980)

Des billes copolymérisés de styrene et de colorant fluorescent recouvertes de gélatine (2 µm de diamètre) ne s'agrègent pas en présence de FN. L'agrégation apparaît toutefois en présence d'héparine, NaHA ou d'héparine artificiellement sur-sulfatées (17%S). Des GAGs à teneur en sulfate moins élevé étaient moins efficaces (dermatane sulfate, chondroïtine 4 et 6 S, heparane sulfate 9%S).

NaHA inhibe la précipitation du collagène natif de type I et III par l'héparine-fibronectine (Jilek et Hormann, 1979)

La FN du plasma en présence d'héparine précipite le collagène soluble natif de type I et III. Le NaHA et la putrescine inhibent cette précipitation à la même concentration (90% d'inhibition avec 4 mg/ml).

[³H]-NaHA du milieu de cultures de fibroblastes d'embryon de poulet est retenue par le réseau de FN insoluble cellulaire (Yamada, Kennedy, Kimata et Pratt, 1980)

Quand la fibronectine cellulaire est incubé avec [³H] NaHA puis filtrée, les deux sont retenus par le filtre. La liaison est totalement inhibée par addition de NaHA non marqué mais non pas d'autres GAGs.

[³H]-NaHA obtenu à partir de fibroblaste d'embryon de poulet est retenu par le résidu de filtration de fibronectine cellulaire insoluble (Latterra et Culp, 1982)

Si la fibronectine cellulaire (du poulet) est incubée avec [³H]-NaHA et ensuite filtrée, la radioactivité demeure sur le filtre. NaHA non marqué (poids moléculaire: 100 000 et 20 000) ajouté au milieu d'incubation à la concentration de 1 mg/ml diminue la rétention de la radioactivité de 65%. NaHA dégradé par l'hyaluronidase testiculaire ou l'héparine n'a pas eu d'effet.

2. Absence d'interaction entre NaHA et FN

Les expériences suivantes ont été publiées et montrent l'absence d'interaction entre NaHA et FN et l'effet de NaHA sur l'interaction de FN avec d'autres macromolécules.

NaHA n'inhibe pas l'interaction entre FN et
et l'héparine [³⁵S] (Ruoslahti et Engvall,
1980)

La FN humaine liée à de la gélatine-sepharose ou du collagène-sepharose adsorbe la [³⁵S] héparine. La présence d'héparine froide ou d'héparine sulfate prévient cette adsorption mais pas celle du dermatane-sulfate ni de NaHA.

NaHA n'a pas d'effet sur la précipitation de
FN du plasma humain causé par l'héparine
(Jilek et Hormann, 1979)

La fibronectine et l'héparine après 18 heures d'incubation à 4°C, forment un précipité. La présence de NaHA n'affecte pas la formation du sédiment de centrifugation.

NaHA n'a pas d'effet sur le précipité du
[¹²⁵I] collagène causé par FN (Jilek et
Hormann, 1979)

Quand du [¹²⁵I] collagène (type I et III dénaturé) est mélangé à FN, un précipité se développe à 4°C. Ce précipité contient ~60% de radioactivité. Du NaHA ajouté à ce mélange n'enlève ni ne réduit la radioactivité du précipité. Toutefois, au cours d'une seule expérience, le NaHA a totalement éliminé la radioactivité du précipité.

NaHA n'influence pas la liaison de FN du plasma humain avec le collagène (Johansson et Höök, 1980)

[¹²⁵I]-FN a été absorbé sur des billes de Séphadex revêtu de collagène de type I natif ou dénaturé par la chaleur. La présence de 1 μ g/ml et de 25 μ g/ml de NaHA n'a pas inhibé ni élevé la liaison de la fibronectine.

NaHA ne renforce pas la liaison entre la gélatine et la FN (Ruoslahti, Hayman et Engvall, 1979)

FN du plasma humain a été absorbée par des colonnes de gélatine-Séphadex. Ces colonnes avaient été lavées avec des solutions contenant du GAGs. Puis FN a été éluée par lavage d'abord avec de l'urée 3M puis avec de l'urée 4M. La quantité FN retenue sur chacune des 2 colonnes a été déterminée. L'héparine et le sulfate d'héparine (contenant 17% de sulfate seuls ont renforcé la liaison.

[³H]-NaHA ne se fixe pas sur la fibronectine cellulaire fixée sur colonne de gélatine Sépharose (Latterra et Culp, 1982)

La gélatine Sépharose sur laquelle la fibronectine plasmatique ou cellulaire (cellules de souris Balb/C3T³) a été absorbée, n'a pas fixé [³H]-NaHA obtenu de cultures de gliome.

[³H]-NaHA ne se fixe pas sur la fibronectine
plasmatique dans les tests de rétention sur
membrane (Latterra et Culp, 1982)

Si on incube la fibronectine plasmatique du poulet avec [³H]-NaHA et on la filtre ensuite, la fibronectine est retenue sur le filtre mais la radioactivité ne l'est pas.

C. La fibronectine dans l'articulation, le
vitre et dans l'humeur aqueuse

1. Tissu et liquide synoviaux

Le liquide synovial humain pathologique provenant de malades souffrant d'arthrites diverses contient de la fibronectine (Carsons, Mosesson et Diamond, 1981; Iammartino, Anderson, Donakowski et Schmid, 1980; Scott, Wainwright, Walton et Williamson, 1981). La concentration en fibronectine a été la plus élevée dans l'arthrite

rhumatoïde (AR) (400 - 900 $\mu\text{g/ml}$). Sa teneur était considérablement plus basse dans la goutte, l'ostéoarthrite et l'arthrite septique (74 - 400 $\mu\text{g/ml}$). Comme la concentration en fibronectine du liquide synovial de malades souffrant de AR a été plus élevée que celle du plasma correspondant (plasma 482 ± 50 $\mu\text{g/ml}$; liquide synovial 803 ± 43 $\mu\text{g/ml}$) on a suggéré une synthèse locale ou une sécrétion de la fibronectine par le tissu synovial.

La mise en évidence de la fibronectine par immunofluorescence a été effectuée sur des coupes à congélation de biopsies synoviales. Seuls les tissus pathologiques (AR) ont présenté de la fibronectine extracellulaire dans l'environnement des cellules synoviales et autour des vaisseaux sanguins. Les auteurs suggèrent que cette fibronectine dans les tissus pathologiques est produite par les cellules synoviales (Scott, Wainwright, Walton et Williamson, 1981).

2. Cartilage

Par immunofluorescence, la fibronectine n'a pas pu être démontrée dans le cartilage mature (non-embryonnaire) de poulet (Linder, Vaheeri, Ruoslahti et Wartiovaara, 1975).

La biosynthèse de la fibronectine a été étudiée au cours de la chondrogénèse dans des expériences in vivo. Dans ce modèle, une matrice osseuse déminéralisée de rat a été implantée sous la peau d'un autre rat. Après une inflammation transitoire on a observé la prolifération du tissu

conjonctif, suivie par une chondrogénèse et finalement par l'ossification. La fibronectine a été présente dans ce tissu pendant 21 jours suivant cette période. Il est intéressant d'observer que le troisième jour après l'implantation, la fibronectine a pu être observée et localisée par immunofluorescence dans la matrice extracellulaire. Le 7ème jour dans la matrice cartilagineuse en voie de différenciation, il n'y avait plus de fibronectine détectable, mais après digestion par l'hyaluronidase testiculaire on a pu détecter un peu d'immunofluorescence (Weiss et Reddi, 1980).

Selon les données de la littérature actuelle, seulement le cartilage en voie de développement ou en voie de régénération contient de la fibronectine, mais le cartilage mature ne contient pas de fibronectine extracellulaire (non liée à des membranes).

3. Humeur aqueuse et vitré.

a. Le vitré. La fibronectine n'a pu être localisée par immunofluorescence indirecte dans le vitré de l'embryon de poulet (Kurkinen, Alitalo, Vaheri, Stenman et Saxén, 1979). A toutes les étapes du développement, le corps vitré contient des fibres qui se colorent par immunofluorescence. Par contre, la lame basale entre le vitré et la rétine, et le vitré et le cristallin (la capsule postérieure du cristallin) reste positive pour la fibronectine, mais le cristallin lui-même et la rétine ne le sont pas. Il est important de souligner que les tissus

embryonnaires ont été fixés dans l'éthanol froid à 95%, déshydratés avec l'éthanol, incorporés dans la paraffine et sectionnés (Mark, Mark, Rimpl et Trelstad, 1977).

La localisation de la fibronectine dans le vitré adulte n'a pas été rapportée. Dans les études décrites dans cette thèse, la teneur en fibronectine du vitré bovin adulte et son rapport avec le réseaux des fibres collagène et avec NaHA ont été étudiés.

b. Humeur aqueuse Récemment, on a rapporté que l'humeur aqueuse bovine adulte contient 2,46 µg/ml de fibronectine. Ceci représente 0,38% des protéines trouvées dans l'humeur aqueuse. La teneur en fibronectine du plasma bovin est de 0,4% des protéines totales. Les auteurs suggèrent cependant que la fibronectine de l'humeur aqueuse provient de l'endothélium de la cornée ou d'autres tissus du voisinage (Reid, Kenney, Waring, 1982).

Nous pouvons donc conclure qu'il existe un ensemble de données convaincantes en faveur de l'absence d'interaction entre la fibronectine plasmatique (pFN) et du NaHA. D'autre part, il semble que NaHA n'interfère pas avec l'interaction collagène-fibronectine et héparine-fibronectine.

D'autre part, plusieurs auteurs ont signalé qu'il existe une interaction entre [³H]-NaHA et la fibronectine cellulaire (cFN). Si ces rapports peuvent être confirmés par des expériences plus probantes, la différence biologique entre cFN et pFN sera à nouveau confirmée. Des différences dans les séquences polypeptidiques dans les sous-unités de ces deux fibronectines ont été déjà rapportées (Yamada et Kennedy, 1979; Atherton et Hynes, 1981). D'autre part, utilisant des anticorps monoclonaux deux déterminants antigéniques distincts ont pu être identifiés sur cFN et pFN. Ces sites sont près du bout carboxy-terminal de la protéine dans la région contenant le site de fixation cellulaire (Atherton et Hynes, 1981). Latterra et Culp (1982) ont émis l'hypothèse que les différences entre l'affinité de ces deux fibronectines pour l'acide hyaluronique signifie que ces deux fibronectines sont différentes dans leur structure et leur fonctionnement.

VI. Modifications pathologiques de la matrice dans les modèles d'arthrite expérimentale

L'ostéoarthrose (maladie dégénérative des articulations) est une maladie dégénérative des articulations diarthrodiales qui peut comporter ou non des étapes inflammatoires suivies par une détérioration et abrasion du cartilage articulaire. L'ostéoarthrose peut apparaître sans preuve évidente d'un traumatisme préalable (ostéoarthrose primaire), mais elle peut aussi se surajouter à un traumatisme existant de l'articulation ou de nature inflammatoire, ou encore de nature non-inflammatoire (ostéoarthrose secondaire). Les caractéristiques de l'ostéoarthrose primaire sont l'érosion du cartilage articulaire accompagnée par des modifications biochimiques qui comprennent une augmentation de la teneur en eau, une diminution de la teneur en glycosaminoglycannes (GAG), l'agrégation des protéoglycannes (PG) altérés, la fragmentation du collagène et l'augmentation de la teneur en enzymes dégradantes. En ce qui concerne les modifications du liquide synovial, sa concentration, son indice de viscosité limite, le poids moléculaire de l'acide hyaluronique, sont plus faibles dans les liquides aspirés des articulations d'ostéoarthrose ou d'arthrite traumatique, dans la goutte, dans la chondrocalcinose et dans l'arthrite rhumatoïde (Fletcher, Jacobs et Markham, 1955; Bollet, 1956; Jebens et Monk-Jones, 1959; Seppälä, 1964; Stafford, Niedermeier, Holley et Pigman, 1964; Sundblad, 1965;

Balazs, Watson, Duff et Roseman, 1967; Balazs et Gibbs, 1970; Balazs, 1974). Par conséquent, les propriétés rhéologiques du liquide sont nettement en dessous de la normale et le liquide synovial pathologique ne possède pas les propriétés qui protègent le tissu synovial et le cartilage contre les traumatismes mécaniques. Ceci est dû à la diminution de la viscoélasticité du liquide à la suite des modifications qualitatives et quantitatives de la teneur en acide hyaluronique (Balazs et Gibbs, 1970; Balazs, 1974).

Les limitations sérieuses de cette étude quant à l'initiation de l'ostéoarthrose humaine sont dues surtout à des restrictions de nature éthique concernant des études portant sur des tissus qui doivent être prélevés d'une façon sérieuse au cours de la maladie et à son début. Se surajoutent à ces difficultés les variations de l'âge, la présence ou l'absence de traumatisme précédent ou d'autres maladies, qui rendent l'interprétation des résultats difficile. A cause de ces complications un modèle de cette maladie qui simule la pathogénèse de la maladie humaine, et qui permet d'apprécier les événements précoces au cours de la dégénérescence ostéoarthrosique, a été recherché dans notre laboratoire. Les techniques et les résultats portant sur ces modèles ont été passés en revue récemment (Moskowitz, 1972; Schwartz et Greenwald, 1979-80; Sokoloff, 1979; Gardner, 1960). Les techniques utilisées pour le modèle d'ostéoarthrose comprennent des traumatismes de nature chimique ou physique

infligés au cartilage (ce qui affecte aussi la synovie);
subluxations ou luxations de la patella et de la hanche;
compression prolongée par surcharge de l'articulation;
dislocation chirurgicale du ligament croisé ou excision
partielle des ménisques (ce qui a pour résultat une instabi-
lité sévère et d'un "déraillement" de l'articulation);
abrasion du cartilage par des corps étrangers introduits
dans l'articulation; immobilisation de l'articulation;
injection intra-articulaire d'enzymes chondrolytiques.
Les modèles animaux les plus utilisés pour la production de
ces lésions ont été le rat, le lapin, le chien ou le mouton.
La plupart de ces modèles possèdent des limitations car
ils n'imitent qu'imparfaitement la maladie humaine. De
plus, dans la plupart de ces études animales, il y a une
absence totale de données concernant les modifications qui
peuvent apparaître dans le liquide synovial. Bien qu'une
grande quantité de données aient été accumulées sur les
modifications du cartilage, de l'os, de la capsule con-
jonctive et de la membrane synoviale, le liquide synovial
a été pratiquement complètement ignoré au cours de ces
études. Ceci est probablement dû au fait que l'aspiration
du liquide synovial en quantité suffisante pour
les analyses est difficile chez la plupart de ces animaux
d'expérience. C'est pourquoi il faut être très prudent
dans l'interprétation des résultats et dans leur applica-
tion pour la compréhension de la pathologie humaine.

A. Ostéoarthrite induite chirurgicalement

1. Blessure du cartilage et instabilité de l'articulation

On admet généralement qu'une déficience partielle d'épaisseur du cartilage ne guérit pas, mais qu'une déficience totale d'épaisseur s'étendant à l'os subchondral guérit grâce au tissu provenant de la moelle épinière de l'os. (Fischer, 1923; Shands, 1931; Bennett, Bauer et Maddock, 1932; Landells, 1957; Calandruccio et Gilmer, 1962; Mankin, 1962; DePalma, McKeever et Shubin 1966; Campbell, 1969; Ghadially, Fuller et Kirkaldy-Willis, 1971; Fuller et Ghadially, 1972; Ghadially et Ghadially, 1975; Ghadially, Ghadially et Ghadially, 1977; Ghadially, Thomas, Oryschak et Lalonde, 1977). Ghadially (1981) a identifié ce tissu reconstitué, comme du cartilage hyalin, mais a souligné qu'à cause de fibrillation consécutive, la fissuration et la perte de protéoglycannes, ce cartilage hyalin peut ressembler au fibrocartilage et au tissu fibreux. Malgré une activité accrue des chondrocytes observée autour de l'aire endommagée du cartilage arthritique, et également à l'endroit de la blessure produite chirurgicalement (Meachim et Collins, 1962; Meachim, 1963; Ghadially, Fuller et Kirkaldy-Willis, 1971), leur activité synthétique est insuffisante à réparer les dommages causés (Mankin et Boyle, 1967). Les études sur les blessures faites chirurgicalement, ont porté pour la plupart sur l'examen des changements histologiques et histochimiques qui en résultent.

Un modèle d'ostéoarthrite a été développé par Bennett et Bauer en 1937, qui ont trouvé qu'un simple déplacement du patellaire était suffisant pour causer des changements étendus dans l'articulation du genou de lapin. Ce type d'instabilité est resté la base d'autres exemples développés postérieurement: le modèle Telhag pour lequel le ligament médical collatéral et les ligaments cruciformes étaient divisés puis le ménisque excisé (Telhag et Lindberg, 1972; Pond et Nuki, 1973; McDevitt, Muir et Pond, 1974; McDevitt, Gilbertson et Muir, 1977; Mayor et Moskowitz, 1974; Muir, 1978); et le modèle avec mensi-sectomie partielle développé par Moskowitz et ses collègues (Moskowitz, Davis, Sammarco, Marten, Baker, Mayor, Burstein et Frankel, 1973). Ces deux modèles reproduisent les changements histologiques progressifs de l'ostéoarthrite.

Il a été suggéré que la dégradation des protéoglycannes est un facteur important du développement de l'ostéoarthrite (Mankin, 1974). Pour les chiens et les lapins, on a trouvé une diminution des agrégats de protéoglycannes endogènes (Muir, 1977; Moskowitz, Howell, Goldberg, Muniz et Pita, 1979). Ces protéoglycannes contiennent plus de ChS mais présentent une capacité moindre à l'aggrégation que ceux originellement présent, mais cette diminution de la capacité à l'aggrégation n'a été observé que chez le chien présentant une dysplasie expérimentale de la hanche, et non après l'instabilité produite expérimentalement selon le modèle de coupe cruciforme antérieur. Les protéoglycannes restant

dans le cartilage étaient des monomères de plus petite taille avec un rapport acide uronique/protéine plus élevé (Inerot, Heinegård, Audell et Olsson, 1978; Altman, Pita et Howell, 1973), et il a été observé qu'ils étaient plus facilement extractibles avec des échantillons de cartilage ostéoarthritique de bovin et d'humain (Brandt, 1974; Brandt et Palmoski, 1976). Il a été suggéré que ceci était le résultat de la perte d'acide hyaluronique lié au monomère de protéoglycane (Inerot, Heinegård, Audell et Olsson, 1978). D'autres changements ont été observés tels que l'accroissement du rapport galactosamine/glucosamine pour le modèle de l'instabilité provoquée de l'articulation cruciforme antérieure (McDevitt, Muir et Pond, 1974) et une diminution du rapport acide uronique/protéine (Altman, Pita et Howell, 1973). Pour le modèle de la coupe du cruciforme antérieur et pour le modèle de l'instabilité de l'articulation il avait observé que le rapport acide uronique/protéine était plus élevé, que le contenu de GAG était plus bas pour les genoux opérés (Inerot et Heinegård, 1982a; Bollet et Nance, 1966) et que la teneur en eau du cartilage s'était accrue (Maroudas et Venn, 1977). L'effet du vieillissement et des conditions ostéoarthritiques sur les protéoglycannes du cartilage articulaire ont été récemment étudiées par Inerot et Heinegård (1982b).

2. L'immobilisation de l'articulation

L'intérêt dans les recherches de l'effet de l'immobilisation sur la morphologie et la fonction de l'articulation remontent à 1874, quand Reyher démontra que l'inaction causait des changements perceptibles dans le cartilage du genou du chien. En 1924, Müller observa que les changements dans les cartilages, après immobilisation, demandaient un certain temps pour apparaître, et que le mouvement limité de l'articulation était du au rétrécissement des muscles et de la capsule articulaire. Il nota également qu'il y avait une excroissance apparente du tissu conjonctif de la périphérie intérieure à la surface articulaire, et qu'elle était accompagnée par un amincissement du cartilage suivie d'une dégénérescence fibreuse et d'une nécrose. Depuis, plusieurs études ont été faites sur ce thème de l'immobilisation du cartilage. Les premières études histologiques sont dues à Ely et Mensor, 1933; Scaglietti et Casuccia, 1936; Charnley, 1948; Harrison, Schajowicz et Trueta, 1953; Crelin et Southwick, 1960, 1964; Collins et McElligott, 1960; Evans, Eggers, Butler et Blumel, 1960; Salter et Field, 1960; Trias, 1961; Hall, 1963; Thaxter, Mann et Anderson, 1965; Thompson et Bassett, 1970; Sood 1971; Enneking et Horowitz, 1972; Gritzka, Fry, Cheesman et LaVigne, 1973; Finsterbush, et Friedman, 1973; Wigren et Wik, 1974; Wigren, 1975; et Ogata, Whiteside, Lesker et Simmons, 1977.

Ces premières études ont été suivies par plusieurs autres études histochimiques et biochimiques tendant à démontrer une corrélation entre les processus biochimiques et les observations morphologiques (Brooke et Slack, 1959; Akeson, 1961, Akeson et LaViolette, 1964; Akeson, Amiel et LaViolette, 1966; Akeson, Amiel, LaViolette et Secrist, 1968; Ginsberg, Eyring et Curtiss, 1969; Akeson, Woo, Amiel, Coutts, et Daniel, 1973; Troyer, 1975; Lagenskiöld, Michelsson et Videman, 1975; Videman, Michelsson, Rauhamäki et Langenskiöld, 1976; Akeson, Amiel, Mechanic, Woo, Harwood et Hamer, 1977; Amiel, Akeson, Harwood, Schimdt et Mechanic, 1977; Engh et Chrisman, 1977, Catterson et Lowther, 1978; Dekel et Weissman, 1978, Eronen, Videman, Friman et Michelsson, 1978; Palmoski et Brandt, 1981).

La rugosité de la surface du cartilage immobilisé a été une des premières observations microscopiques (Crelin et Southwick, 1960). La nécrose du cartilage a été observée 6 jours après l'immobilisation de l'articulation (Salter et Field, 1960; Trias, 1961). Selon plusieurs auteurs (Müller, 1924; Ely et Mensor, 1933; Scaglietti et Casuccia, 1936; Evans, Eggers, Butler et Blumel, 1960), la pression causé par un poids est à l'origine des changements dégénératifs du cartilage, et si une limitation des mouvements accompagne la pression due à un poids (comme dans le genou immobilisé), cette restriction de la nutrition du cartilage le rend plus vulnérable aux changements dégénératifs. La prolifération de tissu conjonctif synovial sous-

capsulaire commence 15 jours après l'immobilisation entre les condyles du tibia et les condyles fémoraux et sous la patella. Des adhérences apparaissent entre les surfaces non opposées et les condyles fémoraux, et autour des ligaments cruciaux et les surfaces non articulées dans la région entre les condyles. D'autres modifications du cartilage sont la perte de cellules dans la zone superficielle et l'amincissement du cartilage. En général, ces changements sont similaires à ceux observés par Enneking et Horowitz (1972) sur les genoux humains immobilisés, surtout en ce qui concerne la prolifération de tissu conjonctif, l'accroissement de l'adhésion et le développement de la nécrose de pression du cartilage. Chez les jeunes rats (Hall 1963) et les lapins adultes (Engh et Chrisman 1977) aucune nécrose du cartilage n'a été trouvée aux points d'opposition mais seulement dans les régions ne supportant aucun poids. Ceci ressemble plus à la séquence de changements qui surviennent dans l'ostéoarthrose humaine, dans lesquels des lésions du cartilage sont généralement observées d'abord dans les régions ne supportant aucun poids (Harrison, Schajowicz et Trueta, 1953).

Thaxter, Mann et Anderson (1965) ont procédé à une étude autoradiographique ^{35}S et histologique sur des rats adultes afin d'examiner l'effet provoqué par les poids sur le processus dégénératif des articulations immobilisées. Leur conclusion les ont amené à émettre l'hypothèse selon laquelle la pression d'un poids ne serait pas une déterminante majeure de la dégénérescence

du cartilage. Toutefois, une pression statique permanente s'exerçant sur des surfaces limitées de cartilage constamment apposées, aboutissent à la mort des chondrocytes et à la dégénérescence de la matrice. Ces auteurs ont également montré que pour des périodes d'immobilisation allant jusqu'à 90 jours, l'adhésion joue un rôle mineur dans la dégénérescence. Ils ont montré d'autre part que les surfaces de cartilage périphérique non ajustées ne sont pas touchées. Ils ont également souligné que malgré de légères ressemblances existant entre le processus dégénératif du genou du rat immobilisé et l'ostéoarthrose humaine, ces deux images pathologiques ne sont pas similaires. Les études précédentes de Collins et McElligot (1960) vont dans le même sens puisqu'elles ont démontré que la fibrillation, la dissolution de la matrice et l'activité accrue des chondrocytes sont les caractéristiques majeures de la dégénérescence ostéoarthrosique. Ce postulat diffère considérablement des conclusions de la plupart des recherches ayant eu pour objet les articulations immobilisées des animaux.

Des études plus récentes ont porté sur des animaux de taille plus importante que les rats (lapins, moutons, chiens). Deux groupes de chercheurs (Gritzka, Fry, Cheesman et LaVigne, 1973; Ogata, Whiteside, Lesker et Simmons, 1977) ont étudié l'effet de la compression sur les articulations partiellement mobiles de lapins pendant

des périodes de un à 32 jours. Une de leurs conclusions était que pour l'importance des dommages causés au cartilage, la durée de l'immobilisation était plus déterminante que l'amplitude de la pression. Des études électromicroscopiques par Finterbusch et Friedman (1973) sur des articulations immobilisées de jeunes lapins (non-compressées) ont démontré que le premier symptôme apparaissant dans les deux premières semaines est la disparition de la couche superficielle amorphe du cartilage. Cette couche, décrite pour la première fois par Balazs, Bloom et Swann (1966) contient une grande quantité de NaHA. Sa disparition précoce lors de l'immobilisation a une grande importance pour les études présentées dans cette thèse. Des changements plus tardifs observés par ces auteurs, sont la dégénérescence des couches profondes, et finalement leur destruction puis les signes de réparation 6 à 8 semaines plus tard. On a observé dans les tissus synovial et périarticulaire, une hyperémie, une prolifération capillaire et le développement d'une circulation collatérale autour de l'articulation. Ces modifications sont similaires à celles observées par Cuthbertson, Siris et Gillfillan (1965). Après quatre semaines d'immobilisation, les cellules synoviales de type B prédominaient, indiquant un changement dans le tissu synovial similaire à celui résultant d'une arthrite traumatique. (Ghadially et Roy, 1969).

Des études histochimiques sur le cartilage des articulations humaines ostéoarthritiques (Collins et Mc-Elliott, 1960; Meachim, Ghadially et Collins, 1965) et sur une maladie dégénérative de l'articulation induite expérimentalement (Thompson et Bassett, 1970) ont montré que l'une des premières manifestations de la pathologie était la perte de la coloration métachromasique. Il est intéressant de noter que la même manifestation apparaît après l'immobilisation de l'articulation du lapin. Troyer (1975) a observé qu'avant tout changement histologique observé dans les cellules du cartilage, la coloration métachromasique de la matrice diminuait. Deux jours après l'immobilisation la coloration était significativement plus faible que la normale et 6 jours après elle avait pratiquement complètement disparu. Cette technique de coloration, bien que très sensible à la présence de glycosaminoglycannes ne permet pas d'apprécier la quantité de ces polyacides dans la matrice quand elle est utilisée sur des coupes fixées et incluses dans la paraffine, (Poole, 1970; Troyer, 1974).

Les études portant sur les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse du cartilage à l'immobilisation (Akeson et LaViolette, 1964; Akeson, Amiel et LaViolette 1966, 1967; Akeson, Amiel, LaViolette et Secrist, 1968) ont montré que 10 à 12 semaines d'immobilisation ont pour résultat une concentration réduite en acide hyaluronique et en chondroïtine-sulfate dans le tissu conjonctif periarti-

culaire du genou immobilisé. Il n'y avait pas de changement apparent dans la teneur en dermatane-sulfate. Les études portant sur le collagène soluble et total (Brooke et Slack, 1959; Akesson, Amiel, LaViolette et Secrist, 1968) n'ont pas révélé de modification significative. Ginsberg, Eyring et Curtiss (1969) ont étudié la teneur en hexosamines du cartilage articulaire du lapin immobilisé et comprimé. Dans le genou immobilisé, les modifications cellulaires ont été minimales et il n'y avait pas de modification significative dans la teneur en hexosamines par unité de poids sec du cartilage en 6 semaines. Wigren et Wik (1974) ont trouvé une désintégration du cartilage après 4 semaines d'immobilisation chez le lapin affectant sérieusement les surfaces de contact et aussi les surfaces qui ne sont pas en contact. Ceci est en faveur de la suggestion que le cartilage articulaire dépend pour sa nutrition des mouvements de pompage de l'articulation (Ekholm, 1951; Gritzka, Fry, Cheesman et LaVigne, 1973). Videman, Michelsson, Rauhamäki et Langenkiöld (1976) ont trouvé une incorporation élevée de sulfate dans l'os, dans le cartilage et dans le ligament du genou du lapin déjà 4 jours après l'immobilisation.

Caterson et Lowther (1978) ont trouvé une augmentation de la teneur en hexosamine et d'acide hexuronique du cartilage

d'une articulation supportant une charge et une diminution correspondante dans les articulations non-porteuses de charge quand on les compare avec des pattes postérieures de contrôle. Ils ont admis que les modifications concernent surtout la teneur en chondroïtine-sulfate. La teneur en hydroxyproline n'a pas été affectée d'une façon significative dans aucune des expériences rapportées. Ils ont utilisé de l'acétate radioactif et son incorporation a été étudiée au cours de la biosynthèse des protéoglycannes. Ils ont observé une augmentation de l'incorporation dans l'articulation porteuse de poids et une diminution de l'incorporation dans l'articulation qui ne l'est pas. Le poids moléculaire des protéoglycannes isolés de l'articulation non-chargée est environ la moitié de celui trouvé dans l'autre groupe. Eronen, Videman, Friman et Michelsson (1978) ont immobilisé des genoux de lapin en extension pour des périodes de 2 à 30 jours. Ils ont trouvé une augmentation de l'activité du ^{35}S dans tous les sites du cartilage du genou immobilisé, ce qui indique une augmentation de la vitesse de synthèse des GAG sulfatés.

Dekel et Weissman (1978) ont étudié l'effet d'une friction simultanée avec un stress de charge en comparaison avec un contrôle qui n'a reçu que la friction en tant que stress. Il y avait traumatisme au niveau de la couche superficielle du cartilage dans le groupe expérimental et après 2 heures d'exercice le groupe expérimental a synthétisé 5 fois plus de prostaglandine E dans le liquide synovial. Quand la

durée de l'expérimentation a été portée à 15 jours, on a constaté une dégénérescence cellulaire et une fibrillation du cartilage articulaire, épaissement de l'os subchondral, tout ceci en accord avec le développement de l'ostéoarthrose. Palmoski et Brandt (1981) ont trouvé une augmentation de la teneur en eau et une diminution de l'épaisseur, de la coloration avec la Safranine-O, de la teneur en acide uronique et de la synthèse nette de prostaglandines dans le genou de chien immobilisé pendant six semaines. Ils ont également trouvé une anomalie apparente dans la région de la partie protéique des protéoglycannes fixant l'acide hyaluronique qui provoque une absence d'agrégation in vitro des protéoglycannes du cartilage du membre immobilisé. Ils n'ont cependant pas constaté de modifications morphologiques similaires à celles décrites dans l'ostéoarthrose.

L'immobilisation (pendant plus de 8 semaines) de l'articulation du lapin, du chien et du mouton provoque des changements dans les tissus mous périarticulaires, les tissus intra-articulaires et les cartilages articulaires, changements qu'Akeson et ses collègues ont appelé de façon appropriée "vieillissement accéléré" (Akeson, Amiel, LaViolette et Secrist, 1968). Ce processus est caractérisé par une perte d'eau de ces tissus (4 à 5% pour les tissus mous et 6 à 7% pour le cartilage) et par un épuisement général en GAGs (Wigren, Wik et Falk, 1975). En se basant sur le

poids de tissu dégraissé, sec et humide, le contenu en NaHA, ChS et dermatane sulfate pour les articulations immobilisées des genoux de lapins et de chiens étaient plus bas que pour ceux des témoins.

Après 10 à 12 semaines d'immobilisation, le contenu en NaHA, ChS et dermatane sulfate des tendons patellaires, du quadriceps, de la capsule postérieure, des ligaments cruciformes et collatéraux, était significativement plus bas que la normale. La membrane synoviale et la capsule antérieure présentaient seulement une diminution significative de la teneur en NaHA (Akeson, Amiel, LaViolette et Secrist, 1968; Akeson, Amiel et LaViolette, 1967. Akeson, Woo, Amiel, Coutts et Daniel, 1973).

La $[\eta]$ du NaHA extrait du tissu conjonctif périarticulaire a été évaluée dans les articulations du chien après immobilisation (Akeson, Amiel, LaViolette et Secrist, 1968). Aucune différence significative de la $[\eta]$ entre les articulations immobilisées et les articulations témoins n'a été observée. Les recherches décrites dans cette thèse, ont été centrées sur l'étude des premiers changements (1 semaine) survenant après l'immobilisation, ce domaine n'ayant pas encore été étudié. Il était également important de savoir comment le liquide synovial et la teneur en NaHA évoluait pendant cette période initiale d'immobilisation et comment la teneur en GAGs du cartilage en était affecté.

B. Exemples d'arthrite induits immunologiquement et chimiquement

1. Exemples d'arthrites induites par des antigènes

Plusieurs méthodes ont été suggérées pour provoquer des arthrites rhumatoïdes chez les animaux. Comme il était évident que les mécanismes immunologiques jouent un rôle important dans ces méthodes (Hollander, McCarty, Astorga et Castro-Murillo, 1965; Rawson et Torralba, 1967; Loewi, 1968; Hollander, 1969), il était raisonnable de s'attendre à ce qu'une réaction similaire puisse être reproduite en induisant une réaction immunitaire dans l'articulation (Friedberger, 1913; Bruschiwig et Henry, 1933; Odell et Key, 1956). Il est important de noter que toutes les réactions immunologiques n'imitent pas les modifications des composants de l'articulation tels que ceux observés dans l'arthrite rhumatoïde (RA). Par exemple, la polyarthrite du rat (Bürstein et Waksman, 1964; Pearson et Wood, 1964; Putnam, Lubaroff et Waksman, 1969), est l'un des modèles les plus utilisés pour tester les médicaments pouvant être utilisables dans le RA. Dans ce modèle, l'infiltrat inflammatoire est riche en cellules à proliférations rapides (Jasin, Cooke, Hurd, Smiley et Ziff, 1973). Dans le RA toutefois, l'un des traits caractéristiques est la synthèse de forte quantité d'immunoglobulines par un grand nombre de cellules lymphoïdes (Smiley, Sachs et Ziff, 1968; Sliwinsky et Zvaifler, 1970). Ceci n'est pas le cas dans la polyarthrite du rat. De même pour ce modèle les

conditions inflammatoire ne sont pas chroniques comme pour la synovite rhumatoïde.

Un autre modèle immunologique a été introduit par Dumonde et Glynn en 1962. Ce modèle a probablement le plus de caractéristiques en commun avec la maladie actuelle de RA:

- 1) elle est produite immunologiquement
- 2) elle possède une synovite caractérisée par l'infiltration de lymphocytes et de plasmocytes
- 3) une seule injection d'antigène provoque le même type d'inflammation chronique que celui observé dans le RA (Glynn, 1968, 1969; Connsden, Doble, Glynn and Nind, 1971).

Pour le modèle original Dumonde et Glynn avaient utilisé de la fibrine dans de l'adjuvant complet de Freund comme antigène pour immuniser les lapins. Trois semaines plus tard l'antigène a été injecté intra-articulairement pour provoquer le développement d'une synovite chronique. Plus tard d'autres antigènes ont été utilisés tels que la sérum albumine bovine, la sérum albumine humaine, les gamma globulines, et l'ovalbumine (Pearson, 1964; Glynn, 1969; Jasin et Ziff, 1969; Connsden, Doble, Glynn et Nind, 1971; Steinberg, McCrae, Cohen et Schumacher, 1973; Lowther, Sandy, Santer et Brown, 1978).

Le modèle utilisé dans cette thèse a été produit en utilisant de l'ovalbumine et la dose déclenchante choisie a été

d'une façon telle qu'elle pouvait produire une arthrite chronique pendant au moins 8 semaines après l'injection intra-articulaire (Consdén, Doble, Glynn et Nind, 1971). Les modifications apparaissant dans le tissu synovial et dans le cartilage articulaire dans l'arthrite induite par l'antigène ont été bien étudiées (Dumonde et Glynn, 1962; Janis et Hamerman, 1969; Consdén, Doble, Glynn et Nind, 1971; Cooke, Hurd, Ziff et Jasin, 1972; Jasin, Cooke, Hurd, Smiley et Ziff, 1973; Steinberg, McCrae, Cohen et Schumacher, 1973; Poole et Coombs, 1977; Poole, Oldham et Coombs, 1978; Lowther, Sandy, Santer et Brown, 1978). Les premiers changements (dans les heures suivant immédiatement l'injection intra-articulaire) sont l'hémorragie des vaisseaux sanguins du tissu synovial et une accumulation d'un exsudat synovial visqueux. Le développement d'une vasculite sévère n'est que rarement constaté car généralement la maladie n'était pas étudiée avant que les symptômes soient bien apparents. Ce type de réaction est caractéristique des réactions du type Arthus, dans lesquelles les anticorps précipitants doivent se combiner nécessairement avec l'antigène en présence de complément. Ce complexe est alors concentré dans la paroi des vaisseaux; l'ingestion de ce matériel par un nombre croissant de leucocytes polymorphonucléaires les obligent à libérer leurs enzymes lysosomiales provoquant des lésions des tissus adjacents (Levenson et Cochrane, 1964). Des substances de cette nature ont été observées au microscope électronique

dans le modèle à l'ovalbumine (Steinberg, McCrae, Cohen et Schumacher, 1973). On peut constater pendant cette phase aigue une prolifération des cellules synoviales (surtout de type "B") suivie de la nécrose de la membrane synoviale. On trouve aussi un nombre élevé de leucocytes polymorphonucléaires.

Cette inflammation aigue laisse la place après environ une semaine à une inflammation chronique. Après environ un mois la synovie s'épaissit et se décolore. Des lymphocytes et quelques macrophages remplacent les leucocytes polymorphonucléaires observé dans la phase aigue. Du tissu fibreux et un pannus commencent à s'accumuler. La détérioration du cartilage articulaire qui n'est pas observée pendant les premières étapes, devient de plus en plus importante.

Les modifications biochimiques apparaissant dans ce modèle n'ont pas été étudiés d'une façon approfondie. Lowther, Sandy, Santer et Brown (1978) en utilisant un modèle similaire d'arthrite induite par un antigène (sérum albumine humaine) n'ont pas trouvé de changement significatif dans la teneur en collagène mais une diminution marquée des proteoglycannes (PG) du cartilage pendant une période expérimentale de 57 jours. La perte des protéoglycannes a été corrélée positivement avec la durée de l'inflammation. Les cartilages des articulations avec une inflammation soit aigue soit chronique ont présenté une inhibition marquée de l'activité biosynthétique des PG. La perte de PG est

due principalement à l'action des enzymes proteolytiques libérés par les cellules inflammatoires (Wood, Pryce-Jones, White, et Nuki 1971; Muirden, 1972). Il a également été suggéré que la perte de PG est un résultat de l'inhibition de la biosynthèse de PG (Lowther, Sandy Santer et Brown, 1978). Cette diminution des PG a également été observée dans l'arthrite induite par la carrageenine où il y avait aussi une augmentation des leucocytes polymorphonucléaires dans le liquide synovial (Gillard et Lowther, 1976).

Les agents responsables de l'inhibition de la biosynthèse du PG ne sont pas connus mais l'acide hyaluronique (Handley et Lowther, 1976), les dérivée oligosaccharidiques (Wiebkin, Hardingham et Muir, 1975), la prostaglandine A_1 , ou les lymphokines, (Eisenbath, Benttel et Liebovitz, 1974; Herman, Nozoe et Nutman, 1977) en font partie. Pour les recherches rapportées dans cette thèse portant sur la production de l'arthrite, nous avons utilisé le modèle de l'ovalbumine afin d'étudier les effets sur le NaHA endogène et exogène.

2. Arthrite induite par les lectines

La concanavoline A (CON A) et d'autres lectines (Lens culinaris lectin(LcL), l'agglutinine du germe de blé (WGA), la lectine de pisum satium (Psl)) peuvent induire une inflammation quand elles sont injectées dans des tissus conjonctifs différents (Kind et Petersen, 1968;

Shier, Trotter et Reading, 1974; Waldmann, Thoss, Raabe et Müller, 1975; Hay, 1973; Hall et Pribnow, 1977; Waldmann, Henzgen et Thoss, 1978). Une telle inflammation a été observée et quantifiée sur le coussinet de la patte du rat (Shier, Trotter et Reading, 1974). La CON A (10 - 100 µg) produit un oedème plus intense et plus durable que la WGA ou la PsL. Il a été reporté, qu'une seule injection intra-articulaire de CON A, de WGA, ou de PsL dans le genou du lapin produit une inflammation aigue suivie d'une phase chronique qui peut s'étendre sur 6 mois (Thoss, Raabe, et Müller, 1976; Waldmann, Henzgen et Thoss, 1978). La phase aigue qui peut durer de 6 heures à 7 jours pour l'arthrite du lapin produite par la CON A ou par le LcL était caractérisée par une synovite qui débute par une inflammation riche in leucocytes (réaction qui n'est pas de type Arthus), et à peu près trois jours plus tard les lymphocytes et les plasmocytes apparaissent. Les lectines marquées à la fluorescéine étaient captées par les cellules du tissu synovial (Thoss, Raabe et Müller, 1976).

Comme pour l'inflammation du coussinet de la patte du rat, la CON A, la WGA et la PsL provoquaient chacune dans l'arthrite du lapin une réaction différente d'intensité. Un examen histologique qualitatif a montré que l'agent inducteur de l'arthrite le plus efficace était la CON A suivie de la PsL puis de la LcL, alors que la WGA n'avait qu'un très léger effet (Waldmann, Henzgen et Thoss, 1978).

Comme les lectines se lient spécifiquement à certains résidus osidiques des glucides complexes (pour un compte rendu voir Nicholson, 1974), la liaison peut éventuellement être inhibée par un simple sucre spécifique pour une lectine particulière. Dans les recherches relatées dans cette thèse, nous avons étudié l'effet de la CON A sur la teneur en NaHA de l'articulation du genou du lapin. Cet effet a été comparé avec celui produit par la WGA, l'agglutinine de soja (SBA) et le méthylmannopyranoside a été utilisé en tant qu'inhibiteur de l'effet de la CON A.

VII. Effet thérapeutique de l'acide hyaluronique injecté dans l'articulation et dans l'oeil

A. Effet sur l'arthrite

1. Modèle animal de l'arthrite

Il a été suggéré depuis plusieurs années que l'acide hyaluronique injecté dans l'articulation arthritique peut améliorer l'état du cartilage pathologique. Cette suggestion a été basée sur des expériences au cours desquelles l'acide hyaluronique stérile en solution, préparé à partir du liquide synovial de boeuf, a été introduit entre les bouts fracturés du fémur de rat. L'acide hyaluronique a inhibé la formation du callus et accéléré la formation d'une pseudo-articulation en provoquant le développement d'un cartilage à surface lisse (Balazs, 1942). Il a été trouvé également que des plaies de la surface du cartilage articulaire, chez les chiens, cicatrisent mieux quand cette même préparation d'acide hyaluronique a été appliquée sur la surface traumatisée (Balazs et Piller, 1943). Ceci a été confirmé ultérieurement par Curri et ses collaborateurs (Curri et Maschio, 1959; Curri et Campailla, 1966). Ces mêmes auteurs (1967) ont décrit l'utilisation d'acide hyaluronique en solution (3 - 5 mg par injection répétée, viscosité 4 - 8 fois supérieure à l'eau) en injection intra-articulaire chez le chien, et le lapin après induction d'arthrite avec le formaldéhyde. Ce type d'arthrite produit un traumatisme très

sévère du cartilage articulaire avec une très faible tendance à la régénération. Les auteurs ont rapporté que le traitement répété à l'acide hyaluronique a accéléré la régénération du cartilage, a diminué la réaction inflammatoire dans l'articulation et a empêché la formation d'un pannus important. L'acide hyaluronique NIF-NaHA a été utilisé pour la première fois chez le chien et le singe nocturne après l'abrasion du cartilage articulaire. Les articulations traitées avec le NIF-NaHA étaient moins douloureuses, moins enflammées et la plaie du cartilage a guéri en moins de 6 semaines, tandis que chez les témoins l'articulation est restée enflammée, douloureuse et a présenté des érosions au niveau du cartilage même après ce délai (Rydell et Balazs, 1971; Rydell, 1970; Rydell, Balazs et Freeman, 1971). Ces mêmes auteurs ont rapporté que le NIF-NaHA injecté par voie sous-cutanée, sous-conjonctivale et dans l'espace péri-tendineux ou autour de corps étrangers implantés a diminué la formation du granulome, du tissu fibreux et les adhésions. Des incisions multiples de la surface supportant le poids du cartilage articulaire du genou du lapin ont montré moins d'effusion et de gonflement et une moindre formation de pannus et ont présenté une meilleure guérison de la plaie du cartilage après traitement au NIF-NaHA que les contrôles (Bland, 1972). Dans les articulations du genou du lapin l'injection NIF-NaHA a protégé le cartilage d'une perte d'eau pendant 8 semaines d'immobilisation. NIF-NaHA injecté a protégé aussi le

cartilage de l'articulation immobilisée de modifications observables par des méthodes histologiques ou par microscopie électronique (Wigren, Wik et Falk, 1975, 1976).

L'instabilité peut être produite dans l'articulation du genou du chien par section du ligament antérieur cruciforme (Telhag et Lindberg, 1972; Pond et Nuki, 1973). Après la chirurgie, on a injecté dans certaines de ces articulations du NIF-NaHA (2 ml, 10 mg/ml); certaines autres ont été injectées avec le tampon (SPT) seul au 5ème, 15ème et 21ème jour après la chirurgie. Les chiens traités avec le NIF-NaHA ont moins boité et ont guéri cliniquement d'une façon plus rapide. Sept mois après le traumatisme, l'évaluation histologique et biochimique des protéoglycannes du cartilage a montré une diminution considérable des modifications pathologiques par rapport aux contrôles non traités (Lindblad, Ollson, Schrantz, Heinegård, Inerot et Reiland, 1982).

2. Arthrite traumatique du cheval

Dans l'arthrite traumatique des chevaux, l'injection intra-articulaire de NIF-NaHA a amélioré le fonctionnement de l'articulation et a éliminé la douleur (Rydell, Butler et Balazs, 1970; Åsheim et Lindblad, 1976; Swanstrom, 1978; Rose, 1979; Phillips, 1980; Irwin, 1980; Langlois, 1981). Il a été montré que dans les conditions arthritiques quand la taille moléculaire de l'acide hyaluronique dans l'articulation est inférieure à la normale, la taille

moléculaire retourne vers sa valeur normale après l'injection de NIF-NaHA. Ceci apparaît seulement dans les cas qui montrent une amélioration clinique, comme cela a été noté par Balazs, Briller et Denlinger (1981).

3. Ostéoarthrose humaine

Encouragés par l'effet bénéfique de NIF-NaHA injecté dans les articulations du cheval souffrant d'ostéoarthrose traumatique, plusieurs chercheurs ont engagé des études humaines (Rydell, 1972; Helfet, 1974; Peyron et Balazs, 1974; Weiss, Balazs, St. Onge et Denlinger 1981). Une ou deux injections intra-articulaires de NIF-NaHA ont diminué la douleur, la rigidité et en général a amélioré le fonctionnement de l'articulation. Dans ces études, environ 200 articulations du genou ont été étudiées sans que l'on puisse constater d'effet nuisible. Bien qu'on ai pu constater un effet placebo élevé et malgré l'effet apparemment bénéfique d'injections de SPT ou du solvant utilisé pour la préparation de NIF-NaHA, une ou deux injections de NIF-NaHA ont considérablement amélioré le fonctionnement de l'articulation pendant 3 - 6 mois. L'évaluation en double aveugle du fonctionnement de l'articulation chez les patients a clairement montré une différence significative en faveur des articulations traitées par NIF-NaHA par rapport aux articulations traitées avec le placebo ou par le SPT pendant une période de trois mois. Dans quelques cas avec présence d'effusion précédant ou 1 ou 2 semaines après l'injection de NIF-NaHA,

la taille moléculaire de l'acide hyaluronique dans le liquide synovial a été analysée; on a trouvé qu'elle était en-dessous de la valeur normale observée avant le traitement. Après le traitement avec le NIF-NaHA, la taille moléculaire a augmenté et a atteint des valeurs normales ou presque normales (Peyron et Balazs, 1974). Il faut insister sur le fait que le NIF-NaHA injecté a amélioré la fonction de l'articulation seulement dans les cas où l'arthrose a été dans sa phase aiguë avec une douleur forte et persistante.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux expérimentaux.

A. Singes nocturnes (Aotus trivirgatus).

Nous avons utilisé pour cette expérience, des animaux adultes, mâles et femelles de 700 à 1 000 g. Nous les avons gardés pendant plusieurs années, séparés ou par couples (mâle/femelle), dans notre animalerie. Nous les avons nourris avec de la nourriture pour singe (Purina 25, haute teneur en protéine, Ralston Purina Co., St. Louis, MO) additionnée de fruits frais (orange, pomme ou banane) et d'eau ad libitum.

B. Macaque rhésus (Macaca mulatta).

Seule des femelles adultes ont été utilisées pour cette expérience: leur âge moyen était de 12 ans et elles pesaient de 6 à 8 kg. Ces femelles avaient subi une ovariectomie bi-latérale, ou bien avaient été immunisées contre l'estrogène, 10 ans auparavant. Elles avaient séjourné dans notre animalerie plusieurs mois avant d'être utilisées pour cette étude et nourries de la même façon que les singes nocturnes.

C. Lapins.

Nous avons utilisé des lapins blancs adultes, mâles et femelles de 3 à 5,2 kg de Nouvelle Zélande. Nous les avons nourris avec de la nourriture pour lapin

(Ralston Purina Co., St. Louis, MO) et de l'eau ad libitum. Nous les avons gardé séparément dans notre animalerie.

D. Chevaux.

Nous avons utilisé 5 chevaux (3 mâles castrés, 2 femelles) (voir tableau ci-dessous). Tous ces animaux étaient normaux, en bonne santé, et leurs articulations ne présentaient aucune particularité pathologique. Ils ont été gardés dans leurs boxes pendant toute la durée de l'expérience.

Nom du cheval	Race	Sexe	Age (ans)	Poids (kg)
Gay Commander	Pur sang	C	5	390
Apples	Appaloosa	F	10	340
Dusty	Buckskin	C	7	360
Binding Agent	Pur sang	C	7	430
Truly Yours	Pur sang	F	11	390

E. Bétail.

Les yeux ont été prélevés immédiatement après l'abattage et gardés à +5°C jusqu'à leur utilisation. Du cartilage articulaire des metacarpes de veau (2 - 4 mois) et de boeuf ont été prélevés.

II. Produits chimiques et réactifs.

A. NaHA.

1. NaHA non inflammatoire (NIF-HaHA).

Nous avons obtenu de Pharmacia AB, Uppsala, Suede (Healon^R), et de Biomatrix, New York, N.Y. de l'hyaluronate de sodium stérile, apyrogène, hautement purifié et non inflammatoire, extrait de crêtes de coqs d'après Balazs (1979). Le NIF-NaHA a été dissous dans une solution physiologique tamponnée (SPT), sans conservateur et contenant (pour un litre d'eau bidistillée à pyrogène), 8 mg de NaCl, 0,04 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 0,28 MG de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La concentration du NaHA de la solution utilisée était de $10,0 \pm 0,2$ mg/ml. Le pH de cette solution de NIF-NaHA à 1% était de $7,2 \pm 0,2$ mg/ml, et l'osmolarité de 258 mOs.

a. Pureté. La pureté du NIF-NaHA utilisé dans cette expérience a été évaluée selon les critères décrits dans le tableau ci-dessous, qui présente les variations de la pureté des lots de NIF-NaHA.

La préparation de NIF-NaHA a été aussi analysé pour mettre en évidence la présence possible de sucres neutres (arabinose, fucose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, ribose et xylose). La concentration de ces sucres doit être inférieur à 0,02% de l'hyaluronate de sodium (Longas et Meyer, 1981).

Paramètre étudié	Résultat	Unité; méthode; définition
Teneur en amino acide	0.04-0.05	% de la teneur en NaHA.
Teneur en galactosamine	0.25-0.39	% de la teneur totale en hexosamine.
Absorption à 257 nm	0.500-0.970	Cuvette de 1 cm, solution de NaHA à 1%.
Absorption à 400 nm	0.008-0.013	Cuvette de 1 cm, solution de NaHA à 1%.
Rotation optique spécifique à 436 nm	-159.00 à -166.00	Temperature : 25°C.
Fer	< 2	ppm
Cuivre	< 2	ppm
Viscosité limitante	2800-4080	cc/g; temp. 25°C vitesse de cisaillement moyenne : 1100 sec ⁻¹ ; solvant 0.15N NaCl.
Pyrogenésité	exempt de pyrogène	lysate de limulus et test de la temperature du lapin.
Stérilité	ne contient pas de micro-organismes vivants ni de spores.	Selon les méthodes de références de la Pharmacopie des U.S.A.

(1) L'absorption élevée à 257 nm est due aux acides nucléiques. La teneur en cette impureté varie de 0,1% à 0,3% de la teneur en NaHA.

b. Immunogénicité. L'immunogénicité du NIF-NaHA a été testé chez les lapins et chez les humains par des tests cutanés passifs anaphylactiques (Richter, 1974, Richter, Ryde et Zetterström, 1979). Ces études ont prouvé qu'aucune immunogénicité n'a pu être mise en évidence avec ces préparations hautement purifiées.



De même, les tests de longue durée répétés sur l'oeil du singe nocturne et du macaque rhésus n'ont pas permis de déceler une immunogénicité quelconque avec ces préparations (Denlinger et Balazs, 1980; Denlinger, El-Mofty et Balazs, 1980).

c. Impuretés causes d'inflammation.

Tous les lots de NIF-NaHA utilisés au cours de ce travail ont été testés pour détecter la présence d'impuretés susceptibles de provoquer une réaction inflammatoire dans l'oeil, l'articulation, ou la cavité péritonale. Ce test réalisé sur l'oeil du singe nocturne a été décrit par Denlinger et Balazs (1980) et par Denlinger, El-Mofty et Balazs (1980). Les critères qui déterminent l'absence d'impuretés, causes d'inflammation, sont les suivants. Un ml de liquide vitré est remplacé par le même volume de solution de NaHA à 1%. Quarante-huit heures plus tard, la réaction inflammatoire de l'humeur aqueuse est évaluée semi-quantitativement par une lampe à fente et par un examen ophtalmoscopique, et quantitativement en dénombrant les leucocytes sur un échantillon d'humeur aqueuse. L'humeur aqueuse normale ne contient pas de cellules. La substitution du liquide vitré par une substance à tester peut créer un trauma chirurgical qui peut augmenter le nombre de leucocytes dans l'humeur aqueuse jusqu'à 200 cellules par mm^3 . C'est pourquoi le NIF-NaHA non inflammatoire a été défini comme une préparation de moïds moléculaire élevé ($[\eta]_0 > 1500 \text{ cc/g}$; stérile; apyrogène qui à une concentration de 10 mg/ml dans une solution

physiologique tamponnée, ne provoque pas l'apparition de plus de 200 cellules par mm^3 dans l'humeur aqueuse dans le test sur l'oeil du singe.

Les lots de NIF-NaHA utilisés dans cette étude provoquaient une réaction cellulaire comprise entre 0 - 135 cellules par mm^3 d'humeur aqueuse.

d. Solutions de concentrations supérieures à 1%. Ces solutions ont été préparées à partir des solutions de NIF-NaHA décrites ci-dessus, en précipitant dans des conditions stériles le NaHA de la solution à 1% avec de l'éthanol stérile. Le précipité a été lavé à plusieurs reprises par un mélange d'éthanol/ether, séché sous vide stérilement. Ce NaHA sec a été redissous à la concentration désirée ($15,0 \pm 0,4$ mg/ml et $20,0 \pm 0,4$ mg/ml) dans la même solution physiologique tamponnée que celle décrite plus haut. Le pH de ces solutions était de $7,2 \pm 0,2$. La concentration en NaHA a été déterminée par dosage de l'acide hexuronique, et les tests de stérilité ont été pratiqués selon des normes de la Pharmacopée américaine.

2. Hyaluronate de sodium (NaHA).

A cours de quelques expériences sur les yeux des singes nocturnes; la vitesse de diffusion du NIF-NaHA a été comparée avec celle d'une préparation étalon de NaHA. La préparation de NaHA a été obtenue auprès de Biomatrix, Inc., et ses caractéristiques chimiques et physico-chimiques étaient dans les limites décrites plus haut pour le NIF-NaHA. Elle contenait 10 mg/ml de NaHA dissous dans la même solution physiologique tamponnée (pH 7,2), stérile et apyrogène. La seule différence était qu'elle contenait des impuretés capables de provoquer une inflammation et, par conséquent, donnait une réaction de plus de 500 cellules par mm^3 dans l'humeur aqueuse lors du test sur l'oeil du singe nocturne.

B. Solution physiologique tamponnée (SPT).

Cette solution contenait (par litre d'eau bidistillée apyrogène) 8 mg de NaCl, 0,04 de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 0,28 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Son pH était de $7,2 \pm 0,2$. Elle a été stérilisée par filtration (Filtre Millipore, taille des pores 0,22 μm) dans notre laboratoire. C'est dans cette solution que le NIF-NaHA et le NaHA ont été dissous.

C. Ovalbumine.

Albumine d'oeuf, cristallisée, Catalogue # 100132, lot # 4561, (ICN Pharmaceuticals, Plainview, N.Y.).

D. Adjuvant complet bacto de Freund.

Contrôle n° 518843, n° 0638-59 (Difco Laboratories, Detroit, MI.).

E. Lectines

(Miles Laboratories, Elkhart, IN.) Concanavaline A: 3X cristallisée, poudre lyophilisée, exempte de sels, catalogue n° 79-003, lot n° 121, exempte de carbohydrates, en solution dans la solution physiologique tamponnée, stérilisée par filtration. Agglutinine de germe de blé : catalogue n° 79-016, lot 23 fournie dans 0,01M de tampon phosphate, pH 7,4 en solution dans de la solution physiologique pour corriger la concentration en phosphate, stérilisée par filtration. Agglutinine de soja: catalogue n° 79-018, lot SB 21, en solution dans la solution physiologique et stérilisée par filtration.

F. α -méthyl-D-mannopyranoside.

Lot n° M6882, (Sigma Biochemicals, St. Louis, MO.).

G. Hyaluronidase de sangsue.

Specific β -1+3 hyaluronate hydrolase a été obtenue de Bio-matrix, NY,NY). Cette enzyme, ne dégrade pas d'autres glycosaminoglycannes. Son pH optimum est compris entre 6 et 7 (Hahn, 1945; Linker, Meyer et Hoffman, 1960; Yuki et Fishman, 1963). Elle a été dissoute dans du tampon de McIlvaine, pH 7,0.

H. Hyaluronidase testiculaire

Une endo-hexosaminidase β 1 - 4 non spécifique, dégradant NaHA et les ChS, a été obtenue des Laboratoires WYETH lab, Philadelphia, P.A. Cette enzyme est dissoute dans du tampon McIlvaine's à pH - 5,5.

I. Fibronectine plasmatique et ses anticorps

La fibronectine du plasma humain (FN) a été purifiée selon Vuento et Vaheri (1979). La FN purifiée donné une seule ligne en immunodiffusion et immunoelectrophoreses contre un antisérum antiprotéines plasmatiques humains (Institut Pasteur, Paris).

Les anticorps ont été préparés en immunisant des lapins par FN purifiée. L'antisérum anti-FN a été purifié par passage à travers une colonne de gelatine de CNBr-Sepharose pour absorber la FN présente dans le sérum du lapin. Ensuite il a été passé à travers une colonne de protéines plasmatiques humaine-Sepharose, privées des FN, pour absorber tous les anticorps non dirigés contre FN.



III. Méthodes utilisées dans les expériences sur le liquide vitré.

A. Substitution du liquide vitré: singe nocturne.

Nous avons utilisé deux gouttes de solution ophtalmique cyclopentolate HCl à 1% (Cyclogyl, Scheiffelin and Co., New York, N.Y.) pour induire la mydriase avant l'opération chirurgicale. Après dilatation totale de la pupille (approximativement 20 minutes), le singe a été calmé par une injection intramusculaire de cetamine HCl, 12 mg/kg de poids corporel (Vetalar 100 mg/ml, Parke, Davis and Co., Detroit, MI). Nous avons appliqué à la surface de la cornée de la proparacaine HCl (Alcaine, 0,5%, Alcon Laboratories, Ft. Worth, TX, comme anesthésique topique. Chaque oeil a d'abord été examiné avec une lampe à fente. Pour pouvoir être sélectionnés pour cette étude, la chambre antérieure et le liquide vitré devaient être dépourvus de cellules et de flocons qui indiquent une concentration en protéines excessive), et le cristallin ne devait présenter aucune opacité. De plus, la cornée et l'iris devaient être normaux. Le liquide vitré et la rétine devaient être normaux à l'ophtalmoscope indirect (à l'exception de quelques cas où la pathologie faisait partie du protocole expérimental).

Afin de préparer l'aire orbitale latérale pour l'opération chirurgicale, nous l'avons rasé de près avec un rasoir électrique. L'aire périorbitale a été nettoyée à l'iode à 1%. L'oeil (y compris les culs de sacs) a alors été lavé avec une solution saline stérile, puis séché avec du coton stérile. De ce moment et pendant l'opération, nous avons utilisé des larmes artificielles (Isopto Tears,alcon Laboratories, Ft. Worth, TX) afin de maintenir la cornée humide. La surface nettoyée a alors été recouverte de plastique stérile découpé spécialement pour découvrir uniquement la partie à opérer. A partir de ce moment, les différentes étapes ont été conduites stérilement.

Nous avons pratiqué une canthotomie temporale, et incisé la peau sur 5 à 8 mm. nous avons dégagé l'os orbital latéral de la peau et du tissu sous-cutané. Une pièce d'os triangulaire (5 x 5 mm) a été excisée et libérée de la sclérotique en direction du limbe afin que l'intégrité de la jonction tissu conjonctif - limbe ne soit pas altérés, diminuant ainsi le risque d'infection post-opératoire. Ensuite, nous avons libéré une petite surface de la sclérotique, en étendant l'incision latérale du tissu conjonctif; puis la sclérotique a été cautérisée à 5 mm du limbe à l'aide d'une baguette de verre stérilisée à la flamme. Nous avons placé à cet endroit deux sutures sans perforer le globe

oculaire. Une aiguille de 0.5 mm reliée à un tube flexible (Abbot Laboratories, Needham Heights, MA) attachée à une seringue stérilisée de 2,5 ml a été insérée à travers l'espace cautérisé de la sclérotique (par plan ciliaire, 5 mm derrière le limbe) dans le liquide vitré. Pendant cette opération l'aiguille doit être tenue sans bouger dans un angle dirigé vers la partie périphérique de la cavité du liquide vitré (afin de ne pas tirer le canal de Cloquet) mais sans toucher la rétine. Nous avons alors extrait lentement 0,9 - 1,1 ml de liquide vitré (approximativement la moitié du volume total). Ce liquide vitré a été remplacé par un volume égal de NIF-NaHA ou de NaHA ($10,0 \pm 0,2$ mg/ml). Nous avons refermé la sclérotique immédiatement après avoir retiré l'aiguille en tirant fermement la suture et en la complétant par un noeud carré.

L'espace autour de la blessure a été lavée avec une solution saline stérile et la blessure séchée avec un coton stérile. La blessure conjonctivale a alors été fermée par 2 sutures au fil de soie 7 - 0. Nous avons, alors examiné l'oeil à l'aide d'un ophtalmoscope indirect et d'une lampe à fente pour détecter une hémorragie éventuelle dans le liquide vitré. Quand une telle hémorragie fut décelée nous n'avons pas utilisé l'oeil pour l'expérience. Après l'examen, nous avons déposé sur la cornée une goutte de sulfate d'atropine ophtalmique (1% Alcon Laboratories, Inc., Ft. Worth, TX) et nous avons placé dans les culs de sac oculaires une pommade à l'érythromycine ophtalmique (Ilotycine, 5 mg/g, Dista Products Co., Eli Lilly, Indianapolis, IN).

B. Substitution du liquide vitré: Macaque rhésus.

Le protocole était à peu près le même que celui décrit pour le singe nocturne avec les exceptions suivantes. Le macaque rhésus a été calmé avec une solution de cétamine HC1 à 20 mg/kg. Après avoir réalisé les contrôles biomicroscopiques et anesthésié topiquement la cornée par le proparacaine HC1, le tissu conjonctif latéral a été coupé à 5 mm du limbe, une petite surface de la sclérotique exposée, cauterisée, et deux sutures ont été placées à cet endroit. Une aiguille de 0.5 mm reliée à un tube à infusion pédiatrique flexible, comme celui décrit précédemment, lui-même rattachée à une seringue de 2,5 ml stérile et insérée entre des sutures sur la surface cauterisée. La pointe de l'aiguille a été soigneusement redirigée dans le liquide vitré, pour extraire lentement par succion 0,5 ml de liquide vitré et y substituer un volume égal de solution physiologique tamponnée stérile ou de NIF-NaHA.

C. Prélèvement d'échantillons de liquide vitré,

Nous avons prélevé des échantillons de liquide vitré à différents temps après l'opération, en utilisant le même procédé que pour la première opération de substitution du liquide vitré. Nous avons utilisé de la solution saline tamponnée pour remplir la chambre vitrée.

D. Prélèvement d'échantillons d'humeur aqueuse.

Les singes ont été calmés par une injection intramusculaire de cetamine HCl comme décrit précédemment. Il n'a pas été nécessaire de redilater les pupilles puisque les yeux avaient été traités à l'atropine après l'opération de substitution et que l'effet de cette drogue dure plusieurs jours. Les culs de sacs oculaires ont été lavés avec une solution saline stérile et du proparacaine HCl appliqué comme anesthésique topique. Nous avons séché la cornée avec du coton stérile pour la préparer au prélèvement d'humeur aqueuse. Le prélèvement est fait dans des conditions stériles au moyen d'une aiguille de 0.4 mm rattachée à une seringue en plastique de type tuberculine, à travers la cornée jusqu'au limbe dans la chambre antérieure. Nous avons fait attention à ce qu'il n'y ait aucun contact avec l'iris, le cristallin ou l'endothélium de la cornée. Après prélèvement de l'humeur aqueuse, nous avons reformé la chambre antérieure avec de l'air stérile.

E. Biomicroscopie et ophtalmoscopie.

Une biomicroscopie détaillée (lampe à fente Zeiss 900) du segment antérieur et du liquide vitré a été utilisée pour l'évaluation clinique des yeux du singe nocturne et du macaque rhésus. Les résultats ont été enregistrés sur le graphique Tolentino. Les réactions vasculaires de l'iris, la transparence de la cornée, la présence

de précipités et de cellules dans la chambre antérieure ont été relevées si elles étaient observées. La biomicroscopie à la lampe à fente comprenait l'examen de l'intégrité du gel vitré antérieur et sa relation avec la capsule du cristallin postérieur. La position et la configuration du canal de Cloquet ont également été reportés. Après l'opération, la biomicroscopie du liquide vitré a également compris l'évaluation de la position du NIF-NaHA ou du NaHA injecté.

Tous les yeux ont été examinés ainsi par ophtalmoscopie indirecte (Schepens Indirect Ophtalmoscope, Mira, Inc., Boston, MA) avant le remplacement chirurgical du vitré, puis 48 heures et une semaine plus tard.

IV. Méthodes utilisées pour les expériences sur les articulations

A. Injection intra-articulaire.

1. Injection dans l'articulation du lapin.

Les lapins ont été anesthésiés par une injection intraveineuse de pentobarbital de sodium (30 mg/kg de poids corporel). Le genou a alors été rasé et nettoyé avec de l'alcool à 70%. La patte postérieure du lapin maintenu en position pliée, nous avons inséré une aiguille de 0.5 mm entre les condyles fémoraux latéraux et du tibia, au dessous du quadriceps dans l'espace intra-articulaire, à une profondeur d'environ 8 mm. L'injection a été effectuée le plus lentement possible. Aucune perte n'est observée, si l'on suit ce procédé.

2. Injection dans l'articulation du cheval.

Les articulations étudiées furent celles du carpe et du jarret. Avant les injections, la peau a été soigneusement rasée, lavée et désinfectée. Une anesthésie locale sous cutanée a été pratiquée en faisant extrêmement attention à ce que l'anesthésie ne soit pas introduit dans l'articulation. Une aiguille stérile attachée à une seringue stérile de 5 ml, a été introduite dans l'espace articulaire pour le prélèvement d'un volume de liquide synovial égal au volume de solution saline tamponnée ou de NaHA injecté par la suite. La quantité de volume à

prélever a été sélectionnée par un procédé de randomisation. Les solutions salines tamponnées ou de NIF-NaHA ont été injectées en remplaçant l'aiguille de 5 ml avec laquelle le liquide synovial avait été prélevé par une aiguille contenant la solution à injecter. Ceci a été réalisé en tenant l'aiguille aussi fermement que possible et en échangeant les seringues sans contamination. Après l'injection, l'aiguille a été retirée, et dans aucun cas nous n'avons observé de perte de liquide à l'endroit de l'injection.

Après l'injection, les chevaux n'avaient pas l'air de ressentir de douleur, et continuaient à se tenir debout normalement. 24, 48, 72 heures et 7 jours plus tard, les articulations ont été reponctionnées selon la même méthode que celle décrite précédemment et 1, & à 1,5 ml de liquide synovial ont été recueillis. Avant le prélèvement, les articulations ont été examinées cliniquement afin de rechercher des signes possibles d'inflammation, comme un accroissement de la température de la peau autour de l'articulation, ou des enflures. Quand de tels symptômes ont été relevés ils ont été reportés sur le graphique. Pendant ces 7 jours les chevaux avaient été maintenus au repos dans leur box mais après le dernier prélèvement de liquide synovial ils ont été libérés dans un pré où un exercice normal leur a été permis. Nous avons procédé à 4 expériences successives sur les mêmes articulations de ces chevaux.

Entre chaque série, nous laissons les chevaux se reposer pendant 2 à 3 semaines pendant lesquelles ils étaient autorisés à se mouvoir librement dans le pré.

B. Exemples d'arthrites induites chirurgicalement.

1. Coupe de cartilage sur des zones portantes.

Des lapins (2,3 - 3,7 kg; moyen: $3,2 \pm 0,1$ kg) ont été anesthésiés par une injection intraveineuse de pentobarbital (Diabutal, Diamond Laboratories, Inc., Des Moines, Iowa) à 30 mg/kg. Les deux genoux ont été rasés, lavés avec une solution d'alcool à 70% puis de mercurochrome. Dans des conditions stériles, nous avons procédé à l'opération suivante. Chaque genou a été maintenu dans une position fléchie, le côté ventral nous faisant face. Un scalpel stérilisé n° 11 a été inséré à travers la peau du côté médian de l'articulation jusque dans la cavité articulaire, puis avec la pointe de la lame nous avons fait une petite coupe en pleine épaisseur sur le condyle fémoral médian de chaque genou. Une étude préliminaire avait démontré que cette technique produisait des coupes en pleine épaisseur reproductibles. Nous avons utilisé des sutures dermiques (0-0) pour refermer les incisions, et vaporisé sur les plaies du Rézifilm chirurgical (Squibb).

Après les sutures, nous avons injecté dans le genou droit de chacun des animaux 0,3 ml de NIF-NaHA (C95 15,0 \pm 0,2 mg/ml, Biomatrix Inc., New York, N.Y.). Les genoux gauches des lapins ont été injectés de 0,3 ml de la solution physiologique tamponnée. Nous avons poursuivi les injections deux fois par semaine pendant 5 semaines et demie, 12 semaines et 17 semaines. Nous avons laissé passer 5 jours entre la dernière injection et le jour du sacrifice; nous avons prélevé des échantillons de cartilage et de lavages de liquide synovial pour les analyser comme il est décrit en page 172. Un morceau de cartilage de la surface coupée a été inclus et étudié en histologie pour évaluer sa souffrance; un autre morceau a été utilisé pour une évaluation de l'incorporation de proline et sulfate radioactif. La teneur en GAG a été déterminée sur le morceau restant.

2. Production d'articulations instables chez le lapin.

L'instabilité dans 28 articulations de genoux de lapins, fut réalisée selon la méthode de Telhag et Lindberg (1972). L'articulation a été ouverte dans des conditions stériles par une incision médiane parapatellaire. Le ligament collatéral médian a été disséqué, et nous en avons excisé 3 - 4 mm; le ménisque médian a été enlevé et les ligaments cruciaux antérieur et postérieur divisés.

Après fermeture de la plaie, nous avons injecté dans l'espace intra-articulaire de 14 genoux du NIF-NaHA, 0,5 ml à 20 mg/ml (C2112, Biomatrix, Inc., New York, N.Y)

Dans 10 autres genoux: 0,5 ml de la solution physiologique tamponnée, et dans les 4 autres genoux restants: rien. L'autre genou, non-opéré a servi de contrôle dans chaque cas.

Les animaux ont été sacrifiés 14 semaines après l'opération. Pendant ce temps ils ont reçu, deux fois par semaine, des injections intra-articulaires de NIF-NaHA (0,3 ml) dans la solution physiologique tamponnée (SPT). Tous les animaux ont été sacrifiés 8 jours après la dernière injection. Nous avons prélevé des échantillons de cartilage, et des lavages de liquide synovial afin de les analyser.

3. Immobilisation de l'articulation du lapin.

Trente-trois (33) lapins adultes, mâles ou femelles, pesant de 3,2 à 5,2 kg (poids moyen: $3,9 \pm 0,1$ kg) ont été utilisés pour cette partie de l'expérience. Le type de traitement pour chaque lapin a été sélectionné au hasard, et la composition de chacun des 4 groupes était la suivante:

- I. 1 genou : CONTROLE (aiguille insérée puis retirée)
1 genou : Immobilisé/CONTROLE
- II. 1 genou : Injection de NIF-NaHA (0,3 ml)
1 genou : Immobilisé/CONTROLE
- III. 1 genou : contrôle
1 genou : Immobilisé/injection de NIF-NaHA
- IV. 1 genou : Injection de NIF-NaHA
1 genou : Immobilisé/injection de NIF-NaHA

En conséquence, chaque lapin n'a eu qu'un genou immobilisé, le protocole a été conduit de la manière suivante. Sous anesthésie au pentobarbital, les pattes arrières des lapins ont été soigneusement rasées. Les genoux ont été traités comme il est décrit en page 106 soit comme CONTROLE, soit avec du NIF-NaHA, lot 1427, $10,0 \pm 0,2$ mg/ml (Pharmacia AB, Uppsala, Suède). Le genou a alors été enveloppé avec un bandage surgitube, (Carlton Corp., Tenfly, N.J.), ouate Hexcelite et recouvert avec du ruban Hexcelite Orthopedic (n° 103, platre 2 pouces, Hexcel Medical Products, San Francisco, CA). La patte a été plâtrée en extension, de l'aîne à l'extrémité de la patte. Nous avons fait attention à ce que le plâtre soit suffisamment ajusté pour que les mouvements soient limités, mais sans gêner la circulation du sang. Après 7 jours, les lapins ont été sacrifiés et les plâtres retirés. Les

lavages de liquide synovial ont été traités comme il est décrit dans le chapitre "Résultats", page 172. Nous avons prélevé des échantillons de cartilage, nous les avons pesés et congelés afin de les avoir à notre disposition pour des analyses microchimiques du NaHA, ChS et KS.

C. Exemples d'arthrites induites immuno-
logiquement et chimiquement.

1. L'arthrite induite par l'ovalbumine
dans des articulations de lapins.

Nous avons utilisé pour cette expérience vingt lapins blancs, adultes, du sexe mâle de Nouvelle Zélande (3,3 à 5,2 kg, poids moyen: $3,9 \pm 0,2$ kg). Huit de ces animaux ont été sensibilisés à l'ovalbumine (Ovalbumine; OA) par la technique de Steinberg, McCrae, Cohen et Schumacher (1973). L'ovalbumine (2 X cristallisée) a été dissoute dans de la solution physiologique tamponnée stérile à une concentration de 20 mg/ml, puis stérilisée par filtration à travers un filtre Millipore (taille des pores: 0,22 μ m). Le filtrat a été émulsionné avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund pour atteindre une concentration finale de 10 mg/ml. Le premier jour chaque lapin a reçu 5 injections intradermiques de 0,2 ml de cette émulsion, (injection effectuée sur la surface rasée entre les scapulaires). Cette sensibilisation a été répétée trois semaines plus tard. Après trois autres semaines, des tests cutanés ont été réalisés par injection de 10 mg d'ovalbumine. Les tests ont été évalués le jour suivant;

tous les animaux ont donné une réponse positive.

Le jour suivant les évaluations des réponses positives, nous avons procédé à des injections intra-articulaires dans les genoux des lapins de la façon suivante:

Le premier jour: Sensibilisation -OA. 5 animaux ont reçu 0,3 ml de NIF-NaHA ($10,0 \pm 0,2$ mg/ml) injecté intra-articulairement. Les genoux opposés n'ont reçu aucune injection. 5 animaux ont reçu 0,3 ml de solution physiologique tamponnée dans un genou et 10 mg d'ovalbumine dans 0,3 ml de solution physiologique tamponnée dans le genou opposé.

Le second jour: tous les genoux du premier groupe de 5 animaux ont reçu 10 mg OA dans 0,3 ml de solution physiologique tamponnée. Tous les animaux ont été sacrifiés 28 jours après l'injection intra-articulaire d'OA ou SPT par section des veines jugulaires. Les lavages de synovie ont été prélevés.

2. L'arthrite induite par les lectines.

Dans la première partie de cette expérience, la conca-navaline A (CON-A) a été étudiée pour son effet inflammatoire après une injection intra-articulaire. La concanavaline A (3 x cristallisée) a été dissoute dans du SPT à une concentration de 6,7 mg/ml et stérilisé par filtration à travers un filtre Millipore (taille des pores $0,22 \mu\text{m}$). Nous avons préparé douze (12) lapins à une injection intra-articulaire, en rasant leurs genoux

et en les nettoyant avec de l'alcool à 70% et avec du mercurochrome. A ce moment là nous avons mesuré le diamètre de l'articulation avec un compas, puis nous avons procédé aux injections (0,3 ml contenant 1,5 mg de CON-A). Chaque lapin a reçu dans un genou, 0,3 ml de solution de CON-A, et dans l'autre genou la même quantité de SPT stérile.

18 heures plus tard, les animaux ont été sacrifiés et saignés. Le diamètre d'articulation de leur genou a été mesuré, et les lavages de synovie prélevés pour le dosage du NaHA et de la teneur en protéines.

La seconde partie de cette expérience a consisté à étudier le temps que met la réaction inflammatoire pour apparaître après l'injection de 1,5 mg de CON-A dans 0,3 ml par genou. Pour cette expérience, nous avons utilisé quatre-vingt-quatorze (94) lapins. Les animaux ont été sacrifiés à des périodes différentes: 6, 18, 24, 48, 96 et 168 heures après l'injection. En plus du dosage de NaHA et des protéines, la $[\eta]_0$ dans les lavages de synovie a été mesurée. Nous avons prélevé des échantillons de cartilage et nous les avons analysé comme décrit en page 128.

La troisième partie de cette expérience a consisté à évaluer l'effet de l'inhibiteur de la concanavoline A, l' α -méthyl-D-mannopyranoside sur l'inflammation produite par la CON-A. Nous avons procédé à des injections sur

trente-deux (32) lapins, et chaque genou (64) a été traité de la façon suivante:

1. Contrôle, pas de traitement
2. 0,3 ml de SPT
3. 1,5 mg de CON-A dans 0,3 ml
4. 0,5 μ g d' α -methyl-D-mannopyranoside dans 0,3 ml
- 5) 1,5 mg de CON-A + 3,5 μ g d' α -methyl-D-mannopyranoside dans 0,3 ml.

Ces cinq différents traitements ont été assignés au 64 genoux au hasard, avec la restriction suivante, la solution contenant de la CON-A n'était injecté qu'à un seul genou de chaque lapin. 18 heures plus tard les lapins ont été sacrifiés et saignés, les lavages de synovie prélevés, leur teneur en NaHA déterminée.

V. Méthodes cytologiques

A. Numération cellulaire dans l'humeur

Quelques gouttes de l'humeur aqueuse sont obtenues soit du singe nocturne soit du singe rhésus de sa chambre antérieure et sont passés dans un hématocytomètre sans dilution. Les globules blancs ont été comptés sans fixation ou coloration et les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mm^3 d'humeur aqueuse.

B. Evaluation morphologique du traumatisme du cartilage

Des échantillons de cartilage fixés dans le formol ont été incorporés dans la paraffine et coupés et colorés avec "Safranin-O-fast green" selon la méthode de Lillie (1965). L'état du cartilage a été évalué selon des critères morphologiques en utilisant une grille de quatre paramètres avec des critères histologiques (trois paramètres) et des critères biochimiques (un paramètre).

L'évaluation biochimique du traumatisme du cartilage est effectuée d'une façon indirecte par la mesure de la capacité des cellules à incorporer le sulfate radioactif ce qui mesure le métabolisme des GAG sulfatés (Boström, 1952; Dziewiatkowski, DiFerrante, Bonner et Okinaka, 1957) on a aussi étudié l'incorporation de la proline tritiée qui mesure la synthèse du

collagène. Les modifications histologiques et biochimiques progressives qui apparaissent pendant l'établissement de l'ostéoarthrose ont été évaluées dans cette étude de la façon suivante: (Weiss, communication personnelle).

Grille de la méthode d'évaluation histologique

Points de repère:

1. Ostéoarthrose précoce:
 - a) toute irrégularité de surface circonscrites à la zone tangentielle
 - b) hypercellularité légère
 - c) perte minimale de coloration à la safranine-0 dans une zone de transition
 - d) augmentation de l'incorporation de la proline et du sulfate

2. Ostéoarthrose modérée:
 - a) fissures pénétrant dans les zones de transition
 - b) agrégats cellulaires (des clones) et hypercellularité
 - c) perte de la coloration à la safranine-0 dans des zones de transition et perte légère dans la zone radiale
 - d) Augmentation de l'incorporation de la proline et du sulfate surtout dans les clones cellulaires.

3. Ostéoarthrose modérément avancée:
 - a) fissure pénétrant dans la zone radiale
 - b) présence de clones cellulaires dans toutes les zones (hypercellularité)
 - c) perte de la coloration à la safranine-0 dans les zones radiales
 - d) augmentation de l'incorporation de la proline et du sulfate

4. Ostéoarthrose avancée:

- a) fissures pénétrant toute l'épaisseur
- b) hypocellularité
- c) perte de la coloration à la safranine-0 dans tout le cartilage
- d) diminution de l'incorporation de la proline et du sulfate

C. Echantillons de cartilage pour microscopie électronique

Les échantillons de cartilage articulaire sont fixés dans le glutaraldéhyde froid à 4% dissous dans le tampon physiologique de Earle à pH 7,3. Après traitement à l'acide osmique (2% pendant 1 heure) les échantillons sont deshydratés et inclus dans l'Epon. Les coupes fixées sont contre colorées à l'acétate d'uranyle et l'acétate de plomb, observées et photographiées sur microscope Simens.

VI. Méthodes biochimiques

A. Détermination du NaHA

La concentration en NaHA du liquide vitré, l'humeur aqueuse, les lavages synoviaux et du liquide synovial a été déterminée par une modification automatisée de la réaction au carbazole de l'acide hexuronique. La réaction originale au carbazole (Dische, 1947) modifiée pour une méthode automatisée (Balazs, Berntsen, Karossa et Swann, 1965) possède plusieurs avantages sur la méthode manuelle. En premier lieu la détermination n'est plus perturbée par la présence de concentrations assez élevées de protéines (jusqu'à 2000 fois plus de protéines que d'acide hexuronique), et d'autre part les autres glucides, les composants des GAGs et des glycoprotéines n'interfèrent pas non plus avec la réaction. Il est important que les échantillons soient exempts d'acides aminés et de glucose; en conséquence seuls les échantillons dialysés sont utilisés. De plus afin de réduire la concentration en protéines à un niveau compatible avec la réaction, les échantillons ont toujours été dilués en conséquence dans des limites de 5 à 50 μg d'acide hexuronique pour 1 ml d'échantillon. Les courbes d'étalonnages de l'acide hexuronique ont été effectuées avant et après chaque série de dosage tous les jours. Cette méthode assure une précision de la détermination de $\pm 5\%$.

Le protocole suivant a été utilisé pour chaque échantillon de liquide synovial, de lavage synovial et d'humeur aqueuse. Les échantillons ont été dilués avec 0,145 N NaCl si la teneur présumée en acide hexuronique le permettait. C'est à dire que la concentration proposée est ajustée approximativement à 10 - 50 μ g/ml d'acide hexuronique. Ceci est particulièrement important si la concentration en protéines est élevée car elle réduit cette concentration à un niveau tel qu'elle n'intervient plus avec la détermination de l'acide hexuronique. Les échantillons ont alors été centrifugés à 50,000 x g dans une centrifugeuse préparative Beckman modèle L pendant une heure à 4°C. Le surnageant a ensuite été placé dans un sac de dialyse (Union Carbide Corporation, Chicago, IL; tubes de dialyse pour MW>12,000 - 14,000). Afin de retirer les impuretés des tubes de dialyse avant leur utilisation ils ont été lavés en les faisant bouillir deux fois dans de l'eau distillée puis lavés encore une fois dans de l'eau distillée. Il est important que les impuretés dialysables du sac soient retirées car elles s'accumulent à l'intérieur et contaminent la solution; ils peuvent même donner une légère coloration à la réaction au carbazole. Les sacs de dialyse sont placés dans une solution de NaCl de 0,145 N. Le rapport de volume de liquide nécessaire à la dialyse est de 1:100 c'est à dire pour 1 ml de liquide il faut 100 ml de liquide dialysé. La dialyse a été effectuée pendant un minimum de 16 heures à 4°C sous agitation constante.

Nous devons souligner que le liquide vitré et le liquide synovial se prêtent particulièrement bien à la détermination du NaHA par cette méthode par l'absence de toute quantité significative de GAGs autre que le hyaluronate. Il n'a pas été observé plus de 10% de galactosamine ou des GAGs contenant de sulfate dans le liquide vitré normal ou pathologique et pas plus de 20% dans le liquide synovial pathologique. A cause de la possibilité de 20% d'erreur dans l'estimation du NaHA par la détermination de l'acide hexuronique, le contrôle suivant a été fait de façon routinière. Dans tous les nouveaux processus pathologiques observés, la $\beta 1 \rightarrow 3$ d'acide hyaluronique hydrolase (préparé à partir de la sangsue, hyaluronidase de sangsue) était ajouté à quelques uns des échantillons. Cette enzyme dégrade spécifiquement l'acide hyaluronique mais n'attaque pas les autres GAGs. L'échantillon était alors placé dans un sac de dialyse (pour MW > 12,000 - 14,000, voir précédemment) puis dialysé de nouveau contre 100 fois son volume de tampon de McIlvaine pH 7,0. La dialyse a été faite à 37°C pendant 16 heures sous agitation constante. Afin d'empêcher une contamination bactérienne, l'incubation de la dialyse s'est faite soit sous condition stérile soit en présence de thymol. Les échantillons ont été ensuite centrifugés pendant une heure à 4°C dans une centrifugeuse préparative Beckman modèle L. Après digestion par l'hyaluronidase du sangsue, la concentration en acide hexuronique a été comparée avec celles des échantillons non digérés. Si

moins de 95% de l'acide hexuronique a été retenu dans le sac de dialyse après digestion, une correction a été faite pour la contribution de l'acide hexuronique provenant d'autres GAG que l'hyaluronate de l'échantillon. Ceci toutefois n'a pas été nécessaire pour les échantillons utilisés pour cette thèse. A partir des dosages d'acides hexuroniques, les teneurs en NaHA des échantillons ont été déterminées.

Nous avons fait un test supplémentaire afin de nous assurer qu'aucun autre GAG que l'acide hyaluronique n'était présent dans les échantillons de liquide synovial et dans les lavages articulaires. Des échantillons de liquide synovial de cheval après plusieurs injections de NIF-NaHA et des lavages articulaires de lapin à teneur élevée en NaHA ont été soumis à des analyses par chromatographie sur colonne de verres. Nous avons utilisé des colonnes à pores contrôlés (CPG) (0,9 x 198 cm). Des colonnes de glycéryl-CPG 3000 (Electro-Nucléonics, Inc. Fairfield, NJ) ont été calibrées avec des séries d'échantillons de NaHA de taille moléculaire connues ($MW \ 5,4 - 0,5 \times 10^6$). Les colonnes ont été éluées avec le NaCl 0,145N à 20 - 30°C. Dans ces conditions toutes les molécules de viscosité limite $[\eta]_0$ de 3000 cc/g ont été exclues de la colonne. Les molécules de $[\eta]_0$ supérieure à 2500 cc/g forment un pic symétrique au début de l'éluition. Les molécules plus petites pénètrent dans le CPG et sont

résolue dans le profil de l'élution de la colonne en plusieurs fractions de petite taille. Tous les GAGs se séparent clairement du NaHA de grande taille moléculaire. Les PG ne résistent pas à cette méthode de fractionnement puisqu'on n'a pas ajouté d'inhibiteurs d'enzymes proteolytiques.

Aucun des échantillons de liquide synovial de cheval, prélevés à plusieurs périodes après injection de NIF-NaHA, ni les lavages d'articulations de lapins n'ont présentés de composants contenant de l'acide hexuronique de petite taille moléculaire. Ceci prouve que les méthodes analytiques utilisés mesurent bien la teneur en NaHA des échantillons.

B. Indice de viscosité intrinsèque et taille moléculaire

La viscosité intrinsèque $[\eta]_0$ (fonction de Staudinger) est une mesure du volume moléculaire solvaté (dans notre cas hydraté). Elle est corrélée avec le poids moléculaire de la molécule dissoute sans être identique avec lui. Comme la $[\eta]_0$ est un paramètre moléculaire facile à déterminer, elle est souvent utilisée pour déterminer le poids moléculaire du NaHA. Le NaHA en solution de tampon physiologique (0,145 N de NaCl; pH 5-7) est une pelote linéaire statistique et la fonction intrinsèque de Staudinger est reliée au poids moléculaire moyen selon l'équation

$$[\eta]_0 = KM^a .$$

\underline{K} et \underline{a} sont des constantes obtenues expérimentalement. Ils dépendent du solvant utilisé, du poids moléculaire moyen du polymère, \bar{M}_w , de l'interaction entre le solvant et le polymère, et dans le cas du NaHA, de la force de cisaillement utilisée pendant les mesures de la viscosité. En conséquence, la fonction de Staudinger peut être déterminée seulement si le système de solvant et le système de mesure sont tenus constants et le poids moléculaire est déterminé par une méthode indépendante. Comme le NaHA est une très grande molécule, la détermination du poids moléculaire moyen en poids \bar{M}_w est la plus sûre. Il a été déterminé par plusieurs chercheurs en utilisant une méthode de diffusion de la lumière (Laurent et Gergely, 1955; Laurent, Ryan et Pietruszkiewicz, 1960; Cleland et Wang, 1970). Afin de diminuer l'interaction moléculaire, ces chercheurs ont utilisé des solutions de force ionique légèrement plus élevée que la valeur physiologique. Afin d'imiter au mieux possible les conditions physiologiques, nous avons utilisé comme solvant le NaCl 0,15 N (non tamponné). Comme on n'a pas utilisé de tampon le pH variait entre 5 et 7. Il a été bien établi que pour cette intervalle de pH et de concentration la viscosité du NaHA est constante (Balazs et Cleland, communication personnelle). A cause de la différence dans la force ionique et la légère différence dans les forces de cisaillement pendant les mesures de la viscosité, les valeurs précédemment publiées pour les constantes \underline{K} et \underline{a} de NaHA n'ont pas pu être utilisées.

Toutefois nous avons pu disposer d'une étude détaillé du rapport poids-moléculaire/viscosité (Wik, communication personnelle) étude pour laquelle le solvant (0,15 N de NaCl) et les mesures viscométriques utilisés étaient similaires à ceux utilisés dans notre étude. Wik a déterminé le \bar{M}_w en utilisant la diffusion de la lumière sous un faible angle (instrument à laser KMX-6, chromatix, Mountain View, CA). La viscosité a été mesurée à $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$ dans un viscomètre capillaire à dilution (Viscomatix MS, FICA, Mesnil Saint Denis - France). Dans ce viscomètre la force de cisaillement de l'eau était de 1100 sec^{-1} . Dans ces conditions la corrélation entre \bar{M}_w et $[\eta]_0$ (en cc/g) était de

$$\bar{M}_w = ([\eta]_0 / 0.49)^{1.71}$$

Nos mesures ont été effectuées sur des solutions qui ont d'abord été dialysées à 4°C contre 0,15 N de NaCl (voir les conditions de la dialyse dans la description de la détermination du NaHA).

Les échantillons dialysés ont été centrifugés pendant 2 heures à $50,000 \times g$ à 4°C dans une centrifugeuse Beckman modèle L. Nous avons déterminé la concentration en NaHA du surnageant. Si la concentration était supérieure à $60 \mu\text{g/ml}$, il était dilué avec le liquide de dialyse (0,15 N de NaCl) jusqu'à atteindre cette valeur. La viscosité été déterminée pour 4 ou 5 concentrations à $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$

(20 à 60 $\mu\text{g/ml}$) dans un viscomètre capillaire à dilution Cannon-Ubbelohde à $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$. Après la dilution finale l'échantillon dilué a été analysé pour déterminer la concentration en NaHA et les deux concentrations ont été comparées. Si la différence était supérieure à 10% les mesures n'étaient pas utilisées. Sur le graphique de la viscosité réduite (η_{sp}/c) en fonction de la concentration (en cc/g) la viscosité limite (viscosité réduite à concentration zéro) a été déterminée par extrapolation de la droite la mieux ajustée. La reproductibilité de toute la détermination est d'à peu près $\pm 10\%$. Les mesures de $[\eta]$ n'ont pas été transformées en poids moléculaires puisque ces résultats viscométriques donnaient une bonne estimation de la taille de la molécule en tant que \bar{M}_w . Mais surtout cette transformation n'a pas été faite car le solvant n'était pas exactement le même pour toutes les expériences. Pour les mesures de la viscosité nous avons utilisé des liquides vitrés très dilués ou des liquides synoviaux après dialyse pour retirer tous les composants non macromoléculaires. Néanmoins nous avons laissé les protéines et les autres molécules de poids moléculaires supérieurs à 12,000 à 14,000. Alors qu'aucune de ces macromolécules ne pouvaient contribuer directement et d'une façon significative par interaction avec les molécules du NaHA, à la viscosité du NaHA, elles pouvaient y contribuer indirectement. Autrement dit la viscosité des molécules du NaHA a été mesurée dans un environnement macromoléculaire inconnu. Comme l'élimination de ces macromolécules par traitement enzymatique ou par chromatographie pourrait influencer la

viscosité des molécules de NaHA dans leur milieu spécifique, sa purification a été évitée.

A titre indicatif, un tableau est présenté ci-dessous sur lequel nous avons reporté la viscosité limitante des molécules étalons du NIF-NaHA mesurée dans le système viscométrique et comparée avec le poids moléculaire mesuré dans les expériences décrites précédemment (Wik communication personnelle).

$[\eta]_0$ (cc/g)	\bar{M}_w
1700	912,000
2000	1,118,000
3000	1,856,000
4000	2,659,000
5000	3,515,600
6000	4,411,650
7000	5,348,100

C. Protéines

La concentration en protéines du liquide synovial, dans les lavages synoviaux, dans le vitré et dans l'humeur aqueuse a été déterminée par la réaction au phénol selon Lowry, Rosebrough, Farr et Randall (1951). Les échantillons ont été toujours centrifugés à 50 000xg pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant a été dialysé contre le NaCl 0,15N dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la préparation des échantillons pour le dosage de l'acide hexuronique (voir page 119). La sérum albumine bovine a été utilisée comme étalon.

D. Détermination des glycosaminoglycannes (GAG) dans les échantillons tissulaires

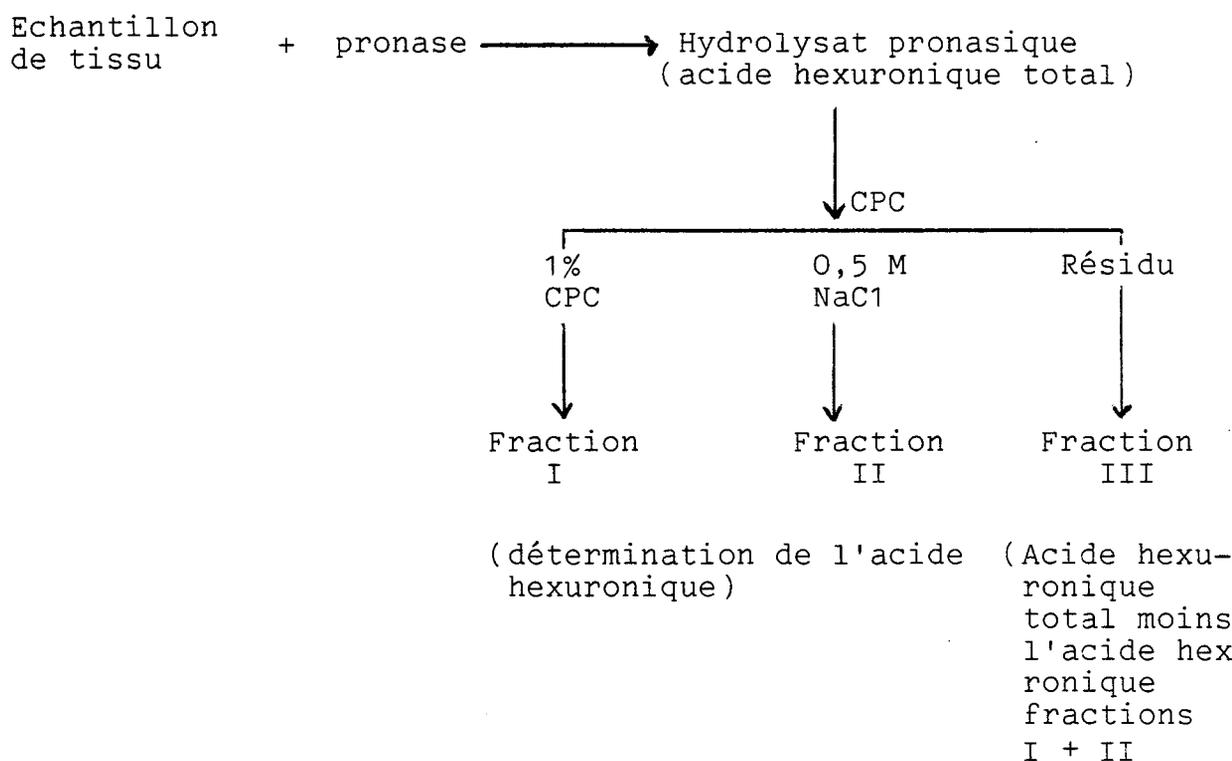
Cette méthode est basée sur la solubilité des GAGs dans le chlorure de cetylpyridinium à des concentrations critiques d'électrolytes. Pour les détails de cette méthode, voir Scott, 1965 . La méthode actuelle est une modification de celle décrite par Gardell et collaborateurs (Antonopoulos, Gardell, Szirmai, et de Tyssonsk, 1964).

1. Cartilage

Le tissu (à l'état sec ou frais) a été pesé puis traité avec 2 ml 0,10 M tampon Tris (pH 8,0, 0,001 M CaCl_2), avec de la pronase (5 mg/ml). Dix gouttes de toluène ont été ajoutées à chaque récipient en tant que bactériostatique. Les échantillons de tissu ont été digérés pendant 48 heures à 37°C

sous agitation constante. A la fin de cette période, on a enlevé le toluène par un courant d'air. Les hydrolysats pronasiques sont transférés dans des tubes coniques de 12 ml. Chaque récipient est lavé avec 1 ml d'eau, et l'eau de lavage est ajoutée à l'hydrolysate.

Le résidu non digéré est éliminé par centrifugation à 1500 rpm dans une centrifugeuse Sorvall GLC. Les surnageants sont transférés dans des petits tubes à essai et la teneur en acide hexuronique total est déterminée. Comme la solution de pronase (5 mg/ml) dans le tampon utilisé, donne une faible coloration dans cette détermination d'acide hexuronique, on applique une correction pour chaque échantillon. Les GAG et les glycopeptides anioniques dans l'hydrolysate sont précipités en ajoutant 1 ml de chlorure de cétilypyridinium (CPC) à 1% contenant 0,02 M Na_2SO_4 .



Les solutions sont agitées vigoureusement avec des baguettes de verre minces et le faible précipité obtenu est sédimenté à la température ambiante pendant 1 heure. Les précipités sont séparés par centrifugation pendant 1 heure à 1500 rpm dans la centrifugeuse Sorvall GLC. Les surnageants sont rejetés et les précipités lavés par suspension dans 3 ml de CPC 0,1%- Na_2SO_4 (0,02 M) et recentrifugés pendant 20 minutes comme décrit ci-dessus. Les sels de cétalpyridinium des kératanes-sulfates, de l'acide hyaluronique et des glycopeptides sont solubilisés comme suit:

- a. 2 ml de 1% CPC pendant 1 h à 37°C pour solubiliser le kératane-sulfate et les glycopeptides.
- b. 2 ml de 0,5 M NaCl pendant 1 h à 37°C pour solubiliser l'acide hyaluronique et les chondroïtines-sulfates faiblement sulfatés (chondroïtine).

La teneur en acide hexuronique des éluats au CPC et au NaCl a été déterminée. L'acide hexuronique des chondroïtines-sulfates a été déterminé par soustraction de la quantité d'hexuronate dans l'éluat CPC et NaCl de la quantité totale d'acide hexuronique de l'hydrolysât pronasique. La teneur en chondroïtine-sulfate (forme acide) a été obtenue par multiplication de la teneur en acide hexuronique calculée par 2,71. Bien qu'il soit possible de solubiliser les sels de cétalpyridinium des chondroïtines-sulfates, la concentration saline nécessaire (1M MgCl_2)

interfère avec la détermination automatisée des acides hexuroniques; c'est pourquoi nous avons choisi de déterminer la teneur en chondroïtine-sulfate par différence. L'acide hexuronique n'est présent ni dans les kératane-sulfates ni (sauf exception) dans les glycoprotéines; néanmoins, les éluats à 1% de CPC ont montré souvent la présence de petites quantités de substances réagissant au carbazol. Il était pour cela nécessaire de tenir compte de cette petite quantité d' "acide hexuronique" pour obtenir la différence d'acide uronique représentant les chondroïtines-sulfates.

La preuve de la présence d'acide hyaluronique dans la fraction II a été apporté de la façon suivante:

- a) un échantillon de NIF-NaHA, desséché, et traité avec la pronase et précipité avec le CPC, exactement comme pour l'hydrolysate du cartilage a été récupéré dans la Fraction II (récupération de 90%);
- b) la Fraction II a été préparé à partir d'une mise en commun de cartilage de genou (contenant toutes les trois régions) à partir d'un lapin non traité. Les glycosaminoglycannes dans cette fraction ont été précipités avec 3 volumes d'éthanol à 95%, le précipité redissous, dialysé contre l'eau distillée et traité avec la β 1 \rightarrow 3-hyaluronate hydrolase de sangsue dans un tampon de McIlvaine à pH 6,0. Cette enzyme digère l'acide hyaluronique mais ne digère pas les chondroïtines-sulfates ou la chondroïtine. A la suite de ce traitement enzymatique, le mélange réactionnel a été dialysé contre de l'eau distillée. Après ce traitement l'acide hyaluronique, qui à l'origine n'était pas dialysable, est devenu à 100% dialysable, indiquant

sa dégradation à des poids moléculaires très faibles et suggérant son identité avec l'acide hyaluronique.

La présence de chondroïtine-sulfate dans la fraction III a été démontrée par l'expérience suivante: le résidu après l'extraction par le cétypyridinium avec NaCl 0,5 M a été solubilisé par le MgCl₂ 1M et cette solution contenait de l'acide hexuronique. Le seul autre GAG nécessitant une telle force ionique élevée pour sa solubilisation de son sel de cétypyridinium est l'héparine qui n'est pas présente dans le cartilage. Le seul GAG qui n'est pas exclu de cette fraction est l'héparane-sulfate. La quantité d'héparane-sulfate dans ces tissus très faible, sinon négligeable.

2. Tissu synovial

Du tissu synovial de lapin a été prélevé à partir de la région inférieure de la rotule ainsi que de la région latérale et médiane jusqu'à la rotule. Les échantillons ont été séchés in vacuo, lavés et digérés avec du pronase.

Le produit de digestion par la pronase de chaque tissu a été analysé, comme il est décrit ci-dessus pour les échantillons de cartilage, pour l'acide hexuronique. Les liquides surnageants ont été mélangés pour chaque groupe de tissu synovial (non injectés et 6, 18, 30 et 72 heures après digestion) et les GAGs ont été précipités par CPC. Après redissolution du précipité dans NaCl 0,5 N, la solution a été dialysée contre NaCl 0,15N. L'acide hexuronique a été déterminé dans le liquide dialysé. Dans tous les cas, il y avait moins de 15% de différence entre les valeurs en acides hexuroniques/poids de tissu sec obtenus avant et

après précipitation au CPC. Le reste du liquide dialysé a été traité par la $\beta 1 \rightarrow 3$ hyaluronidase (de sangsue) comme il a été décrit ailleurs dans cette thèse et après l'acide hexuronique a été à nouveau déterminé. Dans tous les cas 90 à 100% d'acide hexuronique a été dialysé après traitement enzymatique, indiquant qu'au moins 80% de l'acide hexuronique dosé avait pour origine NaHA.

E. Prélèvement des couches superficielles du cartilage bovin et du lapin

La couche superficielle du cartilage bovin de l'articulation du métacarpe a été obtenue de jeune veaux (2 ou 4 mois), ou d'animaux adultes. L'articulation est ouverte et la surface du cartilage est lavée avec précaution avec un jet de tampon Tris. Des tranches sont ensuite coupés de la surface du cartilage. La couche superficielle n'est pas touchée, afin de la conserver dans son état natif. Ces tranches sont ensuite sectionnés au cryostat, sans fixation, pour immunofluorescence, ou, sont incubés d'abord avec les solutions d'enzymes ci-dessus mentionnées.

La surface du cartilage de l'articulation du lapin a été aussi utilisé pour des études biochimiques et pour des études de microscopie électronique. Ces échantillons sont récupérés du plateau patellaire, tibial et des condyles fémoraux. Au cours de cette récupération, on a fait attention de ne pas sectionner dans l'os; le maximum de cartilage a été obtenu des endroits mentionnés sans contamination avec le tissu péri-chondral ou avec l'os sous-chondral. Pour des études en microscopie électronique les échantillons étaient immédiatement immergés dans du glutaraldehyde tamponné, froid.

F. Détermination du NaHA dans la couche superficielle
du cartilage

La méthode ci-après a été utilisée pour récupérer semi-quantitativement le NaHA sur et dans la couche superficielle du cartilage articulaire.

Le lapin ayant été préalablement sacrifié et saigné, l'articulation du genou a été incisée. Le liquide synovial n'a pas été prélevé de l'articulation avant que celle-ci soit ouverte.

Des éponges de cellulose de 0,5 mm³ tenues à l'aide de pinces fines ont été trempées dans du SPT. Ce dernier en a été extraite par pressage avant leur dessiccation. Trois éponges ont été utilisées pour chaque articulation. Chacune d'elles, tenue à l'aide de pinces, a été légèrement frottée contre les surfaces cartilagineuses (plateau patellaire, condyles fémoraux et tibiaux). Des précautions ont été prises pour ne pas détériorer les autres tissus (ligaments cruciformes et tissu synovial). L'éponge a ensuite été placée directement dans un tube à centrifuger contenant un mélange de 0,225 mg de hyaluronidase (hydrolase d'acide hyaluronique β -1 \rightarrow 3 de sangsue) et 3 ml de SPT. Cette expérience a été renouvelée avec deux autres éponges et toutes les trois ont été placées dans un tube analogue contenant la solution enzymatique. Les tubes renfermant les éponges ont été incubés à 37°C pendant 18 heures sous agitation constante. Ils ont été ensuite centrifugés à 50 000 X g pendant 30 min. à 40°C puis le surnageant a été

recupéré. Un échantillon a été prélevé dans chaque tube afin de déterminer la teneur en acide hexuronique. Tous les échantillons ont alors été dilués pour obtenir l'échelle de concentration adéquate. Le reste du surnageant a été dialysé contre du SPT pendant 18 heures à 45°C sous agitation constante (voir détails de la dialyse au Chapitre VI "Méthodes de détermination de l'acide hexuronique). La teneur en acide hexuronique a été ensuite déterminée dans le reliquat non dilué. Il a été supposé que la différence entre la teneur en acide hexuronique des échantillons dialysés et non dialysés représentait la quantité de NaHA récupéré sur les surfaces cartilagineuses d'une articulation du genou. La reproductibilité de la méthode utilisant des articulations normales du genou s'est avérée être de 20%.

Dans certaines expériences, cette méthode d'épongeage a été utilisée après que le liquide synovial ait été prélevé de l'articulation.

G. Méthodes pour les études de fibronectine

1. Préparation des fibrilles de collagène du vitré

Des yeux de boeuf adulte ont été collectés à l'abattoir et maintenus sur glace. Les vitrés antérieur et postérieur sont séparés par une incision équatoriale à travers la sclère, le choroïde et la rétine, et le vitré postérieur est nettoyé des débris de la rétine. Le vitré est lavé trois fois avec de l'eau distillée, placé dans un tube à centrifuger et centrifugé pendant une heure à 4°C à 50 000xg dans une centrifugeuse Beckman préparative. A la suite de cette centrifugation, le volume du gel est réduit à environ 1/10ème de son volume original et concentré au fond du tube. Ce gel concentré est sorti du tube et séparé du culot plus dense contenant les débris cellulaires et les hyalocytes. Des coupes au cryostat du gel pur concentré exempt de débris ont été utilisée pour les études par immunofluorescence. Des gels préparés de cette façon ont été utilisés directement ou après des traitements enzymatiques pour étudier son interaction avec la fibronectine.

La préparation des suspensions de fibrilles du collagène du vitré a été effectuée de la façon suivante: les gels

concentrés obtenus comme décrit ont été homogénéisés. Alternativement, des yeux entiers ont été séparés du cristallin, de la sclère, du choroïde et de la rétine, et la surface du vitré congelé a été lavée à l'eau distillée pour éliminer les impuretés du tissu cortical (zonules, hyalocytes, épithélium ciliaire) de sa surface. Le vitré encore congelé a ensuite été dégelé à 4°C.

Le gel concentré ou le vitré dégelé a été traité de la façon suivante: d'abord il a été homogénéisé en le forçant à travers une aiguille de 0,9 mm, plusieurs fois. Ensuite, il a été resuspendu dans un tampon Tris et homogénéisé rapidement à 4°C avec un homogénéisateur Vortex type X-1020.

Cette suspension a été centrifugée pendant 10 minutes à 50 000xg et le résidu a été resuspendu dans le milieu utilisé pour les expériences ultérieures.

2. Traitement enzymatique du gel concentré ou des fibrilles en suspension

Le gel concentré ou les fibrilles en suspension ont été incubés dans un tampon Tris ou dans le milieu Dulbecco avec la β 1-3 hyaluronate hydrolase du sangsue, ou avec l'hyaluronidase testiculaire ou encore avec la trypsine, ou seulement dans le solvant en tant que contrôle. La concentration d'enzyme utilisée a été de 0,2 mg/ml pour l'hyaluronidase de sangsue, de 0,5 mg/ml pour l'hyaluronidase testiculaire et de 1,2 mg/ml pour la trypsine. Les échantillons ont été incubés dans un bain-marie à 37°C

pendant 1 à 2 heures sous agitation constante. Le gel concentré a été enlevé par décantation, et chaque gel a été lavé plusieurs fois avec le solvant utilisé mais sans enzyme. Dans le cas de la digestion tryptique, on a ajouté un inhibiteur de soja au gel pendant le lavage pour arrêter l'hydrolyse enzymatique des protéines. Les fibrilles de collagène ont été ensuite centrifugées comme décrit ci-dessus.

3. Méthode d'immunofluorescence indirecte (FN)

Les tissus (cartilage ou vitré) sont congelés et coupés au cryostat (-24°C), l'épaisseur moyenne des coupes est de 6 à 7 microns. Les coupes sont fixées avec une solution de formol-sucrose et lavées avec SPT. On dépose ensuite sur les coupes le sérum antifibronectine dilué au 1/20 (10 microlitres/ml), pendant 30 minutes et on lave avec du SPT. Les lames sont ensuite mises en contact avec un sérum de mouton anti-IgG de lapin marqué à la fluoréscéine (dilué au 1/40). Les coupes sont lavées dans le SPT puis de l'eau distillée. Après elles sont montées et sont observées au microscope à fluorescence Polyvar (Reichert-Jung); les photos sont prises avec une pellicule Ektachrome 160 ASA-tungstene (Labat-Robert, Birembaut, Robert et Adnet ,1981).

4. Méthode de dosage de la fibronectine par immunonéphélométrie à laser

La méthode (Labat-Robert, Derouette, Mercantini, Potazman (1981) consiste en une dilution appropriée des liquides biologiques, plasma ou un surnageant de vitré, avec un réactif contenant du polyéthylenglycol à poids moléculaire 2,000 dans du sérum physiologique (réactif PEG). Cette solution est mélangée avec de l'antisérum antifibronectine dilué d'une façon appropriée dans ce même solvant de polyéthylenglycol, et après une demi heure on effectue une lecture à l'immunonéphélomètre à laser (Hyland).

Pour les dosages sur le plasma, le sang est prélevé sur solution citratée (3,6%) 0,5 ml pour 4,5 ml de sang total. Après centrifugation, on clarifie le plasma avec du Frigen en mélangeant 300 μ l de plasma et 300 μ l de Frigen, en agitant au vortex et en centrifugeant. L'antisérum est dilué à 1:12,5 dans le solvant de polyéthylenglycol. Dans les cuves de l'immunonéphélomètre on pipette 980 μ l du réactif PEG et 20 μ l de plasma ou le liquide biologique. Pour le contrôle nous avons mis dans d'autres cuves 480 μ l de réactif PEG, 20 μ l de plasma et 500 μ l de l'antisérum dilué à 1:12,5. On mélange chaque cuve individuellement sur un vortex, et après une heure d'attente on effectue la lecture. Un blanc est réalisé au préalable avec le réactif PEG seul et aussi en mélangeant 500 μ l de réactif PEG et 500 μ l d'immunsérum. Les courbes d'étalonnages

sont obtenues soit avec la fibronectine hautement purifiée par une méthode modifiée à partir de celle de Vuento et Vaheri (1979); ou encore avec un plasma humain au préalable étalonné contre la fibronectine purifiée. Cette méthode donne des courbes d'étalonnages exploitables pour les dosages entre 1 et 10 μ g de fibronectine. Pour des liquides biologiques autre que le plasma, comme par exemple, le vitré, on effectue une dilution appropriée avant le dosage pour rester dans cet intervalle de concentration (Labat-Robert, Potazman, Derouette et Robert, 1981).

VII. Méthodes statistiques

Les méthodes statistiques utilisées dans cette thèse sont celles qui sont couramment utilisées dans les études biostatistiques et ainsi ne seront mentionnées que brièvement. Pour d'autres détails, nous renvoyons au livre de Mendenhall, Introduction aux Statistiques et Downie et Heath, Basic Statistical Methods.

A. Moyenne et erreur standard de la moyenne

Quand il est possible d'étudier un nombre d'échantillons assez grand ($n \geq 30$) pris au hasard d'une population de taille infinie, la moyenne de ces échantillons représenté à une bonne approximation la moyenne de la population entière et la déviation standard de ces échantillons autour de chaque moyenne partielle sera égale aux déviations standard de la population divisée par la racine de N

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

Quand la taille de la population est inférieure à 30, la distribution des échantillons n'est pas exactement représentée par une courbe gaussienne, la déviation standard de cet échantillon, appelé l'erreur standard de la moyenne ($S_{\bar{x}}$) ne peut être calculé avec l'équation ci-dessus mentionnée parce que la déviation standard de la population n'est pas

connue. La déviation standard de cet échantillon (erreur standard de la moyenne) est une estimation de la taille de la population (σ). Son estimation est entachée d'erreur, car les déviations standard des échantillons tendent à devenir plus petites que la déviation standard de toute la population, et les membres d'un échantillonnage plus petit proviennent souvent du centre de la distribution plus large (de toute la population); c'est pourquoi la dispersion d'une population réduite sera plus faible que celle de la population entière. La déviation standard de l'échantillon en tant qu'estimation de celle de la population pourrait être obtenue après correction de cette erreure par la formule suivante:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N-1}}$$

où s est la déviation standard de l'échantillon, $N-1$ dans le dénominateur corrige pour l'erreur de la déviation standard dans le numérateur. Il paraît donc évident que plus l'échantillonnage de la population est grand, plus petit sera l'erreur standard de la moyenne.

B. Le t statistique

Quand on compare les moyennes de petites populations, inférieures à 30 échantillons, il faut employer le test t de Student:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

Le t statistique est plus variable que le z statistique utilisé pour tester les différences entre les moyennes de larges populations et cette variabilité va diminuer au fur et à mesure que n augmente, parce que le calcul de s en tant qu'estimation de σ sera basé sur davantage d'information. Quand n est infiniment grand, t et z seront distribués d'une façon identique. Un échantillon avec n = 30 sera choisi comme une limite entre un échantillonnage large et petit, car à cette valeur de n, $t_{0,05}$ est voisin de $z_{0,05}$ (1,699 et 1,645, respectivement).

Pour tous les résultats calculés dans cette thèse la moyenne et l'erreur standard ont été calculés comme décrit ci-dessus, et comparés ensuite à l'aide du test de Student ou en tant que valeur appariée (corrélée) ou non-appariée (non-corrélée). Le niveau de signification minimal accepté est au moins de 95% ($p < 0,05$) sauf si on le mentionne autrement. Quand on fait une constatation sur la signification de la différence, le taux de alpha (le taux de la signification) est au moins à 95% ($p < 0,05$). Quand les mesures sont plus significativement différentes, nous le mentionnons en général dans le texte ou le notons dans les tableaux. L'abréviation "NS" représente toujours une signification inférieure à $p = 0,05$ (<95%).

C. Corrélation : le coefficient de corrélation produit-moment de Pearson (r)

La taille du coefficient r de Pearson varie entre +1,0 et -1. Elle renseigne sur deux choses: d'une part l'importance du rapport et la direction de ce rapport entre deux variables, avec 1,00 représentant une corrélation positive parfaite et -1,00 une corrélation négative parfaite et 0,0 représente l'absence d'une corrélation. La taille de r reflète ainsi la "quantité" de la variance qui peut être représentée par la ligne droite indépendamment de la linearité ou la nonlinearité des résultats. Le r de Pearson a été calculé par la formule brute (ou la formule machine)

$$r = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[N \sum X^2 - (\sum X)^2] [N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

Cependant, il n'est pas suffisant de calculer le coefficient r de Pearson. Il faut aussi déterminer sa signification pour décider s'il existe véritablement une corrélation entre les deux variables étudiées et non seulement une relation due au hasard. Ceci obtenu en effectuant le test t selon la formule suivante:

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{N - 2}$$

Le taux de signification (alpha) doit être inférieur à 95% ($p < 0,05$) sauf is on le mentionne autrement dans le texte.

D. Régression linéaire

Les droites de régression, ou droites de meilleur approximation sont celles autour desquelles la somme des carrés des erreurs des prédictions (la différence entre la valeur obtenue et prédite) est minimale. Pour l'expression de la ligne droite $Y = mx + b$, les formules suivantes ont été utilisées pour calculer respectivement m et b , pour prédire Y à partir de X .

$$m = \frac{N (\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{N (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

$$b = \frac{(\Sigma Y)(\Sigma X^2) - (\Sigma X)(\Sigma XY)}{N (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

En substituant des valeurs différentes de X dans l'équation de la droite on peut obtenir les valeurs de Y et la ligne de la meilleure approximation.

E. Test du Chi carré

Le test de Chi carré (χ^2) a été calculé sur des valeurs énumératives chaque fois que cela était indiqué par les résultats. La statistique de Chi carré est une estimation non-paramétrique (distribution-free) et n'est pas basée sur une distribution normale d'une population. Elle est très utile pour les résultats qui sont exprimés en fréquence,

pourcentage ou proportions. La formule générale est:

$$\chi^2 = \text{somme des } \frac{\text{fréquences observées} - \text{fréquences attendues}}{\text{fréquences attendues}}$$

Les degrés de liberté sont déterminés par la formule:

$$df = (r-1)(c-1) \text{ où } r = \text{les lignes dans le tableau de contingence}$$

$$c = \text{les colonnes dans le tableau de contingence}$$

Utilisant le tableau 2 X 2 de contingence et la formule donnée, on peut éviter le calcul des fréquences attendues. Une fois la valeur et les degrés de liberté de Chi carré connus, la valeur est recherchée sur un tableau de Chi carré pour déterminer le taux de signification et pour savoir si on peut accepter l'hypothèse qu'il y a une différence véritable entre les paramètres étudiés.

RESULTATS

I. Le métabolisme du Na-hyaluronate dans le vitré du singe.

Nous avons utilisé pour cette étude deux espèces de singes: le singe nocturne (*Aotus trivirgatus*, ou dou-roucoulis) et le macaque rhésus (*Macaca mulatta*). Le Tableau I résume les différences entre les vitrés adultes de ces deux espèces.

Tableau I. Les différences entre les vitrés du singe nocturne et du macaque rhésus.

	Singe nocturne	Macaque rhésus
Volume total de liquide vitré (ml)	2.0	2.4
Liquide vitré volume	1.9	0.9
NaHA (µg/ml)	470 ± 12	134 ± 1
Protein (µg/ml)	71 ± 3	154 ± 13

C'est la différence dans l'épaisseur du gel vitré antérieur et dans la concentration du NaHA du liquide vitré qui nous a incités à comparer ces deux espèces. Nous voulions étudier premièrement, comment l'épaisseur du gel cortical et les traumatismes possibles qui pouvaient lui être causés pendant l'administration du NaHA exogène pouvaient affecter la vitesse de diffusion de la molécule à l'extérieure de ce compartiment; et, d'autre part si la

concentration 3 à 4 fois supérieure du NaHA dans le vitré du singe normal adulte influence la vitesse d'exportation du NaHA exogène.

A. Singe nocturne

1. Vitesse d'élimination rapide .

Pour 213 yeux (73% de tous les yeux étudiés) la vitesse d'élimination a été rapide. Ce qui signifie qu'après l'opération non seulement tout le NaHA introduit a disparu du vitré mais que la concentration en NaHA du liquide vitré est retombée bien en dessous de la normale (Figure 1). La teneur moyenne en NaHA pendant 7 jours, de 20 yeux était de $106 \pm 26 \mu\text{g/ml}$, ce qui est significativement inférieure à la concentration normale ($470 \pm 12 \mu\text{g/ml}$). Nous avons calculé qu'en raison de cette vitesse d'élimination rapide le temps de demie-vie était de 3 jours. A partir du 8ème jour après l'opération la concentration en NaHA a augmenté lentement mais est restée en dessous de la normale pendant 140 - 160 jours.

Pendant des périodes variables après l'opération, il n'y a pas eu de différences significatives entre la vitesse d'élimination rapide du NIF-NaHA et du NaHA.

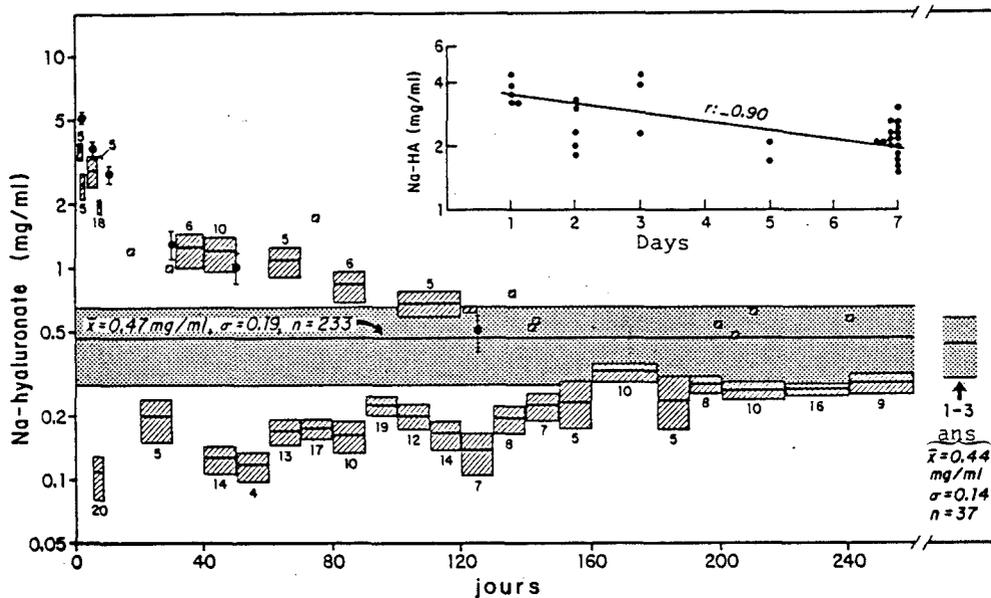


Figure 1. Vitesse de diffusion lente et rapide du NIF-NaHA dans le liquide vitré du singe nocturne. La ligne horizontale centrale et l'aire pointillée présentent la moyenne (\bar{x}) et la déviation standard (σ) de la concentration en NaHA du liquide vitré de 233 yeux de singes normaux, non opérés. Les rectangles représentent des échantillons individuels ou des échantillons à des périodes différentes après l'opération (dimension horizontale du rectangle) avec la moyenne (ligne horizontale au centre du rectangle) et l'écart standard à la moyenne (dimension verticale du rectangle). Le nombre d'échantillons représentés par chaque rectangle est indiqué à côté. Les résultats obtenus avec les yeux à vitesse de diffusion lente sont indiqués au dessus de l'aire centrale pointillée, et ceux de yeux à vitesse de diffusion rapide, au dessous. Les points noirs (moyenne) traversés par une ligne verticale (écart standard à la moyenne) montre les résultats obtenus au cours d'une expérience plus courte et plus ancienne réalisée dans notre laboratoire (Hultsch and Balazs, 1975). L'encadré représente un agrandissement de la figure principale, présentant les résultats obtenus avec 33 yeux à diffusion lente (valeurs individuelles) et la ligne de régression calculée pendant les sept premiers jours post-opératoires.



Tableau II Concentration en hyaluronate de sodium ($\mu\text{g/ml}$) du liquide vitré du singe nocturne à des temps divers (en jours) après l'introduction de NIF-NaHA et de NaHA

Vitesse d'élimination rapide

JOURS	31-60	61-90	91-140	141-260	261-600
NIF-NaHA					
$\bar{x} \pm \text{S.E.}$	122 \pm 23	172 \pm 19	185 \pm 15	247 \pm 13	233 \pm 28
σ	78	96	88	85	103
n	12	25	35	46	14
NaHA					
$\bar{x} \pm \text{S.E.}$	142 \pm 18	165 \pm 12	205 \pm 19	283 \pm 15	266 \pm 49
σ	56	47	99	74	129
n	10	15	26	23	7
Signification	NS	NS	NS	p < 0.1	NS

2. Vitesse d'élimination lente.

Une vitesse d'élimination lente a été observée pour 77 yeux (26%). Pour ces yeux la vitesse d'élimination a été plus rapide au cours des 7 premiers jours (Figure 1, Insertion). La ligne de régression calculée ($r = -0,90$) montre que la demie-vie pour le NaHA introduit est de 7 jours; en conséquence la vitesse d'élimination est deux fois plus lente que pour le groupe précédent. Après le 7ème jour la vitesse se ralentit encore plus ($r = -0,71$), à un niveau qui correspond à une demie-vie d'approximativement 63 jours. Ceci signifie que la concentration en NaHA atteint son niveau normal dans le liquide vitré 100 à 120 jours après son introduction.

Des vérifications poursuivies pendant trois ans ont montré qu'il n'y a pas eu de changement dans le niveau normal du NaHA dans le vitré (Figure 1).

Il n'y a pas eu de différence significative entre la vitesse d'élimination lente du NIF-NaHA et du NaHA déterminée à des périodes variables après l'opération.

Tableau III Concentration en hyaluronate de sodium ($\mu\text{g/ml}$) du liquide vitré du singe nocturne à des temps différents (en jours) après l'introduction de NIF-NaHA et de NaHA

Vitesse d'élimination lente

JOURS	1-5	31-50	61-90	101-600
NIF-NaHA				
$\bar{x} \pm \text{S.E.}$	2499 \pm 286	1382 \pm 226	1008 \pm 155	581 \pm 36
σ	572	677	411	141
n	4	9	7	15
NaHA				
$\bar{x} \pm \text{S.E.}$	3208 \pm 324	1019 \pm 184	897 \pm 165	618 \pm 36
σ	1025	487	368	103
n	10	7	5	8
Signification	NS	NS	NS	NS

3. Taille moléculaire ($[n]_0$) du Na-hyaluronate introduit

Quand la vitesse d'élimination était rapide la $[n]_0$ du Na-hyaluronate du vitré pendant les 22 premiers jours après l'introduction était là même que celle du polysaccharide introduit (Table III). Après 84 jours la $[n]_0$ était la même qu'avant l'introduction.

Quand la vitesse d'élimination était lente, la $[\eta]_0$ pendant les 83 premiers jours était la même que pour le polysaccharide introduit (Tableau IV). Entre 84 et 217 jours, une augmentation de 30% de ce paramètre a été observé ce qui est significativement ($p < 0,01$) supérieur aux valeurs postopératoires (celles due 1^{ier} au 22^{ème} jour). Pendant les 217 jours suivants et pendant les trois ans qui ont suivi, le NaHA du liquide vitré a gardé la même viscosité $[\eta]_0$ que celle présente dans le vitré avant l'opération.

Tableau IV. $[\eta]_0$ (cc/g) du liquide vitré du singe nocturne à différentes périodes après injection de NIF-NaHA et NaHA.

	Nbre de jours après l'implantation				Signification		
	1-22	23-83	84-217	217-1095	1-22 jours contre 23-83 jours	23-83 jours contre 84-217 jours	1-22 jours contre 84-217 jours
Vitesse de diffusion rapide	2760±260 (n:11)	4240±240 (n:33)	4980±160 (n:53)	4810±250 (n: 22)	p < 0.001	p < 0.01	p < 0.001
Vitesse de diffusion lente	2410±110 (n:29)	2770±150 (n:19)	3450±320 (n:11)				
Signification	NS	p < 0.001	p < 0.001				

Viscosité limitante de NaHA implanté : 2500 ± 1500 cc/g

Viscosité limitante de NaHA (non opéré)
dans le vitré normal : 4950 ± 86 cc/g.

4. Rôle du gel vitré cortical antérieur dans l'élimination du NaHA

Afin d'évaluer l'importance du gel cortical antérieur dans le contrôle de la diffusion du NaHA exogène injecté dans l'espace vitré, l'aire antérieure post-cristalline du vitré a été soigneusement examinée au bio-microscope

(voir méthode) dans 24 yeux, à des périodes variées, avant et après la substitution d'1 ml de liquide vitré par du NIF-NaHA. Pour évaluer l'effet possible sur l'attachement vitréo-lenticulaire de précédentes substitutions du liquide vitré, nous avons comparé deux groupes d'yeux: un groupe de 11 yeux ayant subi une substitution vitrée chirurgicale au moins 4 mois plus tôt, et un autre groupe de 13 yeux n'ayant subi aucune expérimentation. Les observations biomicroscopique ont montré un attachement vitréo-lenticulaire normal, à l'exception de 3 yeux qui présentaient une séparation partielle du gel vitré cortical antérieur de la capsule cristallinienne postérieure. De plus, le gel vitré antérieur était clair, exempt d'opacités ou de fibres, et la capsule cristallinienne postérieure ne présentait aucune condensation, ni épaissement, ni anomalies. 1 ml du liquide vitré fut remplacé dans les 24 yeux par 1 ml de solution à 10 mg/ml ou NIF-NaHA comme il a été écrit précédemment. 7 jours plus tard 1 ml du liquide vitré a été enlevé et la concentration en NaHA déterminée. Nous avons trouvé dans 13 yeux une concentration en NaHA très élevée. ($2134 \pm 115 \mu\text{g/ml}$) alors que dans 11 yeux elle était significativement plus basse que la normale ($62 \pm 9 \mu\text{g/ml}$) (Tableau V). La différence, entre ces deux groupes, de la concentration en NaHA est très significative. Etant donné qu'avant l'injection la concentration en NaHA était la même dans les deux groupes, il est possible de conclure que la différence de concentration est due à la vitesse à laquelle le NIF-HA exogène a été éliminé du liquide vitré en 7 jours.

Tableau V. Concentration en NaHA du liquide vitré et l'humeur aqueuse avant l'injection de NIF-NaHA dans le liquide vitré et sept jours après.

Groupe à	Nbre d'yeux	NaHA du vitré ($\mu\text{g/ml}$)		NaHA de l'humeur aqueuse ($\mu\text{g/ml}$)
		Avant	7 jours après	7 jours après
		l'injection		l'injection
Vitesse de diffusion lente de NaHA	13	377 \pm 28 (186-565)	2134 \pm 115 (1544-2980)	164 \pm 27 (59-389)
Vitesse de diffusion rapide du NaHA	11	361 \pm 34 (224-514)	62 \pm 9 (17-120)	25 \pm 6 (9-63)
Signification (p)		NS	<0.001	<0.001

Des échantillons d'humeur aqueuse ont été collectés à partir de ces yeux au même moment. La concentration en NaHA était significativement plus forte que la valeur normale (11,4 $\mu\text{g/ml}$) pour les deux groupes, mais le groupe à vitesse d'élimination lente a montré une concentration en NaHA significativement plus élevée dans l'humeur aqueuse que celle des yeux à vitesse d'élimination rapide (Tableau V).

Nous avons procédé aux examens biomicroscopiques immédiatement après l'opération, 2 à 3 jours après et 7 jours plus tard avant le prélèvement d'échantillons de liquide vitré ou d'humeur aqueuse. Les études biomicroscopiques détaillées ont montré que dans le groupe présentant une vitesse d'élimination lente, 10 yeux sur 13 avaient un

attachement vitréo-articulaire normal, contre 3 yeux sur 11 dans le groupe à vitesse d'élimination rapide (Tableau VI). Toutefois il était possible de voir clairement, pour trois yeux du premier groupe et huit du deuxième, un espace entre le gel cortical antérieur et le cristallin postérieur, autrement dit une séparation de l'attachement vitréo-lenticulaire. Cet espace, après l'opération, était rempli d'une solution diffusant fortement la lumière, plutôt opaque, probablement le NIF-Naha 10 mg/ml injecté. Ce phénomène était particulièrement visible immédiatement et un jour ou deux après la substitution. Sept jours plus tard la séparation entre le gel cortical antérieur et le cristallin postérieur était encore clairement visible, mais l'espace était occupé par un liquide sans aucune opacité ou diffusion de la lumière. Les analyses statistiques selon le test de Chi carré ont montré une corrélation positive et très significative ($p < 0,02$) entre le groupe à vitesse d'élimination lente et l'attachement vitréo-lenticulaire normal et le groupe à vitesse d'élimination rapide et séparation de l'attachement vitréo-lenticulaire.

Tableau VI. Corrélation entre les vitesses d'élimination lente et rapide et la présence ou l'absence d'attachement vitréo-lenticulaire.

Vitesse de diffusion de NaHA	% de cas où le liquide vitré est attaché au cristallin.	% de cas où le liquide vitreux est détaché du cristallin.
LENTE	79	21
RAPIDE	27	73
Signification (p)	<0.02	<0.02

Nous avons déterminé le chiffre de viscosité limitante [η]₀ du NaHA dans le liquide vitré dans tous les échantillons prélevés au cours de l'opération de substitution. La valeur moyenne pour les 11 yeux qui plus tard ont présenté une vitesse d'élimination lente, était de 4710 ± 44 cc/g (Tableau VII). Nous avons de nouveau déterminé sept jours plus tard la [η]₀ du NaHA dans les échantillons de liquide vitré (1 ml) prélevé dans ces yeux. La valeur moyenne était de 2460 ± 170 cc/g ce qui n'est pas très différent de celle du NIF-NaHA injecté (2670 ± 160 cc/g). Il est donc possible de conclure que le NaHA trouvé dans le liquide vitré sept jours après l'opération était principalement du NIF-NaHA injecté et non pas du NaHA normalement synthétisé par le liquide vitré du singe nocturne. Il nous a été impossible, à cause de la faible concentration en NaHA (<120 µg/ml) du liquide vitré et de l'humeur aqueuse du groupe d'yeux à vitesse

d'élimination rapide, de procéder à la fois à la détermination de la concentration et de la viscosité limitante de ces échantillons; et pour cette étude la détermination de la concentration était la plus importante.

Tableau VII. Viscosité limitante du NaHA dans le liquide vitré du singe nocturne avant et après injection de NIF-NaHA ou de NaHA.

		Viscosité limitante cc/g	Significane (p)
NaHA dans le liquide vitré	Avant l'injection	4710 ± 400	<0.01
	1 semaine après implantation	2460 ± 170	
NIF-NaHA injecté		2670 ± 160	NS

Les valeurs représentent la moyenne et l'erreur standard des 11 implantations.

Il existe une corrélation positive entre la séparation post-opératoire du gel vitré antérieur et le cristallin postérieur, et le fait que ces yeux ont été utilisé antérieurement pour plusieurs expérimentations (Tableau VIII). 73% des yeux précédemment opérés présentaient une séparation vitréo-lenticulaire après la dernière opération. D'autre part, 77% des yeux qui n'avaient jamais été utilisés présentaient après le dernier échange de liquide vitré, un attachement vitréo-lenticulaire normal. Les analyses statistiques selon le test de Chi carré ont démontré que les corrélations étaient positives et significatives ($p < 0.02$).

Tableau VIII Corrélation entre des yeux opérés précédemment ou non opérés et la présence ou l'absence d'attachement vitréo-lenticulaire

Précédente substitution du liquide vitré.	% de cas pour lesquels le liquide vitré était attaché au cristallin.	% de cas pour lesquels le liquide vitré était détaché du cristallin.
OUI	27	73
NON	77	23
Signification (p)	< 0.02	< 0.02

5. Influence de la pathologie du vitré sur l'élimination du NaHA

Afin de savoir si le gel cortical antérieur est l'élément structural le plus important dans le contrôle de la diffusion du NaHA exogène à partir du vitré, nous avons étudié 3 yeux à pathologie étendue du vitré. Deux de ces yeux avaient déjà été utilisés une fois et le dernier avait été utilisé 4 fois pour des études de substitution du liquide vitré. Pour l'un des deux yeux utilisé déjà une fois, l'opération avait créé une pathologie qui eut pour résultat un détachement total de la rétine. Trois mois après le développement de ce détachement, l'oeil ne montrait aucune inflammation aigue et le gel vitré antérieur était inaltéré. Quand 1 ml de liquide vitré était extrait et remplacé par 1 ml de NIF-NaHA à 10 mg/ml, l'attachement vitréo-lenticulaire n'était pas perturbé. Après une semaine le gel vitré antérieur était toujours attaché au cristallin et les concentrations en NaHA du liquide vitré et de l'humeur aqueuse étaient élevées

indiquant une diffusion très lente à partir de l'espace vitré. Les deux autres yeux, après respectivement, une et quatre opérations, ont développé une lourde condensation et un épaissement du gel cortical antérieur. Ce gel cortical épaissi était toujours attaché au cristallin dans l'un des cas, mais non dans l'autre. Immédiatement après et sept jours plus tard, ce gel vitré cortical antérieur pathologiquement épaissi et condensé était détaché, dans les deux yeux, du cristallin postérieur, toutefois la concentration en NaHA du liquide vitré et de l'humeur aqueuse était très élevée indiquant que le gel vitré antérieur avait exercé sa fonction normale de barrière (Tableau IX).

Tableau IX Concentration en NaHA du liquide vitré et de l'humeur aqueuse avant et après l'injection de NIF-NaHA et de NaHA: yeux pathologiques

NaHA du liquide vitré (µg/ml)		NaHA de l'humeur aqueuse (µg/ml) Après l'injection	Gel vitré attaché au cristallin	Pathologie
Avant	Après			
Injection				
228	1980	399	yes	Détachement rétinial total
199	2600	190	no	
276	2190	155	no	Condensation du gel vitré cortical antérieur

6. Effet de SPT au liquide vitré sur la concentration de NaHA de l'humeur aqueuse

A 1 ml de liquide vitré, nous avons substitué le même volume de SPT dans sept yeux non utilisés précédemment et dans 13 yeux qui avaient été utilisés lors d'études de substitution du liquide vitré 6 à 7 mois plus tôt.

Afin de savoir si le détachement vitréo-lenticulaire était dû à l'opération chirurgicale elle-même ou à l'utilisation de NIF-NaHA viscoélastique, nous avons procédé à des études biomicroscopique approfondies sur tous les yeux. Pour ceux encore non utilisés nous avons trouvé que le gel cortical antérieur était détaché du cristallin postérieur 48 heures après la substitution du liquide vitré par la SPT. Parallèlement la concentration en NaHA de l'humeur aqueuse était de $41 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ ce qui était significativement plus élevé ($p < 0.01$) que celle de l'humeur aqueuse normale de ces singes ($11 \pm 2 \mu\text{g/ml}$). Les treize yeux qui avaient déjà été utilisés présentaient également une séparation vitréo-lenticulaire après la dernière substitution du liquide vitré par la SPT, et la concentration de NaHA de l'humeur aqueuse 48 heures après la substitution était de $49 \pm 11 \mu\text{g/ml}$, ce qui n'est pas significativement différent que des résultats obtenus avec le groupe des sept yeux décrits plus haut mais est significativement ($p < 0.01$) supérieur à la normale.

7. Protéines et leucocytes dans le liquide vitré et dans l'humeur aqueuse après introduction "intravitréale" de NIF-NaHA et de NaHA

Chez le singe nocturne, comme dans toutes les autres espèces, la concentration des protéines solubles (non-collagéniques) dans l'humeur aqueuse est significativement plus élevée que celle du liquide vitré. Au cours d'une étude antérieure (Denlinger, El-Mofty et Balazs,

1980), il a été trouvé dans 166 yeux une concentration en protéines du liquide vitré de $0,071 \pm 0,003$ mg/ml. Chez 16 singes nocturnes la teneur en protéines de l'humeur aqueuse était pratiquement le double, soit était de $0,120 \pm 0,010$ mg/ml. Ce résultat est légèrement plus élevé quand la substitution du liquide vitré avait été réalisée au préalable sur les mêmes yeux. Dans la présente étude, la concentration en protéines du liquide vitré a été déterminé dans 24 yeux (Tableau X). Onze de ces yeux (6 dans le groupe à vitesse de diffusion rapide et 5 dans le groupe à vitesse de diffusion lente) avaient été utilisé précédemment (4 à 5 mois plus tôt) pour des études de substitution du vitré. Par conséquent la concentration en protéine du liquide vitré avant cette opération était considérablement plus élevé dans les deux groupes, ($0,22 \pm 0,05$ et $0,14 \pm 0,03$ mg/ml) que celle trouvée au cours d'études antérieures conduites sur des yeux pas encore opérés.

Tableau X Concentration en protéine du liquide vitré, comptage des leucocytes et concentration en protéine de l'humeur aqueuse avant et après l'injection intravitréale de NIF-NaHA et NaHA

Groupe à	N°	Vitré		Humeur aqueuse		Leucocytes/mm ³ 48 heures après l'injection
		Protéine (mg/ml)		Protéine (mg/ml)		
		Avant injection	1 sem. après	48 heures	1 sem.	
Vitesse de diffusion du NaHA lente	13	0.22 ± 0.05	0.76 ± 0.17	1.10 ± 0.29	3.69 ± 0.90	42 ± 15
Signification (p)		<0.01		<0.02		
Vitesse de diffusion du NaHA rapide	11	0.14 ± 0.03	1.09 ± 0.24	4.30 ± 1.09	3.26 ± 0.68	26 ± 8
Signification (p)		<0.01		NS		NS

La figure 2 montre l'augmentation de la concentration en protéine à différents temps après substitution du liquide vitré par du NIF-NaHA, du NaHA et du SPT. Il y a une différence très significative entre la concentration en protéine du vitré après substitution du NaHA de celle trouvée après la substitution par du NIF-NaHA. Dans 12 yeux la concentration protéinée après substitution du liquide vitré par du SPT n'était pas différente de celle trouvée après la substitution par du NIF-NaHA. 30 jours après l'opération la concentration en protéine est revenue pratiquement au niveau normal et aucune différence n'a pu être observée entre les concentrations en protéines pour les substitutions par du NIF-NaHA et par du NaHA. Le temps postopératoire nécessaire au retour à un niveau normal de la concentration en protéine était supérieure à 70 jours.

Une semaine après la substitution du liquide vitré par du NIF-NaHA la concentration en protéine du vitré a été déterminée. La valeur moyenne obtenue avec le groupe à vitesse de diffusion lente était plus basse que celle du groupe à vitesse de diffusion rapide, mais la différence n'était pas significative. Toutefois, dans les deux cas l'augmentation de la concentration en protéine était significativement plus élevée que la normale, et dans le même ordre de grandeur que celle de l'expérience présenté dans la Figure 2.

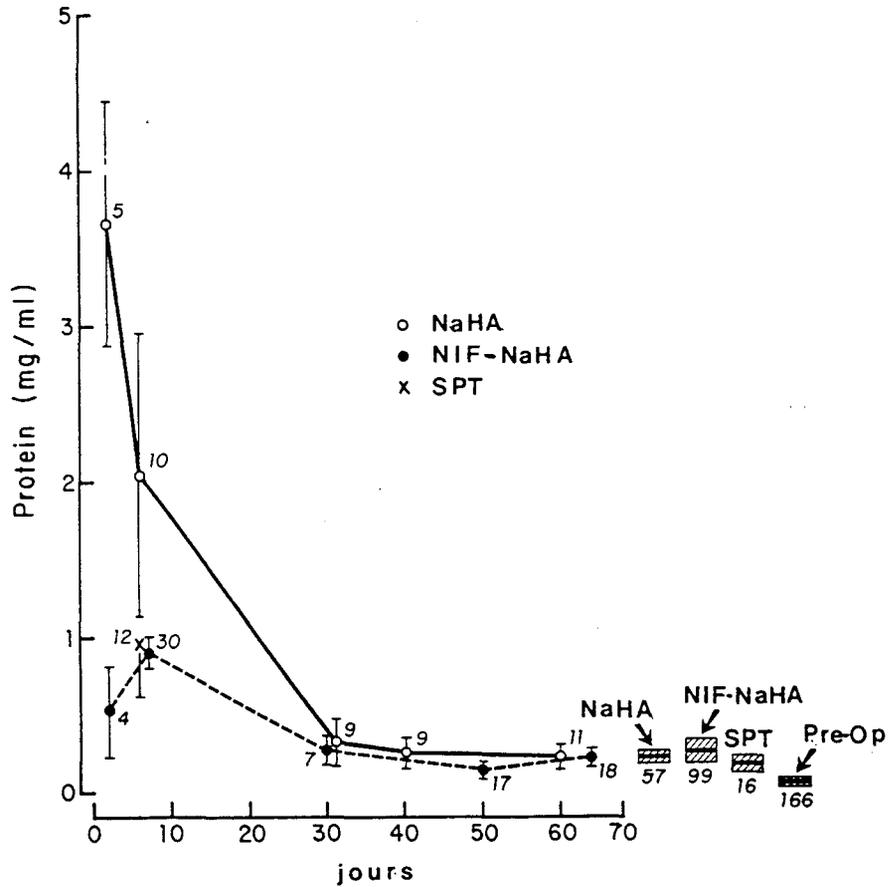


Figure 2. Concentration en protéine du liquide vitré du singe nocturne à des périodes différentes après l'introduction de NIF-NaHA (•), NaHA(◦) et de BSS (x). Les barres verticales représentent l'écart standard à la moyenne et les nombres inscrits à côté, le nombre d'yeux dans chaque groupe. Les rectangles, à droite de la figure, représentent la moyenne (ligne horizontale) et l'écart standard à la moyenne (dimension verticale du rectangle) d'yeux examinés 1 à 2 ans après l'introduction de NIF-NaHA, de NaHA et de BSS, et les valeurs précédant l'opération (PRE-OP). Les nombres inscrits sous les rectangles indiquent le nombre d'yeux dans chaque groupe.

La concentration en protéine de l'humeur aqueuse a été analysée dans 24 yeux, 48 heures puis une semaine après la substitution du liquide vitré par du NIF-NaHA. Les leucocytes de l'humeur aqueuse ont été également comptés au même moment. 48 heures après l'opération les groupes à vitesse de diffusion lente et rapide présentaient des différences significatives de la concentration en

protéine de l'humeur aqueuse, mais une semaine après il n'y avait plus aucune différence (Tableau X). 48 heures après l'opération le nombre de leucocytes de l'humeur aqueuse était bas dans les deux groupes (42 et 26 cellules/mm³). Pour chaque groupe une semaine après l'opération, il n'y avait aucune cellule. Le groupe à vitesse de diffusion lente pendant les 5 jours suivant l'opération présentait une augmentation significative de la concentration de protéine, pendant que parallèlement le groupe à vitesse de diffusion rapide présentait une décroissance légère mais non significative.

B. Macaque rhesus

Puisque l'intégrité du gel vitré cortical antérieur joue un rôle important dans la régulation de la diffusion de NaHA exogène injecté dans le liquide vitré, nous avons procédé chez le macaque rhesus à une étude similaire à celle décrite précédemment chez les singes nocturnes. Le gel vitré de ce singe en comparaison avec celui du singe nocturne présente un rapport gel - liquide beaucoup plus élevé, et par conséquent l'épaisseur du gel cortical vitré est plus importante (Denlinger, Eisner et Balazs, 1980) et sa résistance aux dommages mécaniques causés par l'opération de substitution est plus grande. Pour cette étude seule le NIF-NaHA a été utilisé pour remplacer le vitré.

1. Diffusion du NIF-NaHA à partir du liquide vitré du macaque rhésus

Dans les 43 yeux de macaques rhésus, la vitesse totale de diffusion était lente. Ceci signifie qu'aucun des yeux à aucun moment après l'injection de 5 mg de NIF-NaHA dans le liquide vitré n'a présenté une concentration en NaHA plus basse que la normale (Figure 3). La concentration en NaHA a baissé rapidement pendant les premières 48 heures après l'injection, puis la vitesse de diffusion s'est ralentie. La ligne de régression calculée à partir des résultats obtenus 3 à 90 jours après l'injection, puis la vitesse de diffusion s'est ralentie. La ligne de régression calculée à partir des résultats obtenus 2 à 90 jours après l'injection avait de $r = -0,81$. Le temps d'une demie-vie pour le NIF-NaHA dans le liquide vitré du singe macaque rhésus était donc approximativement de 21 jours.

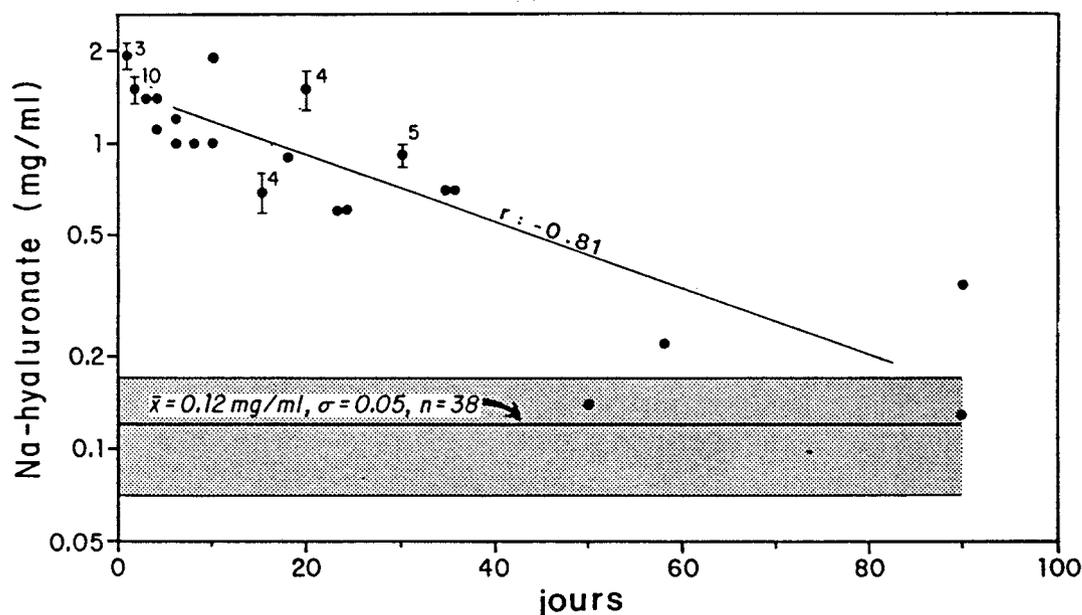


Figure 3. Diffusion du NIF-NaHA à partir du liquide vitré du macaque rhésus. La ligne horizontale et l'aire pointillée montrent la moyenne (\bar{x}) et l'écart standard à la moyenne (σ) de la concentration en NaHA du liquide vitré de 38 yeux de singes normaux et précédemment non-opérés. Les points noirs et les lignes verticales (écart standard à la moyenne) montrent des échantillons individuels et des échantillons de groupe recueillis le même jour après l'introduction de NIF-NaHA. Les chiffres inscrits à côté de chaque point indiquent le nombre d'échantillons pour chaque groupe. La ligne de régression calculée à partir de ces résultats présente un coefficient de corrélation (r) de $-0,81$.

2. Equilibre du NIF-NaHA injecté entre le gel et le liquide vitré

Nous avons sacrifié 4 singes 1, 3, 18 et 20 jours après la substitution de 0,5 ml de liquide vitré par le même volume de NIF-NaHA à 10 mg/ml. Le liquide et le gel vitré ont été soigneusement recueillis séparément et nous avons déterminé la concentration en NaHA de chacun d'eux. Le tableau XI montre qu'en 24 heures la plupart de NIF-NaHA injecté dans le compartiment du liquide vitré a diffusé dans le gel vitré augmentant la concentration originale de 16 à 24 fois. A ce moment la concentration en NaHA était toujours de 30% plus basse que celle du gel. Au troisième jour ce cette différence significative n'a pu être décelée.

Tableau XI Différences dans la concentration en NaHA du gel et du liquide vitré du macaque rhésus après la substitution de 0,5 ml de liquide vitré par le même volume de 10 mg/ml de NIF-NaHA

NaHA µg/ml dans le liquide vitré avant la substitution	Nb. de jours après la substitution	NaHA µg/ml dans		% de différence
		le liquide vitré	le gel vitré	
117	1	1885	1272	33
76	1	2236	1579	29
181	3	1764	1488	16
121	18	886	866	2
195	20	1299	1448	10
150	20	1681	1681	0

3. Taille moléculaire ($[\eta]_0$) du NIF-NaHA injecté

La $[\eta]_0$ de NaHA naturellement présent dans le liquide vitré des macaques rhésus utilisés pour cette étude était de 3110 ± 190 cc/g. Comme le NIF-NaHA injecté possédait une viscosité intrinsèque de 2920 cc/g la différence n'était pas assez grande pour pouvoir utiliser ce NIF-NaHA comme marqueur moléculaire. Ainsi que le montre le Tableau XII, pendant 35 jours d'observation suivie, le poids moléculaire du NaHA dans le liquide vitré n'était pas significativement différent de celui du NIF-NaHA naturel. Après l'opération la viscosité moyenne pour les 18 yeux était de 2700 ± 110 cc/g.

Tableau XII $[\eta]_0$ de NaHA dans le liquide vitré du macaque rhésus avant et après l'injection de NIF-NaHA

Avant l'injection	Nb. de jours après l'injection.						
	1	2	3	6	23	30	35
3110 \pm 190 (n=17)	2450	2860	2370	2000	3240	2985	2860
	2730	2340	2610	2000	2600	2820	2200
	2600	3500				2700	3650

4. Effet sur la concentration en NaHA de la substitution du liquide vitré par la SPT

Nous avons, dans 12 yeux, remplacé 1,0 ml de liquide vitré par le même volume de NIF-NaHA. Dans ces yeux le

volume de liquide vitré était de 1,0 ml ou plus car ces yeux avaient été utilisés 4 à 5 mois plus tôt pour des études de substitution par du NIF-NaHA. Toutefois au moment où nous avons commencé cette expérience, la concentration en NaHA, pour tous les yeux était revenue à la normale (138 ± 16 ; $\sigma = 56$). Le remplacement par SPT a diminué la concentration originale en hyaluronate de sodium du vitré, après l'équilibre de la teneur en hyaluronate de Na du gel et du liquide vitré, de 42%. Le Tableau XIII montre comment pendant 90 jours la concentration originelle de NaHA a lentement atteint le niveau du départ (100%).

Tableau XIII Effet de la substitution d'1 ml de liquide vitré par 1 ml de SPT sur la concentration en NaHA des yeux du macaque rhésus

Nb. de jours après la substitution	Nb. d'yeux	NaHA, % de la concentration originale
2-15	3	66 ± 2 $\sigma = 3$
30-48	5	80 ± 9 $\sigma = 20$
59-90	4	98 ± 16 $\sigma = 32$

Afin d'étudier l'effet de l'SPT sur la concentration en NaHA artificiellement élevée dans le liquide vitré, nous avons procédé sur 4 yeux à l'étude suivante. Premièrement, nous avons substitué à 0,5 ml de liquide vitré, 1% de NIF-NaHA. Quarante-cinq jours plus tard nous avons

substitué à 1,0 ml de liquide vitré, 1,0 ml de SPT. La concentration en NaHA du vitré retiré à ce moment était de $875 \pm 51 \mu\text{g/ml}$ ($r = 102$, $n = 4$). L'injection de SPT diluait la concentration en NaHA rapidement jusqu'à un taux approximatif de $510 \pm 30 \mu\text{g/ml}$. Ceci signifie que pendant les 75 jours qui ont suivi, la concentration est tombée de 64% à un niveau pratiquement normal ($148 \pm 27 \mu\text{g/ml}$). Cette baisse de la concentration durant cette période de 75 jours, après l'injection de SPT correspond à un temps de demi-vie de NaHA de 26 jours.

5. Concentration en NaHA de l'humeur aqueuse

Avant l'introduction intravitréale de NIF-NaHA, la concentration en NaHA de l'humeur aqueuse de ces singes était de $10,8 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$. Le premier jour après l'opération, cette concentration est demeurée approximativement au même niveau (Figure 4). Toutefois le jour suivant, la concentration en NaHA était 5 fois plus élevée. 23 à 35 jours après l'opération cependant elle était revenue à la normale dans ce compartiment.

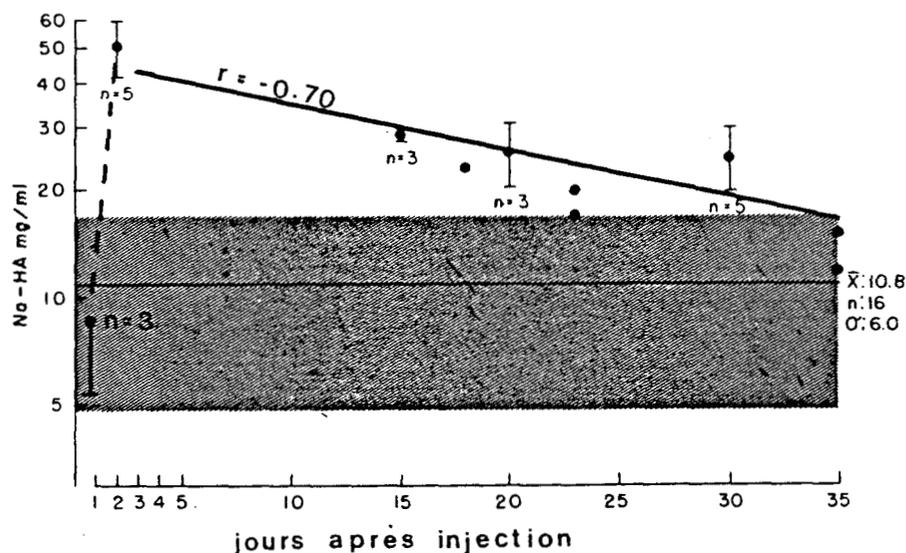


Figure 4. Concentration en NaHA de l'humeur aqueuse des macaques rhesus à des temps variables après introduction de NaHA dans le liquide vitré. Les points noirs représentent les dosages individuels de l'humeur aqueuse et les points noirs traversés d'une barre verticale, la moyenne, l'écart standard à la moyenne de plusieurs déterminations (le nombre d'individus par groupe est marqué) examinés au même moment après l'opération. La ligne horizontale et la surface hachurée représentent la moyenne (\bar{x}) et l'écart standard (σ) des valeurs trouvées pour les 16 échantillons d'humeur aqueuse, avant l'introduction intravitréale de NaHA. Le coefficient de corrélation de la ligne de régression calculée du 2ème au 35ème jour est de -0,70, par conséquent le temps de demi-vie du NaHA est de 22 jours.

6. Concentration en protéines du vitré et de l'humeur aqueuse après l'introduction intravitréale de NIF-NaHA

La concentration en protéines du vitré de l'oeil du macaque rhésus est normalement de $154 \pm 13 \mu\text{g/ml}$ ($n = 28$; Denlinger, Eisner et Balazs, 1980). A partir du second jour après l'opération, la concentration en protéine du liquide vitré augmente et demeure au dessus de la normale pendant 30 jours. Il y a des différences considérables; pour quelques uns des animaux la concentration en protéines est restée relativement proche de la normale ($160 - 260 \mu\text{g/ml}$); dans quelques autres cas la concentration était très élevée ($1000 - 5000 \mu\text{g/ml}$). La valeur moyenne toutefois, pendant les 30 jours pendant lesquels les yeux ont été suivis, a été pour 29 d'entre eux de $500 \pm 100 \mu\text{g/ml}$. A partir du trentième jour aucun des yeux étudiés (10) n'a montré une concentration en protéines plus élevée que la normale.

La concentration normale en protéines de l'humeur aqueuse du macaque rhésus est de $114 \pm 13 \mu\text{g/ml}$ ($n = 28$; Denlinger, Eisner et Balazs; 1980). Après que le NIF-NaHA ait été utilisé comme substitut d'une partie du liquide vitré, la concentration en protéines de l'humeur aqueuse s'est rarement élevée au dessus de la normale. Seuls 4 des 18 échantillons d'humeur aqueuse recueillis 3 à 35 jours après l'opération, montraient une concentration plus élevée que la valeur normale. Pour les 18 échantillons, la valeur moyenne était de $143 \pm 32 \mu\text{g/ml}$ ($\sigma = 134$).

II. Prélèvement quantitatif de NaHA à partir des genoux de lapins.

A. Technique de lavage de l'articulation.

Dans toutes les expériences sur les lapins, le volume total du liquide de lavage était de 6 ml. Nous avons étudié trois types de lavages différents les uns des autres par le volume injecté à chaque fois: 0,3 ml, 0,5 ml, et 1,0 ml. Après avoir sacrifié le lapin par une overdose de pentobarbital de sodium (Diabutal, 60 mg, 1 ml, Diamond Laboratories, Inc., Des Moines Iowa) et l'avoir saigné par section des veines jugulaires, nous avons lavé les articulations avec de la solution physiologique tamponnée (SPT). Nous avons injecté 0,3, 0,5 ou 1 ml de solution physiologique tamponnée dans l'espace intra-articulaire en utilisant une aiguille de 0,5 mm. La patte du lapin étant maintenue en position fléchie, nous avons introduit l'aiguille entre les condyles du fémur et du tibia juste au dessous du tendon quadriceps, soit de façon médiane soit latéralement. Nous avons fait attention à ce que l'aiguille n'entre pas en contact avec la surface du cartilage. Après avoir enlevé l'aiguille, l'articulation a été bougée pour assurer le mélange du liquide physiologique et du liquide synovial. Une autre aiguille de 0,5 mm rattachée à une seringue de 1 ml a été alors insérée dans l'articulation de façon à ce qu'elle pénètre soit dans la cavité bursale médiane soit dans la cavité bursale latérale de chaque côté du fémur distal. Nous avons

placé l'aiguille de façon à aspirer le plus de liquide possible au moyen de la seringue. Le liquide de lavage ainsi prélevé a été placé sur de la glace dans un tube d'essai en plastique. Ce procédé a été répété plusieurs fois jusqu'à ce que nous ayons utilisé approximativement 5 ml de liquide physiologique tamponné pour laver l'articulation et les liquides de lavage mélangés.

Les derniers 0,9 - 1,0 ml de solution physiologique tamponnée ont été conservés afin que le dernier lavage soit opéré sur l'articulation en partie disséquée.

L'articulation a été soigneusement ouverte par une incision longitudinale à travers la peau et le fascia afin d'exposer le quadriceps. Une incision transversale a été faite à travers le tendon juste en dessous de la patelle. L'articulation a été doucement comprimée et tout liquide de lavage restant a été recueilli par aspiration avec une seringue comme décrit précédemment.

Le tendon et la patelle ont été alors légèrement soulevés au moyen d'un forceps. Le tissu synovial et la capsule de l'articulation ont été coupés latéralement sur le plan médian pour exposer le plateau patellaire. Nous avons de nouveau prélevé par aspiration ce qui restait de liquide en faisant attention à ne pas toucher la surface du cartilage, et à ne pas laisser le tissu se désécher. Puis l'articulation ouverte a été soigneusement lavée avec le restant du liquide physiologique, par petites quantités et le liquide prélevé à chaque fois a été mélangé au liquide déjà conservé dans le tube d'essai.

Nous avons alors mesuré le volume de ce liquide de lavage. Chaque échantillon de lavage a été centrifugé à 50,000 x g pendant une heure à 4°C et dialysé une nuit (>16 heures) contre une solution de NaCl 0,15 N à 4°C sous agitation constante.

B. Récupération de liquide de lavage.

Pour déterminer la quantité de liquide de lavage qui doit être utilisée de manière à prélever tout le NaHA de l'espace articulaire, nous avons utilisé 149 articulations normales de lapins. Au cours des deux expériences, nous avons prélevé 6 ml de liquide de lavage par portion de 1 ml (84 articulations) ou par portion de 0,3 ml (65 articulations). Nous avons déterminé dans les deux expériences le volume total de liquide de lavage récupéré et le contenu total de NaHA. Les résultats ont été rassemblés en % par décades entre 0 et 100% de volume récupéré. Nous avons reporté sur les tableaux XIV et XV les moyennes, les écart-types de la moyenne, le nombre d'articulations dans chaque groupe, et la signification entre la moyenne de chaque groupe. Dans les deux expériences, la teneur en NaHA des liquides de lavage, où 40% ou plus de liquide avait été récupéré, ne présentait aucune différence significative. Au dessous de 40% de récupération, il y avait significativement beaucoup moins de NaHA dans le liquide de lavage. Dans ces conditions, lorsque les volumes de liquide de lavage récupérés représentaient moins de 40% du volume total de lavage récupéré, ils ne pouvaient être retenus pour les calculs.

Tableaux XIV et XV. Comparaison du volume et de la teneur en NaHA des liquides de lavage. Les volumes récupérés sont exprimés en % du volume total utilisé pour le lavage. Ils sont reportés par décades.

Tableau XIV. Dans cette expérience, 84 articulations ont été utilisées et lavés six fois par portion de 1 ml.

% de lavage récupéré	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-100
NaHA (µg) \bar{x}	137	218	269	293	305	283	260	316
$S_{\bar{x}}$	31	17	25	22	25	36	27	14
σ	75	44	84	110	106	107	60	28
n	6	7	11	24	18	9	5	4
P	< 0.05		NS		NS		NS	
		= 0.15		NS		NS		

Tableau XV. Dans cette expérience, 64 articulations ont été utilisés avec 18 lavages de 0,3 ml chacun.

% de lavage récupéré	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89
NaHA (µg) \bar{x}	109	198	265	251	265	425	411
$S_{\bar{x}}$	11	33	34	13	53	91	13
σ	22	93	139	61	130	223	18
n	4	8	17	21	6	6	2
P	< 0.05		NS		NS		
		= 0.17		NS		NS	



La figure 5 présente, pour les deux expériences, la fréquence de distribution pour plus de 40% de volume de liquide de lavage récupéré ($m = 123$) et pour moins de 40% de volume de liquide de lavage récupéré ($n = 25$). La fréquence de distribution des valeurs représentant plus de 40% de récupération, montre presque une distribution Gaussienne avec une légère distorsion sur la gauche. Par contre, 84% des figures représentant moins de 40% de récupération de liquides de lavage sont en dessous de la moyenne de la teneur en NaHA pour l'ensemble des lavages des deux expériences. Ces résultats confirment le fait qu'il convient d'exclure les échantillons représentant moins de 40% de récupération de liquide de lavage utilisé.

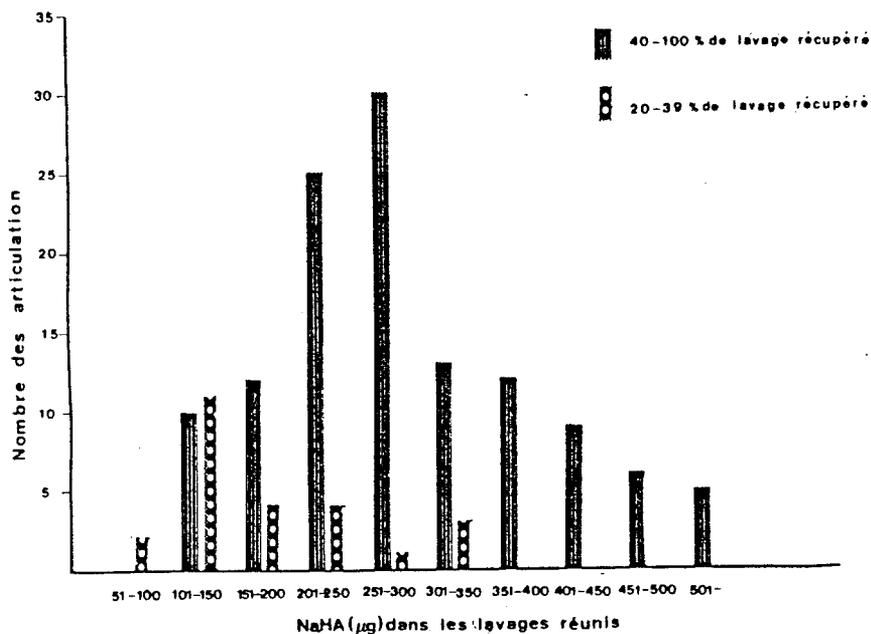


Figure 5. Fréquence de distribution du NaHA contenu dans les lavages réunis. Lavages réunis avec moins de 40% de récupération de liquide de lavage (colonnes en noir), et avec plus de 40% de liquide de lavage récupéré (colonnes rayées).

Ainsi, le NaHA total récupéré dans les liquides de lavage dépend du volume liquide récupéré. Tant que plus de 40% de ce liquide est récupéré, la variation en NaHA total des lavages reste inférieure à 20%.

C. Effet du volume des lavages individuels

Au cours de deux expériences nous avons utilisés des lavages séquentiels de 6 x 1 ml ou 18 x 0,3 ml. Dans les deux cas le volume total de liquide le lavage utilisé était de 6 ml. Si l'on compare la composition des lavages récupérés dans les deux conditions, Tableau XVI, on peut voir que les valeurs moyennes et les erreurs sont très similaires pour les deux types de lavages pour lesquels plus de 40% ou moins de 40% de liquide de lavage a été récupéré. Il existe toutefois une différence significative entre les valeurs obtenues avec plus de 40% de liquide de lavage récupéré (287 et 289 μg) et avec moins de 40% récupéré (168 et 165 μg).

Tableau XVI. Effet du volume (en %) du liquide de lavage récupéré sur le NaHA total du lavage.

Volume du lavage total récupéré.		Volumes des lavages individuels			
		0.3 ml		1.0 ml	
		NaHA (μg)	vol.(ml)*	NaHA (μg)	vol.(ml)*
> 40%	\bar{x}	287	3.4	289	3.6
	$\pm S_{\bar{x}}$	± 3	± 0.1	± 2	± 0.1
	n	52		71	
< 40%	\bar{x}	168	1.9	165	1.7
	$\pm S_{\bar{x}}$	± 13	± 0.2	± 14	± 0.1
	n	12		13	

* volume moyen récupéré.

Par conséquent, il est possible de conclure, que la manière dont les 6 ml de liquide de lavage (0,3 - 1,0 ml) sont récupérés n'entre pas en ligne de compte, tant que plus de 40% du liquide de lavage sont récupérés.

D. Erreur de la méthode.

Comme nous avons procédé aux expériences avec trois chercheurs, il a été possible d'évaluer l'erreur due à cette variable. Le Tableau XVII présente la teneur en NaHA (μg) de 71 lavages prélevés avec plus de 40% de récupération par les trois chercheurs. Les trois valeurs moyennes (281 μg , 275 μg , et 315 μg) ne présentent pas de différence significative, et l'erreur est approximativement la même pour les trois chercheurs. L'expérience n'utilisant que 0,3 ml de liquide de lavage n'a été utilisée que par un seul chercheur; par conséquent il était impossible de procéder à une évaluation similaire du résultat.

Tableau XVII. NaHA total récupéré par lavage d'articulations normales de lapin utilisant 6 lavages d'un 1 ml chacun.

Investigateur	1	2	3
NaHA (μg) $\bar{x} \pm \text{S.E.}$	281 \pm 18	275 \pm 27	315 \pm 24
n	45	9	17

Nous avons déterminé l'erreur de la méthode entière, de l'étape du lavage dans l'espace intra-articulaire (avec plus de 40% de liquide de lavage récupéré), à la détermination du NaHA total dans les liquides de lavage. Nous avons utilisé pour ces calculs le plus grand nombre d'échantillons (45) du chercheur N°1. Nous y avons sélectionné par la méthode des "chiffres au hasard" 4 groupes de 10 échantillons chacun. Nous avons calculé l'erreur pour chaque groupe et nous avons trouvé respectivement \pm 8,1; 9,9; 12,5 et 15,6% du NaHA total pour chaque cas. Par conséquent, l'erreur de la méthode, à condition qu'au moins 10 genoux soient étudiés pour chaque groupe, est estimée à 8 - 16%. Si le nombre des genoux par groupe n'est que de 5, l'erreur varie entre 6 à 23% et pour 3 genoux, de 7 à 32%.

E. Taille moléculaire de l'acide hyaluronique endogène

La viscosité intrinsèque ($[\eta]_0$) de l'acide hyaluronique des lavages articulaires de lapins normaux non traités a été déterminée. Dans 15 articulations, la valeur moyenne de ($[\eta]_0$) a été de 4060 cc/g.

F. Récupération du NaHA injecté.

Afin de déterminer le rendement de la récupération du NaHA injecté dans les articulations de genoux, nous avons injecté dans les genoux de 84 lapins, 0,05; 0,1; 0,2 et 0,3 ml de NIF-NaHA. Etant donné que la solution était de

10 mg/ml, les articulations ont reçu 0,5; 1,0; 2,0 et 3,0 mg de NaHA. En conséquence la teneur nominale en NaHA de l'articulation ($286 \pm 3 \mu\text{g/ml}$; $n=68$) a été multiplié par un facteur de 2,5 à 10. Immédiatement après les injections, les lapins ont été sacrifiés par overdose de pentobarbital et par saignement. Les articulations ont été lavées avec la solution physiologique tamponné. Pour une des expériences le lavage a été fait avec 20 portions de liquide de 0,3 ml. Pour cette expérience nous avons utilisé 31 articulations et les résultats ont été reportés sur la figure 6. Nous avons reporté sur la même figure les résultats de la seconde expérience pour laquelle les 6 ml de liquide physiologique tamponné ont été utilisés par 6 portions de 1 ml sur 53 articulations. Les résultats montrent clairement que le rendement de la récupération du NaHA injecté est bon jusqu'à 0,15 ml de NIF-NaHA injecté (1,5 g de NaHA), et qu'il n'y a pas de différence significative selon que les lavages se fassent avec 0,3 ou 1,0 ml de liquide. Pour des volumes plus importants la récupération n'est pas complète. Ceci suggère que cette méthode n'est pas utilisable que pour une quantité de NaHA inférieure ou égale à 1,5 mg.

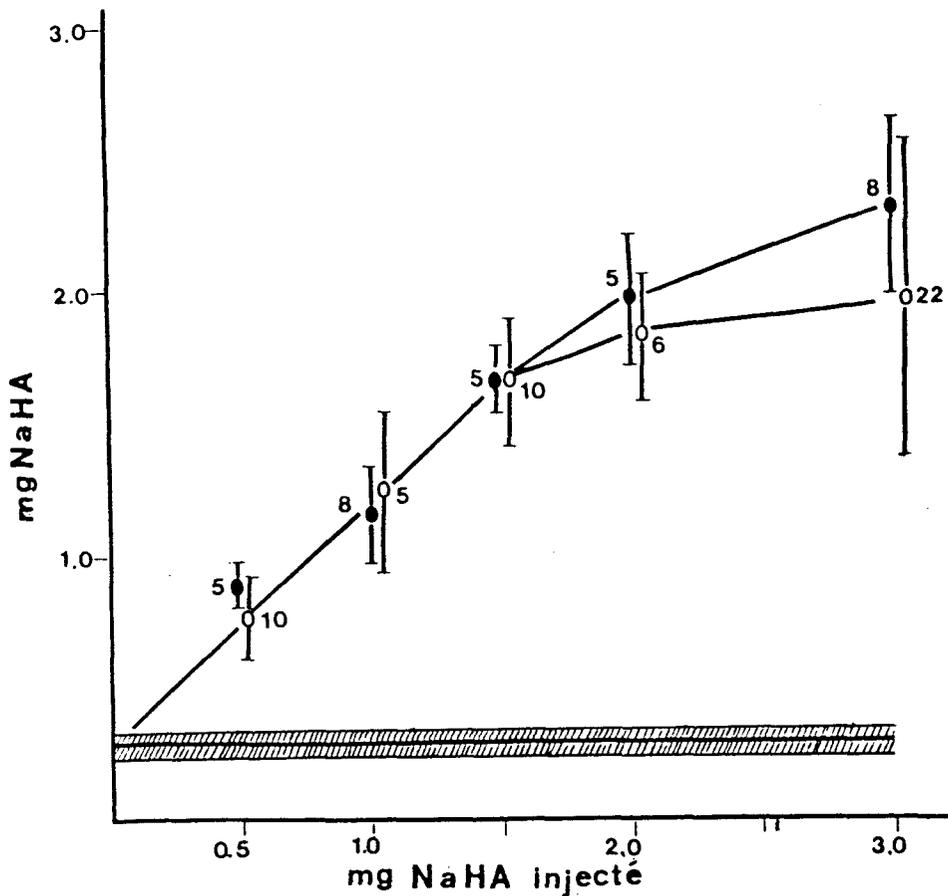


Figure 6. Quantité (mg) de NIF-NaHA injectée dans l'articulation reportée contre la quantité (mg) de NaHA récupérée de l'articulation immédiatement après l'injection. Les articulations ont été lavées avec 6 ml de liquide physiologique tamponné avec 6 portions de 1 ml (○) et avec 20 portions de 0,3 ml (●). La moyenne et la déviation standard (barres verticales) sont reportées pour chaque point comme le nombre d'articulations (représenté à côté de chaque point). Les barres horizontales représentent la moyenne et la déviation standard du NaHA des articulations du genou des lapins normaux, non-traités (n=68).



III. Métabolisme du NaHA exogène dans l'articulation du genou du lapin.

Pour connaître le temps pendant lequel le NIF-NaHA exogène reste dans l'articulation du genou du lapin, nous avons procédé à plusieurs séries d'expériences pour lesquelles le volume et la concentration de polysaccharide étaient variables. La plupart des articulations ont été examinées 18 heures après l'injection de NIF-NaHA. Toutefois les expériences ont été conduites jusqu'à 96 heures après l'injection.

A. Effet de la quantité de NIF-NaHA injecté sur la vitesse de diffusion.

Afin de déterminer l'effet de la quantité de NIF-NaHA injecté dans les articulations du lapin sur la vitesse de sa diffusion, quatre volumes différents (0,25; 0,5; 0,75 et 1,0 ml) de solution de NIF-NaHA à 10 mg/ml ont été injectés dans 39 articulations de lapins. Après les injections nous avons laissé les lapins bouger normalement dans leurs cages. Dix-huit heures plus tard, les articulations ont été lavées et nous avons évalué la teneur en NaHA. Les résultats sont représentés dans la figure 7.



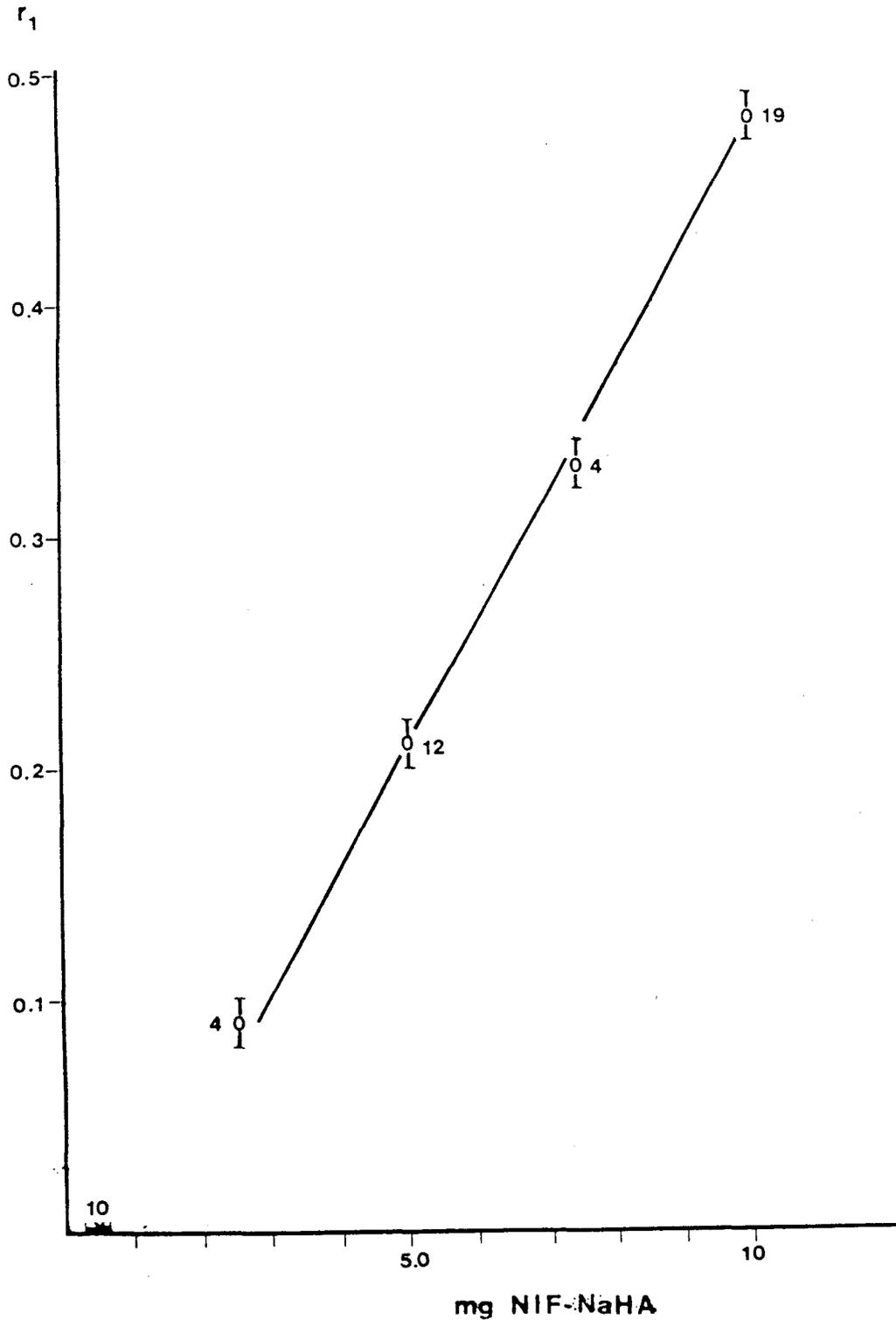


Figure 7. Quantité de NIF-NaHA (mg) injecté dans l'articulation reporté contre la vitesse de diffusion (r_1) du NaHA de l'articulation du genou, calculé à partir du résultat obtenu 18 heures après l'injection. La vitesse de diffusion (r_1) est exprimée en perte de NaHA (mg) de l'espace intra-articulaire entier pour la première heure. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne, et les nombres à côté de chaque point le nombre d'articulations utilisés pour cette expérience. La croix et les barres horizontales (-x-) dans le coin inférieur gauche représente la moyenne et l'erreur standard du NaHA (mg) dans l'articulation (10) 18 heures après l'injection de 0,3 ml de liquide physiologique tamponné.



La quantité de NIF-NaHA injecté est reporté en fonction de la vitesse de diffusion ou la perte du NaHA pendant 18 heures. La vitesse est exprimée par la quantité de NaHA diffusée par articulation et par heure. La vitesse a été calculée par l'équation suivante:

$$\frac{(m_i + m_{\text{end}}) - m_{18}}{18}$$

r_1 = vitesse de diffusion en mg par heure par articulation

m_i = quantité de NaHA injecté (mg)

m_{end} = valeur moyenne du NaHA endogène dans l'articulation du genou du lapin déterminée pour 68 articulations (0,28 mg/articulation)

m_{18} = quantité de NaHA (mg) dans l'articulation déterminé 18 heures après l'injection.

La figure 7 montre qu'il y a une très bonne corrélation linéaire ($r = 0,97$) entre la quantité de NIF-NaHA injectée et sa vitesse de diffusion. A partir de cette corrélation linéaire il est possible de calculer la quantité de NaHA diffusée par mg de NIF-NaHA injecté. Le résultat est de 0,046 mg. Ceci signifie que pour chaque ml de NIF-NaHA injecté dans l'articulation du genou du lapin, 0,046 mg sont perdus par diffusion toutes les heures après l'injection. Cela signifie également que pour 10 mg injecté, 4,6% est perdu au cours de la première heure. Les limites de

validité de ce postulat sont déterminées par les conditions de l'expérience, c'est à dire ces résultats concernent les premières 18 heures après l'injection utilisant 0,25 à 1,0 ml de NIF-NaHA à 10 mg/ml. Il est important que cette vitesse de diffusion soit déterminée en injectant du NIF-NaHA exempt de pyrogène et stérile dans des conditions d'aseptie absolue. Par conséquent les apparitions de réactions inflammatoires suivant l'injection ont été minimisées. Il peut arriver néanmoins de rencontrer une stimulation de l'articulation due au trauma de l'injection, les contrôles doivent alors être fait par injection dans 10 genoux de lapins de 0,3 ml de solution physiologique tamponné, le solvant du NIF-NaHA 18 heures plus tard, la valeur moyenne de la quantité de NaHA dans ces articulations était de $0,426 \pm 0,037$ mg. Comme les articulations non traitées contenaient $0,286 \pm 0,003$ mg de NaHA la différence est hautement significative ($p < 0,001$). Ceci signifie que la ligne de la figure 7 devrait être extrapolée jusqu'à cette valeur sur l'abscisse ce qui a été fait, compte tenu de l'erreur expérimental.

En injectant 0,25 à 1,0 ml de NIF-NaHA, on augmente l'espace du liquide de l'articulation de 1,8 à 4,3 fois par rapport à son volume normal. En injectant ces volumes à une concentration de 10 mg/ml de NIF-NaHA, on en élève également la quantité de NaHA de 1,8 à 34,3 fois. Pourtant, entre ces limites, la vitesse de diffusion de NaHA pendant les 18 premières heures est constante.

B. L'effet du volume du NIF-NaHA injecté
sur sa vitesse de sortie

Comme le volume de l'espace articulaire du genou du lapin adulte (espace synovial) a été estimé à 0,3 ml par Wigren, Wik et Falk (1975) et comme nous avons injecté des volumes similaires (0,25 ml) en trois fois plus importantes (1 ml) de liquide, la question évidente qui se posait, était de savoir si cette relativement grande différence dans les volumes injectés avaient une influence sur la vitesse de diffusion pendant les 18 premières heures après l'injection. Afin d'obtenir une réponse à cette question nous avons préparé des solutions de NIF-NaHA à 20 mg/ml. Dans des conditions stériles, en utilisant du liquide physiologique tamponné stérile et apyrogène comme diluant, nous avons dilué du NIF-NaHA à 2,25; 4,5; 9,0 et 18,0 mg/ml. A partir de ces solutions, et à partir des solutions non-diluées, nous avons injecté dans 50 articulations 0,2; 0,3; 0,5 et 1,0 ml. 18 heures plus tard les lapins ont été sacrifiés, l'espace articulaire lavé et la teneur en NaHA du lavage réunis évalué. Les 50 résultats représentant 13 quantités totales différentes de NIF-NaHA sont représentés sur les Figures 8 et 9.

Sur la Figure 8, la concentration du NIF-NaHA injecté est tracée en fonction de la vitesse de diffusion. Les quatre volumes différents sont reporté séparément (1,0; 0,5; 0,3 et 0,2 ml). Les coefficients de corrélation (r) des lignes de régression sont hautement significatifs

pour les trois volumes (1 ml : $r=0,99$; 0,5 ml : $r=0,98$; 0,2 ml : $r=0,93$). Les échantillons de 0,3 ml n'ont été utilisé que pour 2 concentrations et par conséquent la ligne de régression n'a pas pu être calculée. Ces résultats montrent clairement qu'en utilisant la même concentration de solution de NIF-NaHA, plus grand est le volume injecté, plus rapide est la vitesse de diffusion. Il est également évident que les lignes calculées extrapolent bien aux valeurs calculées pour les contrôles.

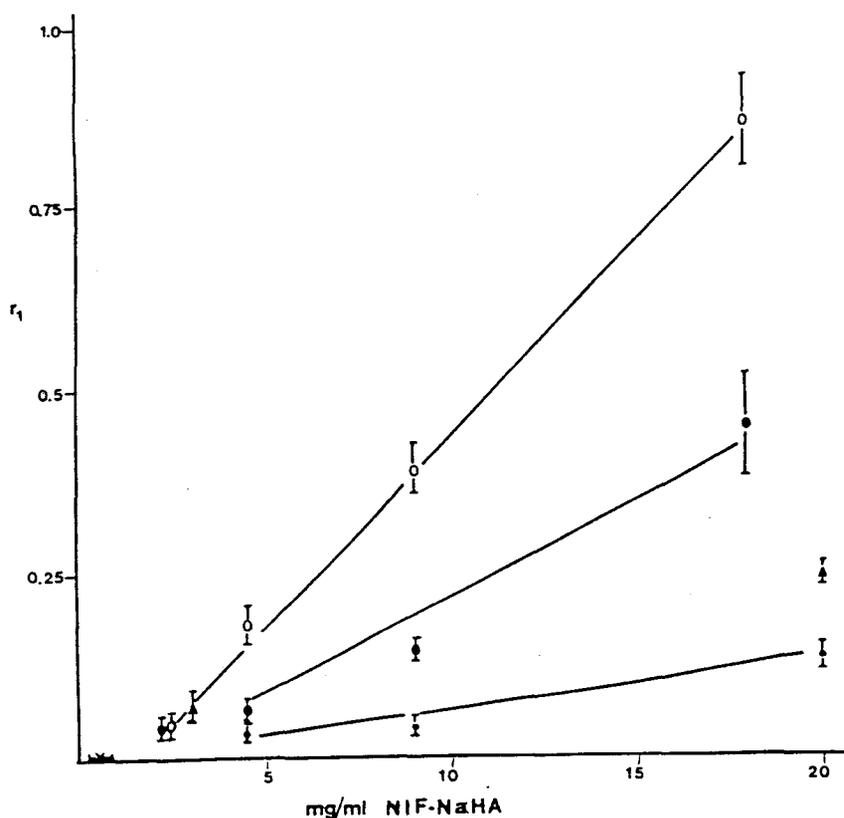


Figure 8. La concentration (mg/ml) du NIF-NaHA injecté est reporté contre la vitesse de diffusion (r_1) du NaHA de l'espace intra-articulaire. r_1 est exprimé comme NaHA en mg perdu en une heure, de l'espace articulaire entier. Ce symbole représente la valeur moyenne du NaHA obtenu pour quatre articulations dans lesquels des volumes différents avaient été injectés: cercle ouvert (O), 1 ml; cercle plein (●), 0,5 ml; triangle plein (▲) 0,3 ml; étoile (*), 0,2 ml. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne. (n=4 pour chaque point). La croix et les barres horizontales (-X-) représentent la moyenne et l'erreur standard du NaHA (mg) dans l'articulation 18 heures après l'injection de 0,3 ml de liquide physiologique tamponné (n=10).

Dans la Figure 9, les mêmes 13 résultats sont représentés comme la quantité totale de NIF-NaHA (mg) injecté, tracée en fonction de la vitesse de diffusion. Tous les résultats s'alignant bien sur la droite de corrélation calculée ($r=0,99$) que l'on peut extrapoler aux valeurs des contrôles. Donc la vitesse de diffusion ne dépend pas seulement de la quantité totale de NIF-NaHA injecté mais aussi du volume du solvant dans lequel il est dissout. Ceci est vrai au moins pour les concentrations comprises entre 2,25 et 2,0 mg/ml de NIF-NaHA et pour les volumes compris entre 0,2 et 1,0 ml. La quantité calculée de NaHA diffusé pendant une heure à partir de l'articulation par mg de NIF-NaHA injecté est de 0,046 mg. Ce résultat est exactement le même que celui obtenu dans toutes les expériences indépendantes au cours desquelles à des périodes différentes des dilutions et des volumes de solution de NIF-NaHA différents avaient été injectés. Cette constance dans les résultats obtenus confirme la validité des conclusions présentées.



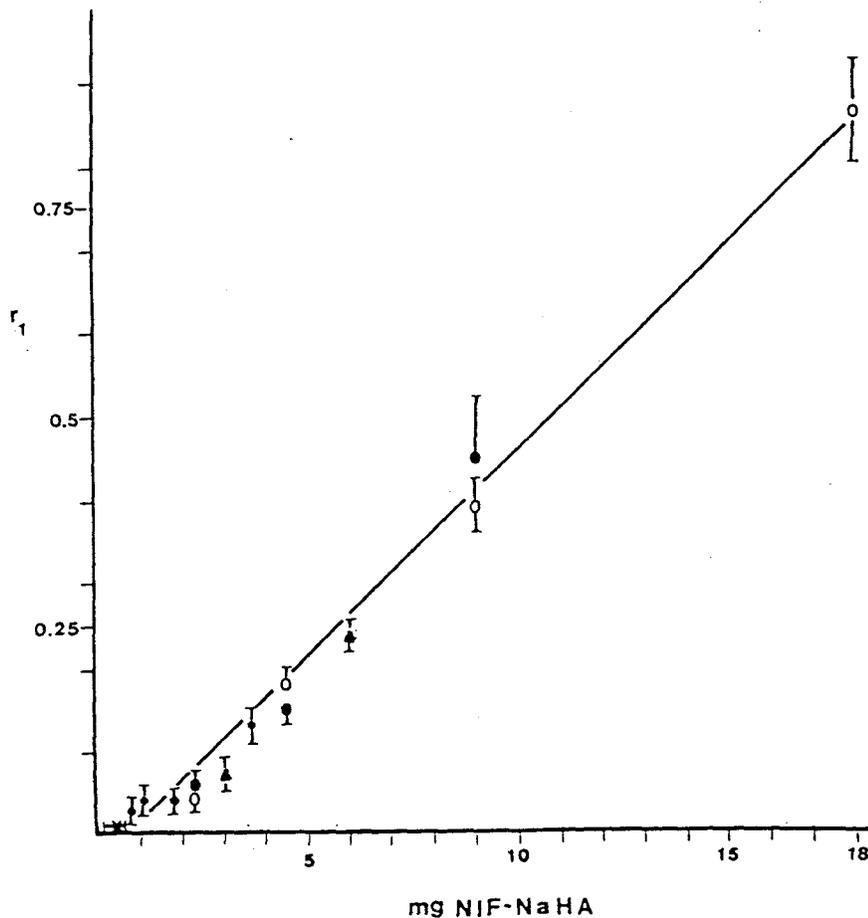


Figure 9. Quantité de NIF-NaHA (mg) injecté dans les articulations reportés contre la vitesse de diffusion (r_1) du NaHA de l'articulation du genou. r_1 est calculé après injection de volumes différents de NIF-NaHA à 10 mg/ml et après lavage à 18 heures de l'espace synovial. r_1 est exprimé en mg NaHA perdu pendant une heure de tout l'espace intra-articulaire. Les différents symboles représentent des volumes différents injectés: cercle ouvert (O), 1 ml; cercle plein (●), 0,5 ml; triangle plein (▲), 0,3 ml; étoile (*), 0,2 ml. Chaque point représente le résultat de quatre genoux (4). La croix et les barres horizontales (-X-) représentent la moyenne et l'erreur standard de la teneur en NaHA (mg) dans l'articulation après l'injection de 0,3 ml de liquide physiologique tamponné (n=10).



C. Temps de demi -vie du NIF-NaHA injecté
dans les articulations de lapins.

Plusieurs expériences ont été effectuées, afin de déterminer le temps de demi -vie, c'est à dire le temps que demande la moitié du NIF-NaHA injecté à diffuser en dehors de l'articulation. Pour ces expériences, nous avons utilisé 38 articulations dans lesquelles nous avons injecté 1 ml de solution de NIF-NaHA à 10 mg/ml, 34 articulations dans lesquelles nous avons injecté 0,3 ml de la même solution, et enfin 20 articulations dans lesquelles nous avons injecté une solution à 20 mg/ml. Donc, pour ces trois expériences, les articulations ont reçu respectivement, 10, 3 et 6 mg de NIF-NaHA. Après avoir procédé aux injections, nous avons remis les lapins dans leurs cages, où nous les avons laissé bouger librement et nous leur avons fourni de la nourriture et de l'eau ad libitum. A des périodes différentes entre 6 et 96 heures après l'injection, les lapins ont été sacrifié, leurs articulations immédiatement lavées et le NaHA contenu dans les lavages synoviaux déterminé. Les résultats sont reportés sur la Figure 10. Cette figure présente en logarithme la quantité de NaHA récupérée, en fonction du temps après l'injection de NIF-NaHA à trois différentes concentrations sous deux volumes différents. Les coefficients de corrélation (r) pour les droites statistiquement ajustées aux résultats des groupes d'injections de 3, 6 et 10 mg sont respectivement de: -0,91, -0,96 et -0,79. Ces résultats sont tous significatifs à un niveau de probabilité de 99%. Chacune de ces droites a une pente diffé-

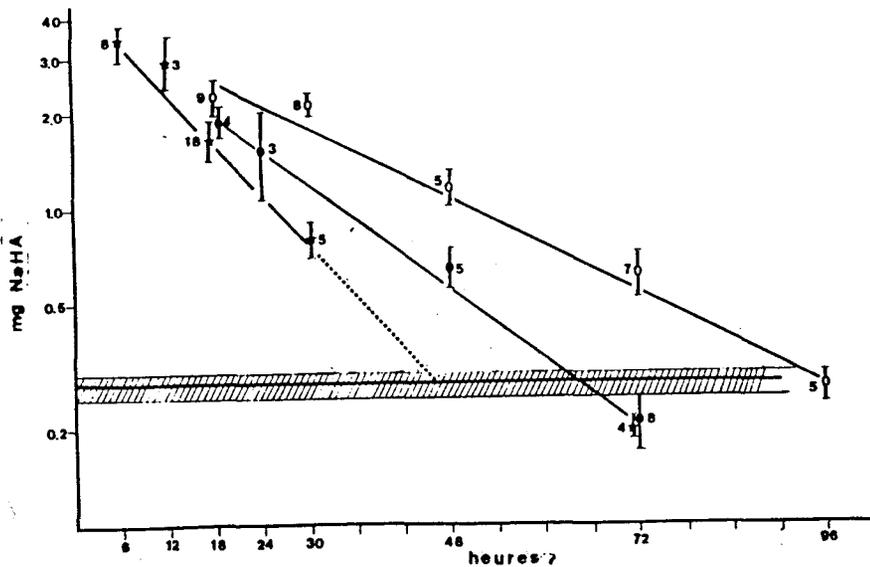


Figure 10. Le logarithme de la quantité de NaHA dosée dans l'articulation a été reporté contre le temps (heures) après les injections de 3 mg (cercle ouvert), 6 mg (cercles pleins) et 10 mg (astérix) de NIF-NaHA. Deux différentes concentrations de solution de NIF-NaHA ont été utilisées. Pour les doses de 3 et 10 mg nous avons utilisé une solution à 10 mg/ml et pour la dose de 6 mg une solution à 20 mg/ml. Dans tous ces cas, le volume injecté était de 0,3 ml. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne et les figures jouxtant chaque point. La ligne horizontale et l'aire rayée représente le contenu de NaHA (moyenne et erreur standard de la moyenne) des articulations avant l'injection. Nous avons calculé les lignes les mieux ajustées pour chaque groupe de résultats et le coefficient de corrélation r de Pearson étaient de $-0,91$ (3 mg), $-0,90$ (6 mg) et $-0,79$ (10 mg).



rente indiquant ainsi des vitesses de diffusion différentes. L'ordonnée de ce tracé correspond à l'ordonnée d'une réaction de premier ordre, c'est à dire au rapport de la concentration à un temps donné sur la concentration initiale ($\frac{c_t}{c_0}$), si l'on suppose que l'on crée un nouveau compartiment synovial en injectant un volume plus important que le volume normal de liquide synovial. Si l'on suppose de plus que ce nouveau volume créé reste constant, alors les changements dans la quantité de NaHA de ce nouvel espace, avec le temps peuvent être rendus équivalents aux changements de la concentration comme il est fait normalement dans les réactions de premier ordre. Par la suite, la différence dans les pentes des lignes indiquent une vitesse de diffusion différente pour chacun de ces compartiments nouvellement créés (Figure 10).

Le temps de demi-vie a été calculé pour chacune de ces doses à partir de la pente de ces lignes et les résultats sont respectivement 24, 16 et 12 heures. Ceci signifie que la vitesse de diffusion s'accroît, donc le temps de demi-vie raccourcit avec l'augmentation de la quantité de NIF-NaHA exogène injecté.

Afin de comparer le temps de demi-vie du NIF-NaHA injecté pendant cette longue période (18 - 96 heures), avec le temps de demi-vie de la période plus courte suivant l'injection (18 heures), nous avons procédé aux expériences suivantes. Nous avons injecté dans 48 articulations de lapins 0,25; 0,50; 0,75 et 1 ml de NIF-NaHA

à 10 mg/ml. Quelques uns des animaux ont été sacrifiés dans les 10 minutes suivant l'injection (résultat 0 heure) et les autres, 18 heures plus tard. Les articulations ont été lavées et la teneur en NaHA évaluée. Les résultats sont reportés dans le Tableau XVIII. Dans deux cas (injections de 0,25 et de 0,75 ml) la valeur de 0-heure a été évaluée à partir du résultat obtenu dans les autres groupes, en supposant que les pourcentages de perte du NIF-NaHA injecté étaient similaires. Le temps de demi-vie a été calculé en supposant que la diffusion du NaHA à partir de l'articulation suivait une réaction d premier ordre, comme il a été démontré pour les résultats des 6 - 96 heures (Figure 10). Les temps de demi -vie sont reportés sur le tableau XVIII, montrant encore que plus les doses sont larges plus le temps de demi -vie est court.

Tableau XVIII. Temps de demi-vie du NIF-NaHA exogène dans l'articulation du genou du lapin pendant les 18 premières heures suivant l'injection.

Quantité (mg) de NIF-NaHA injectée	Quantité (mg) de NaHA évaluée dans l'articulation.		$t_{\frac{1}{2}}$ hrs
	0 h	18 h	
2.5	1.8*	1.2 ± 0.2 (4)	24
5.0	3.1 ± 0.1 (5)	1.6 ± 0.2 (12)	19
7.5	4.7*	1.9 ± 0.3 (3)	14
10.0	5.2 ± 1.0 (5)	1.7 ± 0.2 (19)	11

* Valeurs calculées.

() Entre parenthèse - N° d'articulations.

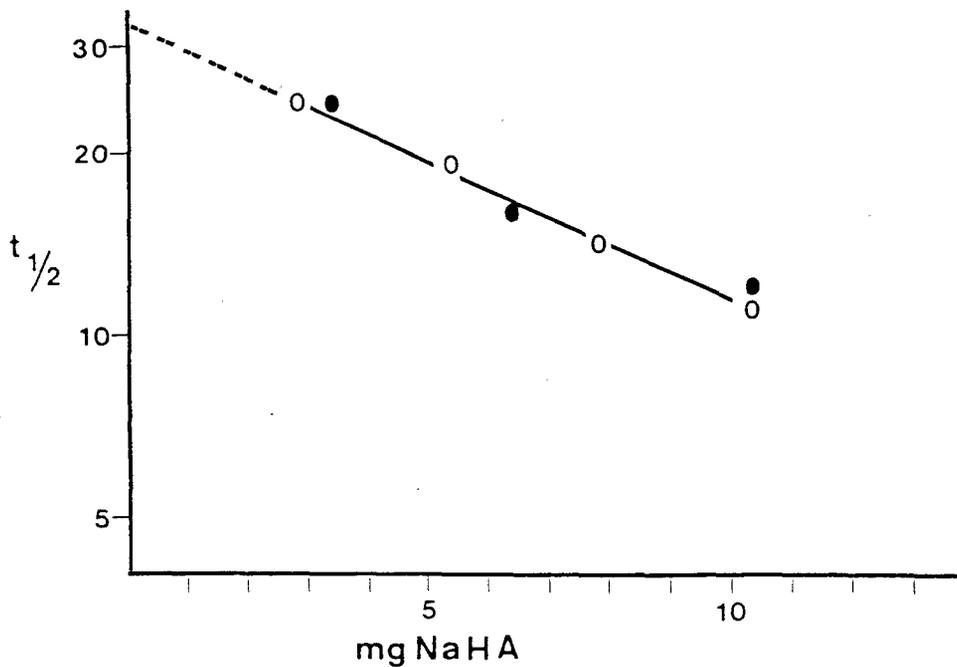


Figure 11. Quantité de NaHA (mg) présent dans l'articulation immédiatement après l'injection de NIF-NaHA reporté contre le temps d'une demie-vie en logarithme. Les cercles pleins représentent une expérience avec 3,0, 6,0 et 10,0 mg de NIF-NaHA injecté dans les articulations.; les cercles ouverts, une expérience avec 2,5; 5,0; 7,5 et 10,0 mg de NIF-NaHA injecté. Le temps d'une demie-vie pour la première expérience a été calculée (cercles ouverts) à partir des résultats présentés en Figure 10. Le temps d'une demie-vie pour la seconde expérience a été calculé (cercles pleins) à partir des résultats présentés en Figure 7. Dans tous les cas nous avons utilisé une solution de NIF-NaHA à 10 mg/ml. Le coefficient de corrélation r de Pearson pour la ligne la mieux ajustée était de $-0,99$ (significatif à un niveau de 99%).

Dans la Figure 11 les logarithmes des temps de demi-vie calculées pour les expériences précédentes sont reportées en fonction des quantités de NIF-NaHA injectées dans les articulations. Il existe une très bonne correspon-



dance entre les deux groupes de temps de demi-vie, i.e., celui calculé à partir des résultats pendant les 18 premières heures (cercles ouverts) et celui obtenu entre 6 et 96 heures après l'injection (cercles pleins). La ligne la mieux ajustée a été calculée à partir de ces résultats et possède un coefficient de corrélation extrêmement élevé et significatif ($r = -0,99$) indiquant une corrélation hautement significative entre les doses et les temps de demi-vie. La limite la plus élevée de cette ligne est la valeur extrapolée de 32 heures correspondant à aucune injection de NIF-NaHA exogène. Il est possible de supposer que c'est le temps de demi-vie du NaHA endogène dans l'articulation. La limite la plus basse de la courbe ~ 11 heures, représente probablement la vitesse de renouvellement la plus rapide (temps d'une demie-vie le plus court) dans l'articulation. Ce temps de demi-vie prévaut apparamment quand l'articulation est si l'on peut dire "saturée" avec l'NIF-NaHA exogène.

Le temps de demi-vie a également été calculée à partir des résultats présentés sur la Figure 9. Ce calcul a été basé sur la vitesse de diffusion au cours des 18 premières heures suivant l'injection, en supposant que c'était une réaction du premier ordre comme il a été démontré pour les vitesses de diffusion évaluées pour les longues périodes étudiées (Figure 10). Ces temps de demi-vie sont reportés (Figure 12) en fonction de quantité de NaHA (mg) présent dans l'articulation au temps 0, c'est à dire immédiatement après l'injection

de NIF-NaHA exogène. Par conséquent cette figure comprend également la quantité (0,3 mg) de NaHA endogène. La relation entre la quantité de NIF-NaHA injecté et le logarithme de temps de demi-vie est représentée par la droite statistiquement ajustée. Le coefficient de corrélation ($r = -0,89$) qui est significatif à un niveau de 99% indique que les 11 résultats correspondent également à cette ligne. La limite supérieure de cette ligne est la valeur extrapolée de 27 heures, ce

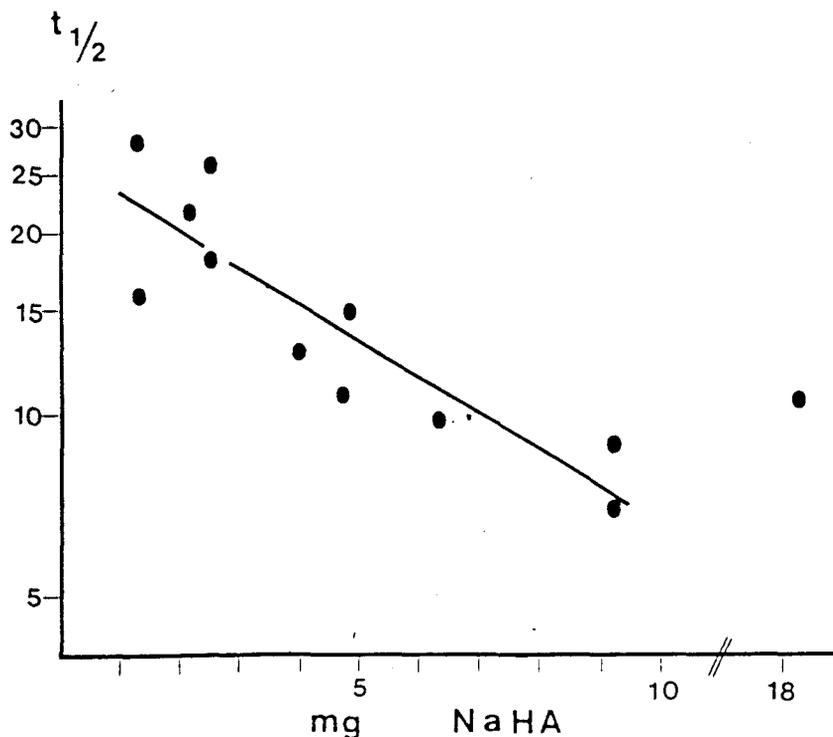


Figure 12. Quantité de NaHA (mg) présent dans l'articulation immédiatement après l'injection de NIF-NaHA est reporté contre le temps d'une demie-vie en logarithme. Chaque point représente le temps d'une demie-vie moyen déterminé pour trois ou quatre articulations. La concentration des solutions et des volumes injectés sont variables. Ces variations sont présentées en détail dans les Figures 8 et 9. Le point correspondant à 18,3 mg de NaHA contenu dans l'articulation n'a pas été inclus dans le calcul de la droite la mieux ajustée. Le coefficient de corrélation r de Pearson pour cette ligne est de $-0,89$.

qui peut être interprété comme le temps de demi-vie du NaHA endogène. Cette valeur s'accorde bien avec celle obtenue sur la Figure 11 (~ 32 heures). Etant dans les limites de l'erreur expérimentale qui est particulièrement élevée pour la Figure 12, ces deux temps de demi-vie ne sont pas significativement différents.

En conclusion, le temps de demi-vie calculée montre qu'avec l'augmentation de NIF-NAHA injectée, le temps de demi-vie décroît jusqu'à une valeur limite de "saturation" de 11 heures. En augmentant dans l'articulation normale la teneur en NaHA à peu près 3 à 4 fois au dessus du niveau normal, on obtient un temps de demi-vie du NIF-NAHA de 23 à 27 heures. Le temps de demi-vie du NaHA endogène est estimé à 27 -32 heures.

D. Temps de récupération du contenu en NaHA de l'articulation du genou du lapin après l'injection de NIF-NAHA.

Le temps que met le NaHA dans l'articulation pour retourner à son niveau normal a été calculé à partir des résultats présentés plus haut. Le temps de récupération est le laps de temps (en heures) compris entre l'injection et le temps que met le NaHA dans l'articulation à rejoindre le niveau précédant l'injection. Ce temps a été évalué à partir des résultats présentés dans la Figure 10. Pour 3 mg de NIF-NAHA, le NaHA avait atteint son niveau normal

96 heures plus tard. Pour 6 mg de NIF-NaHA injecté, le niveau normal avait été obtenu 72 heures plus tard. En conséquence la valeur interpolée utilisée a été de 64 heures. Pour 10 mg comme pour 6 mg de NIF-NaHA injecté le NaHA avait également retrouvé son niveau normal 72 heures plus tard. Il a été supposé que le niveau normal du NaHA peut être atteint plus tôt. Ce temps a été évalué en extrapolant la droite de la réaction du premier ordre jusqu'au point où les valeurs correspondant au niveau normal de NaHA étaient atteintes, c'est à dire après 47 heures. Dans la Figure 13 ces résultats (cercles pleins) sont reportés en fonction de la quantité de NIF-NaHA injecté dans l'articulation. Les autres résultats (cercles ouverts) représentent le temps de récupération calculés à partir des expériences représentées sur la Figure 11 (cercles ouverts). Connaissant la quantité de NaHA dans l'articulation au temps 0 et son temps de demi-vie, il a été obtenu le temps de récupération en extrapolant le niveau de la droite de la réaction du premier ordre au niveau normal de la teneur en NaHA dans l'articulation. Dans la Figure 13 il a été également représenté la droite la mieux ajustée calculée à partir des sept résultats. Cette droite montre une bonne concordance avec les points expérimentaux ($r = -0,97$). Les résultats présentés sur la Figure 13 montrent clairement qu'en augmentant les doses de NIF-NaHA injectés on raccourcit le temps nécessaire au NaHA à atteindre son niveau normal d'avant l'injection.

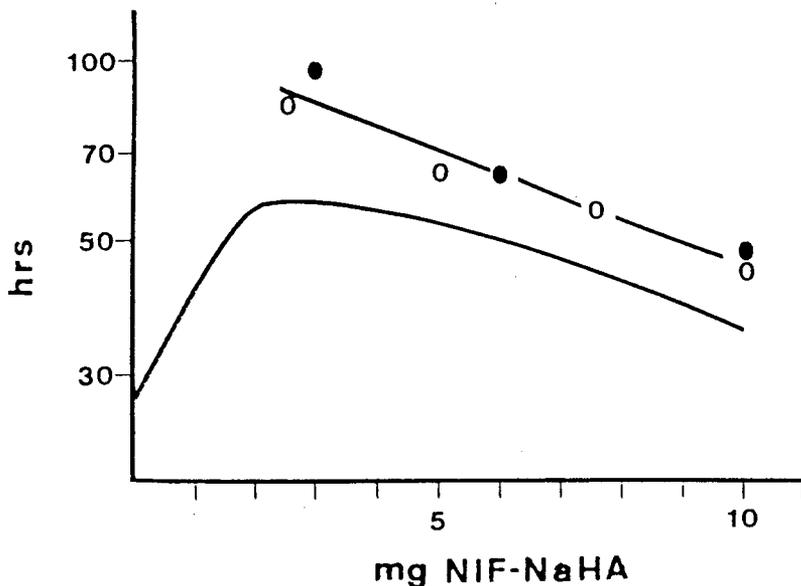


Figure 13. Quantité de (mg) NIF-NaHA injecté dans les articulations reportés en fonction de récupération en logarithme (heures). Les deux symboles représentent les résultats montrés sur la Figure 11. Le coefficient de corrélation r Pearson pour la droite la mieux ajustée est de $-0,97$. La courbe inférieure a été calculée à partir de la courbe la mieux ajustée de la Figure 12 (voir le texte pour les détails).

La courbe de la Figure 13 a été calculée à partir des résultats présentés sur la Figure 12 de la manière suivante. Les temps de demi-vie des doses variées de NIF-NaHA ont été calculées à partir de la ligne la mieux ajustée de la Figure 12, et le temps de récupération a été calculé à partir de ces points. La courbe pleine inférieure de la Figure 12 représente ces temps de récupération calculés. Il faut noter que cette ligne est parallèle à l'autre, mais donne des temps de récupération légèrement inférieurs ($\sim 23\%$). Le parallélisme de ces deux lignes indiquent qu'il s'agit d'un même mécanisme. Ce qui est plus important encore c'est que cette courbe atteint sa valeur maximale (58 heures)



pour une injection de NIF-NaHA comprise entre 2 - 3 mg. Au delà, elle descend vers les doses inférieures et par extrapolation à la dose 0 elle donne un temps de demi-vie de 27 heures. Cette valeur bien sûr, est la même valeur extrapolée obtenue à partir de même résultats dans la Figure 12. Ceci signifie que par définition le temps de demi-vie du NaHA endogène et le temps de récupération sont les mêmes à la dose 0.

Ces résultats indiquent clairement qu'une injection de 2 à 3 mg de NIF-NaHA dans l'articulation du genou du lapin produit un accroissement de la teneur en NaHA de l'articulation qui durera plus longtemps que pour des doses plus ou moins élevées (temps de récupération le plus long: ~58 heures). Cette injection de 2 à 3 mg de NIF-NaHA représente une augmentation de sensiblement 10 fois la teneur en NaHA de l'articulation.

IV. Métabolisme du NaHA exogène dans les articulations du carpe et du jarret des équidés

La différence existant entre les articulations des lapins et celles des équidés réside non seulement dans la taille mais aussi dans la teneur en NaHA. Le liquide synovial du carpe des équidés et des articulations du jarret contient de 0,2 à 1,0 mg de NaHA par ml, alors que la teneur en NaHA de l'articulation du lapin est de 3 à 4 mg/ml de liquide. C'est parce qu'il existe une grande différence dans le volume des espaces articulaires de ces deux espèces que la teneur totale en NaHA de ces articulations est également très différente. Ces différences permettent une étude comparative du métabolisme du NaHA exogène chez ces animaux. L'avantage le plus important de l'articulation du cheval réside dans le fait qu'il contient un volume élevé de liquide synovial (15 à 25 ml) qu'il est possible, relativement facilement, de ponctionner plusieurs fois sans causer trop de dommage à l'articulation et sans influencer le processus métabolique. Son désavantage est que la teneur totale en NaHA de l'articulation peut seulement être estimée mais non directement déterminée comme c'est le cas pour l'articulation du genou du lapin.

L'étude sur les articulations des équidés a été limitée à la détermination de la vitesse de diffusion et à la détermination du temps de demi-vie du NIF-NaHA exogène.

Comme les chevaux ne pouvaient être sacrifiés, le NIF-NaHA total contenu dans les articulations a été estimé à partir de la détermination des concentrations des liquides synoviaux et du volume du liquide synovial total de l'articulation comme il est reporté dans la littérature. Les résultats sont donnés soit en concentration de NaHA dans le liquide synovial ou en teneur total en NaHA de l'articulation.

A. Concentration en NaHA endogène des articulations du carpe et du jarret

Dans cette expérience (voir page 106), 5 chevaux ont été utilisés et les articulations du carpe et du jarret ont été étudiées. Comme la même articulation a été utilisée deux ou trois fois il était important d'établir les changements, s'il y avait lieu, de la teneur en NaHA. L'NIF-NaHA a été injecté dans les articulations seulement le premier, le quinzième et le trente-sixième jour de cette expérience. Après la dernière injection deux investigations ont été menées à bien: la première, cinq semaines plus tard, et la deuxième, 10 semaines plus tard. La concentration en NaHA a été déterminée à chaque fois que des échantillons de liquide synovial ont été prélevés. Les résultats sont présentés dans le Tableau XIX pour le carpe et dans le Tableau XX pour le jarret. Ces tableaux présentent également la programmation des injections de NIF-NaHA et des injections de SPT.

Tableau XIX Variation de la concentration en NaHA dans l'articulation du carpe pendant l'expérience.

Cheval		Articulation	Jours où les échantillons ont été prélevés.						NIF-NaHA en mg - jours :	NIF-NaHA Total injecté	Différence de concentration en NaHA (%)		
Nom	Age Sexe*		Poids (kg)	1	15	36	73	103			1	15	36
Apples	10 F	d	0.48	0.36		0.76	0.53	20	10		30	+ 36	+ 10
Dusty	7 C	g	0.54	0.50	0.16	0.73	0.44	5	5	20	30	+ 26	- 18
			0.63	0.54		1.12	0.85	5	5		10	+ 77	+ 34
Gay 5 Commander	390 C	g	0.93	0.70	0.41	0.50	0.47	10	40	40	90	- 46	- 49
		d	0.31	0.23		0.46	0.55	40	20		60	+ 48	+ 77
		g	0.26	0.28	0.25	0.36	0.33	(20)*	40	20	60	+ 28	+ 26
Truly Yours	390 F	d	0.85	0.23		0.34	0.48	20	10		30	- 60	- 43
		g	0.64	0.42	0.36	0.46	0.55	(20)*	(20)*	10	10	- 28	- 14
Binding 7 Agent	430 C	g	0.59	0.41	0.44	0.65	0.63	10	(20)*	40	50	+ 10	+ 6
		g	0.50	0.32		0.60	0.49	40	20		60	+ 20	+ 2

2.0 ml d'injection de SPT

d = droit ; g = gauche

* C = Castré

305
LILLE



Tableau XX Variation de la concentration en NaHA (mg/ml) dans l'articulation du jarret pendant l'expérience

Cheval		Articulation	Jours où les échantillons ont été prélevés.						NIF-NaHA injecté en mg - jours :	NIF-NaHA Total injecté	Différence de concentration en NaHA (%) entre 1er et 7 ^{ae} jour et 10 ^{ae} j.		
Nom	Age Sexe		1	15	36	73	103	1				15	36
Apples	10	d	0.22	0.22		0.37	0.27	10	20		30	+ 68	+ 22
	F	g	0.21	0.20	0.56	0.59	0.36	(40)*	60	20	80	+180	+ 71
Dusty	7	d	0.75	0.41		0.77	0.64	60	60		120	+ 2	- 14
	C	g	0.59	0.58		1.18	0.66	40	10		50	+100	+ 11
Gay 5 Commander	390	d	0.17	0.17		0.37	0.17	60	20		80	+117	0
	C	g	0.15	0.22	0.19	0.23	0.43	20	10	40	70	+ 53	+186
Truly Yours	390	d	0.41	0.22	0.14	0.39	0.55	20	40	20	80	+ 4	+ 34
	F	g	0.42	0.26	0.23	0.28	0.33	(40)*	(40)*	60	60	- 33	- 21
Binding Agent	430	d	0.48	0.18		0.37	0.48	40	(40)*		40	- 22	0
	C	g	0.48	0.20		0.58	0.58	10	40		50	+ 20	+ 20

d = droit ; g = gauche 2,0 ml d'injection de SPT.

* C = castré

Les résultats de ces deux tableaux montrent clairement que

- a) la concentration en NaHA dans les articulations varie considérablement d'un animal à l'autre. Il existe une certaine constance dans la concentration en NaHA d'une articulation donnée d'un bout à l'autre de de l'expérience. Par exemple la première expérience a montré que la concentration en NaHA était la plus basse pour les articulations du carpe et du jarret de Gay Commander, et que cette concentration est restée peu élevée par rapport aux autres articulations pendant toute la durée de l'expérience. De même un autre cheval, Dusty a présenté les valeurs les plus élevées pour ses deux articulations du jarret pendant toute la durée de l'expérience. Ce même cheval a présenté également, les valeurs les plus élevées la plupart du temps, pour l'articulation du carpe. Il est donc possible de conclure que la concentration de NaHA bien contrôlée pour une articulation donnée n'est pas affectée par des injections répétées d'NIF-NaHA exogène.
- b) La concentration en NaHA pour l'articulation du carpe, dans la majorité des cas est plus élevée que celle de l'articulation du jarret. La teneur en NaHA de ces deux articulations a été analysée au même moment 43 fois. Pour 8 cas seulement (18%) une teneur en NaHA a été trouvée moins élevée dans l'articulation du carpe que dans celle du jarret. Le premier jour

(jour 1) les échantillons prélevés des articulations de jarret et des 10 articulations du carpe ont donné respectivement une valeur moyenne de $0,41 \pm 0,06$ et $0,57 \pm 0,07$ mg/ml. A cause de la grande variété des valeurs, cette différence n'est pas significative (voir Tableau XIX et XX). En conséquence les différences des teneurs en NaHA ont été analysées entre les articulations des carpes droits et gauches et entre les articulations des jarrets droits et gauches du même cheval. Seulement pour une des paires d'articulations une concentration en NaHA a été trouvée moins élevée dans l'articulation du carpe que dans l'articulation du jarret: elle n'a pas été incluse dans l'analyse. Les 9 autres paires d'articulations présentaient entre les deux articulations une valeur différentielle de $0,20 \pm 0,04$ mg/ml. Cette différence est très significative ($p < 0,01$). Par conséquent il est possible de dire que pour le même animal, la teneur en NaHA de l'articulation du carpe est approximativement plus élevée de 50% que celle de l'articulation du jarret.

- c) Le poids de ces chevaux ne présentait aucune corrélation avec la teneur en NaHA des articulations. Il n'y avait aucune corrélation entre l'âge et le sexe et la teneur en NaHA. Toutefois la taille des échantillons est trop petite pour qu'il soit possible de tirer une conclusion définitive sur l'absence de corrélation.

B. Effet de la quantité de NIF-NaHA injecté
sur la vitesse de diffusion

La quantité de NaHA de l'articulation diffusée (perdue) pendant les premières 24 heures a été calculée en estimant la quantité totale (mg) de NaHA immédiatement après l'injection de NIF-NaHA et 24 heures plus tard. Ceci était possible puisque:

- a) la concentration en NaHA de l'articulation avant l'injection a été déterminée pour un échantillon de liquide synovial prélevé dans l'articulation.
- b) la quantité de NIF-NaHA injecté était connue.
- c) le volume de liquide synovial prélevé dans l'articulation avant l'injection était connu.
- d) la concentration en NaHA de l'échantillon de liquide synovial prélevé 24 heures après l'injection de NIF-NaHA a été déterminée.
- e) le volume total de liquide synovial dans les articulations du jarret et du carpe était connu (Ekman, Nilsson et Persson, 1980).

En basant sur ces connaissances, la quantité totale de NaHA dans l'articulation immédiatement après l'injection de quantité variées de NIF-NaHA a été déterminée par l'équation suivante:

$$m_H = C_0 (V_0 - V_a) + m_i$$

où : m_H = quantité (mg) de NaHA dans l'articulation immédiatement après l'injection de NIF-NaHA;

m_i = quantité (mg) de NaHA injecté comme NIF-NaHA

C_0 = concentration de NaHA dans l'articulation avant l'injection

V_0 = volume de liquide synovial (ml) dans l'articulation (15 ml dans le carpe et 25 ml dans le jarret)

V_a = volume de liquide synovial (ml) prélevé dans l'articulation avant l'injection.

La quantité de NaHA dans l'articulation 24 heures après l'injection de NIF-NaHA a été calculée par l'équation suivante:

$$m_{24} = C_{24} (V_0 - V_a)$$

où : m_{24} = quantité (mg) de NaHA dans l'articulation 24 heures après l'injection de NIF-NaHA

C_{24} = concentration de NaHA dans l'articulation 24 heures après l'injection de NIF-NaHA.

Ce calcul suppose que pendant les 24 premières heures le volume total de liquide synovial ne change pas. Il suppose de plus qu'il existe un état d'équilibre entre le NaHA synthétisé normalement dans l'articulation et le catabolisme du NaHA dans l'articulation. Autrement dit nous supposons par ce calcul que l'injection de NIF-NaHA n'affecte pas le métabolisme normal du NaHA. Nous supposons

qu'il se produit pendant les premières 24 heures un mélange complet entre le NaHA exogène et le NaHA endogène, et par conséquent que l'échantillon de liquide synovial prélevé après l'injection est représentatif de la concentration totale en NaHA du liquide comme pour l'échantillon prélevé avant l'injection.

La vitesse de diffusion ou perte en NaHA pour les premières 24 heures est exprimée en mg de NaHA diffusé en une heure par articulation. Elle a été calculée d'après l'équation suivante:

$$r_1 = \frac{m_H - m_{24}}{24}$$

Dans la Figure 14, r est tracé en fonction de la quantité (mg) de NIF-NaHA injecté. Pour toutes les injections, des solutions de NIF-NaHA à 10 mg/ml ont été utilisées. Dans l'articulation du carpe 5, 10 et 20 mg de NIF-NaHA ont été injectés et dans l'articulation du jarret 10, 20 et 40 mg de NIF-NaHA. Cette Figure montre que les vitesses de diffusion pour les deux articulations ne sont pas significativement différentes quand elles sont comprises dans les limites des quantités de NIF-NaHA injecté, c'est à dire moins de 20 mg pour le carpe et moins de 40 mg pour le jarret. En fait 40 mg de NIF-NaHA ont été injectés dans les cinq articulations du carpe et 60 mg dans les cinq articulations du jarret.

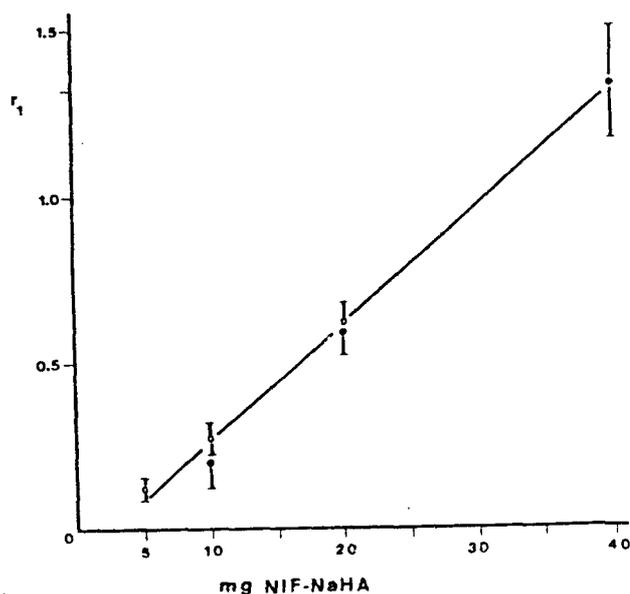


Figure 14 : La vitesse de diffusion (r_1) du NIF-NaHA à partir des articulations du carpe et du jarret du cheval est tracée en fonction de la quantité injectée. Les articulations du carpe sont représentées par les cercles ouverts et les articulations du jarret par les cercles pleins. La vitesse de diffusion est exprimée en mg de NaHA perdu pour l'articulation en une heure et pour le premier jour suivant l'injection de doses variées de NIF-NaHA. Le coefficient de corrélation pour la ligne la mieux ajustée est de 0,92 ($p < 0,01$).

Le résultat obtenu pour l'articulation du carpe était de $0,96 \pm 0,23$ mg (écart des résultats individuels: 0,71 - 1,50 mg). Le résultat obtenu pour l'articulation du jarret était de $1,88 \pm 0,14$ mg (écarts des résultats individuels 1,60 - 2,30 mg). L'erreur élevée fait qu'il est difficile d'évaluer correctement la relation des valeurs des deux doses élevées aux vitesses montrées sur la Figure 14. Néanmoins, il faudrait souligner qu'ils représentent une tendance évidente vers des vitesses de diffusion lente. Cela a été interprété comme un signe de saturation de l'articulation et par conséquent les deux résultats correspondants aux doses les plus élevées

n'ont pas été inclus dans la Figure 14.

Comme il n'y avait pas de différence significative entre les vitesses de diffusion des deux articulations, la ligne la mieux ajustée a été calculée à partir des deux. Le coefficient de corrélation ($r = 0,92$) indique une corrélation très significative ($p < 0,01$) entre la dose injectée et la vitesse de diffusion.

La relation linéaire entre la dose et la vitesse de diffusion montre également qu'en fonction de la dose injectée, 0,022 à 0,033 mg de NaHA diffuse en une heure et par 1 mg de NIF-NaHA injecté. Ceci signifie que 2,2 à 3,3% de la dose injectée est diffusée, ou perdu, chaque heure dès le premier jour suivant l'injection. Ce problème sera discuté ultérieurement et ces résultats seront comparés aux calculs similaires résultant d'études portant sur les lapins.

C. Taille moléculaire du NaHA dans le liquide synovial avant et après l'injection de NIF-NaHA exogène

La taille moléculaire du NaHA a été évaluée en déterminant la $[n]_{40}$ du NaHA à 40 $\mu\text{g/ml}$ (0,0004 d/dl).

Pour cela des échantillons de liquide synovial prélevé avant et à divers temps après l'injection de NIF-NaHA ont été utilisés. Le programme des opérations et les résultats sont reportés sur le Tableau XXI.

Tableau XXI. Viscosité $[\eta]_{40}$ du NaHA dans le liquide synovial du cheval avant et à divers temps après l'injection intra-articulaire de NIF-NaHA

Jours où les échantillons ont été prélevés.		Pré-injection	7	15	22	36	43	73
N° de Jours après l'échantillon précédent			7	15	7	21	7	37
Articulation du carpe.	Moyenne	6540	6510	6310	5800	6670	5730	4930
	Erreur standard	310	580	590	530	690	920	230
		10	7	7	10	5	5	10
	Signification		NS	NS	NS	NS	NS	< 0.01
Articulation du jarret.	Moyenne	6430	6380	5960	5320	7400	6680	5330
	Erreur standard	320	760	510	340	500	850	460
		10	10	9	9	5	5	10
	Signification		NS	NS	NS	NS	NS	< 0.05

La signification est calculée en comparant un échantillon avec la valeur de la pré-injection.

Il y a eu toutefois deux exceptions. A la fin de l'expérience (73 jours) et 37 jours après le premier traitement, une diminution de la viscosité de 17 à 23% a indiqué un changement léger mais significatif. ($p < 0,05$ et $< 0,01$). La seconde exception est présentée sur le Tableau XXII.

Tableau XXII Viscosité $[\eta]_{40}$ du NaHA dans le liquide synovial du cheval avant le 1 et 7 jours après l'injection de NIF-NaHA

Temps, jours		Préinjection	1	7
Articulation du jarret droit	Moyenne	6490	4790	6060
	Erreur standard	430	400	740
	n	5	5	5
	Signification		< 0.02	NS
Articulation du jarret gauche	Moyenne	6350		6690
	Erreur standard	540		780
	n	5		5
	Signification			NS

La signification est calculée en comparant un échantillon avec la valeur de la préinjection.

Dans les 24 heures après l'injection de 1 à 6 ml de NIF-NaHA dans l'articulation du jarret, les valeurs moyennes de la viscosité ont diminué. Sept jours plus tard elles sont revenues à la normale. Les articulations gauches et droites du même animal ont présenté les mêmes valeurs avant et 7 jours après l'injection.

Le degré de diminution de la viscosité dans l'articulation 24 heures après l'injection de 10 à 60 mg de NIF-NaHA a été analysé en supposant que cette baisse était causée par un effet de dilution du NIF-NaHA injecté dont la viscosité est plus basse (3200 cc/g) que celle du NaHA endogène. Comme la quantité de NaHA endogène varie dans les cinq articulations entre 3, 91 et 17,25 mg par articulation, les 10 à 60 mg de NIF-NaHA exogène injecté produisent de grandes différences dans la dilution.

L'effet de dilution (Δm dans la Figure 15) a été calculé par la formule $\frac{m_1 - m_{\text{end}}}{m_{\text{end}}}$ où m_1 est la quantité de NIF-

m_{end}

NaHA exogène en mg, et m_{end} le NaHA endogène en mg. Le

changement de la viscosité ($\Delta[\eta]_{40}$ dans la Figure 15) a été

calculé sur les mêmes bases par la formule $[\eta]_{40}^{\text{end}} - [\eta]_{40}^{24}$

$[\eta]_{40}^{\text{end}}$

où $[\eta]_{40}^{\text{end}}$ est la viscosité du NaHA endogène (à 40 $\mu\text{g/ml}$)

et $[\eta]_{40}^{24}$ la viscosité (à 40 $\mu\text{g/ml}$) du NaHA endogène et

exogène mélangée 24 heures après l'injection.

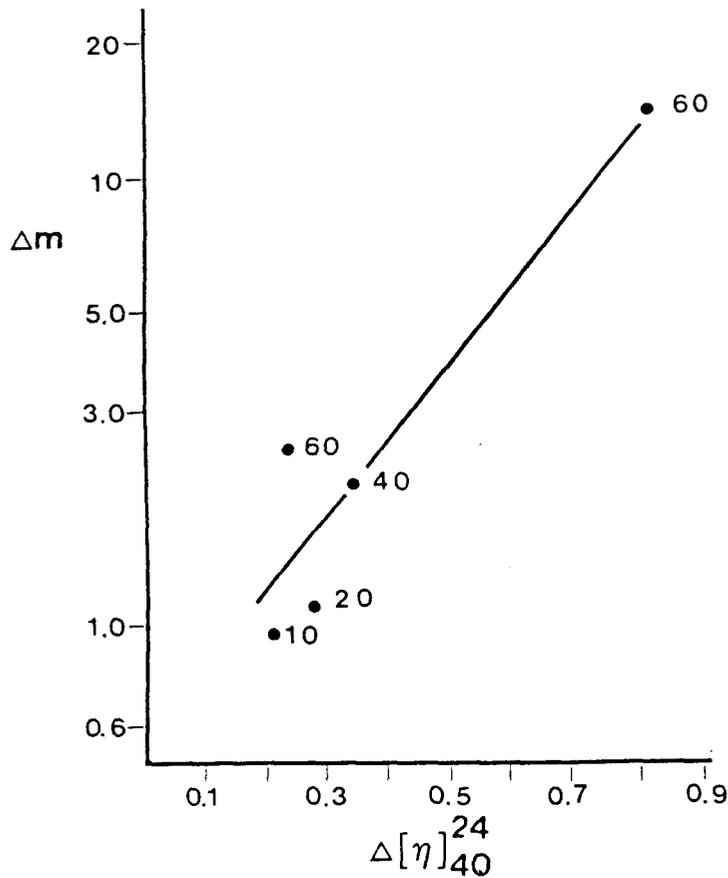


Figure 15 : Relation entre les logarithmes du changement de la teneur en NaHA de l'articulation du jarret après l'injection de NIF-NaHA et les logarithmes du changement de la viscosité du NaHA du liquide synovial. Les cinq points représentent les articulations des jarrets droits de cinq chevaux qui ont tous reçu des quantités différentes de NIF-NaHA, quantité inscrite à côté de chaque point. Voir texte pour l'explication de Δm et de $\Delta[\eta]_{40}^{24}$.

La Figure 15 montre que le log de Δm tracé une fonction de $[\eta]_{40}$ présente une relation linéaire avec la ligne la mieux ajustée dont $r = 0,92$ (signification: $< 0,02$). Par conséquent la baisse momentanée de la viscosité 24 heures après l'injection de NIF-NaHA dans l'articulation

est probablement causée par la dilution de NaHA endogène avec la solution de NIF-NaHA dont la viscosité est plus basse.

D. Teneur en protéine du liquide synovial
avant et après l'injection intra-
articulaire de solution physiologique
tamponnée de NIF-NaHA

La teneur en protéine du liquide synovial des articulations du carpe et du jarret des cinq chevaux a été évaluée avant le traitement intra-articulaire. Malgré de larges variations individuelles (carpes: 13,6 à 39,7 mg/ml, jarrets: 5,1 à 25,5 mg/ml) les moyennes étaient significativement différentes ($p < 0.05$). Les articulations du carpe contenaient approximativement une teneur en protéines double de celles des jarrets. (Tableau XXIII) Le même tableau présente également la teneur en protéine du liquide synovial après l'injection de 2,4 ml de solution physiologique tamponnée ou de 0,5 à 6 ml de NIF-NaHA (10 mg/ml). Dans les deux cas, les échantillons de liquide synovial ont été prélevés 1, 2, 3 et 7 jours après l'injection et les teneurs en protéines évaluées.

Tableau XXIII Comparaison des teneurs en protéines (mg/ml) des liquides synoviaux des chevaux après l'injection de solution physiologique tamponnée et de NIF-NaHA

	Injection	Pré-injection	N° de jours après l'injection			
			1	2	3	7
Articulation du carpe.	0.5 - 4 ml NIF-NaHA n = 8-10	24.7 ± 2.9	34.9 ± 3.0	29.3 ± 3.0	31.9 ± 3.8	36.7 ± 3.7
	2 ml SPT n = 4	21.9 ± 3.0	45.4 ± 5.6	31.9 ± 7.8	38.4 ± 12.8	25.8 ± 5.5
Articulation du jarret.	1 - 6 ml NIF-NaHA n = 8-10	12.8 ± 2.0	22.9 ± 4.7	31.9 ± 5.3	26.2 ± 4.4	19.5 ± 3.4
	4 ml SPT n = 4	18.3 ± 5.2	20.2 ± 7.2	35.0 ± 8.2	34.9 ± 6.3	26.8 ± 8.8

Les résultats montrent clairement que les manipulations intra-articulaire (arthrocenteses) et que les injections soit de SPT soit de NIF-NaHA produisent une augmentation de la teneur en protéines. Il est impossible de dire à partir des résultats disponibles, si un maximum dans l'accroissement a été atteint. Mais l'on doit se rappeler que chaque prélèvement d'échantillon constitue une nouvelle manipulation intra-articulaire. A cause des larges variations individuelles, les groupes, tels qu'ils sont présentés sur le Tableau XXIII, ne présentent aucune différence significative entre le premier et le septième jour suivant l'injection.

Le 15ème jour de l'expérience, de nouveau, des injections de différents volumes du NIF-NaHA ont été faites dans 8 articulations du carpe et du jarret. La teneur en protéines s'est de nouveau élevée au dessus du niveau précédant l'injection (Tableau XXIV)

Tableau XXIV Teneur en protéine des échantillons de liquide synovial des articulations du carpe et du jarret, prélevés après la deuxième et troisième injection de NIF-NaHA

N° de jours suivant début de l'expérience.	Articulation du carpe - protéine mg/ml.			Articulation du jarret - protéine mg/ml.		
	Moyenne	Erreur standard	N° d'articulations	Moyenne	Erreur standard	N° d'articulations
15 *	41.1	3.2	8	19.8	2.4	8
16	60.0	4.3	8	37.1	5.9	8
17	42.3	4.4	8	38.3	4.4	8
18	32.6	3.5	8	32.9	5.3	8
22	37.2	3.9	8	32.0	4.4	8
36 *	25.0	4.3	5	17.9	2.8	4
37	53.4	8.9	5	20.4	7.9	4
38	50.0	5.5	5	35.4	6.2	4
39	41.9	6.6	5	31.6	6.4	4
43	47.2	3.2	5	23.8	8.3	4

* Pour cette articulation nous avons injecté 2 à 6 ml de NIF-NaHA (10 mg/ml). L'échantillon de liquide synovial a été prélevé avant l'injection.

Cette augmentation est significative pour les deux articulations ($p < 0,01$). La semaine suivante, la teneur en protéine est restée élevée, et les articulations ont été ponctionnées 5 fois. Deux semaines se sont écoulées avant de recommencer les injections. Pendant cette période de deux semaines, la teneur en protéine est descendue significativement ($p < 0,01$ pour les deux articulations) à un niveau similaire au niveau normal

(Tableau XXIV - 36 jours). Cette fois, cinq articulations de carpe et 5 articulations de jarret ont été utilisées pour y injecter 1 à 4 ml (carpe) et 2 à 6 ml (jarret) de NIF-NaHA. 24 heures après l'injection, la teneur en protéines s'est considérablement élevée, même si la signification n'a pu être prouvée à cause du nombre peu élevé d'échantillons et des grandes variations individuelles. Pendant 7 jours suivant cette période (36 - 43 jours) comme dans les deux cas précédents, cette augmentation de la teneur en protéine ne présentait aucune variation significative.

Tableau XXV Teneur en protéines du liquide synovial de 5 articulations de jarret de cheval au cours d'une expérience de 43 jours

Jours	Binding Agent (gauche)		Apple (gauche)		Gay Commander (gauche)		Truly Yours (gauche)		Truly Yours (droite)	
	ml	Protéine mg/ml	ml	Protéine mg/ml	ml	Protéine mg/ml	ml	Protéine mg/ml	ml	Protéine mg/ml
P*	1H	13.3	4B	25.5	2H	19.4	4B	8.1	2H	6.1
1		39.7				22.2		9.5		26.1
2				41.8		27.6		10.6		25.6
3		44.1		38.8		23.8		16.5		19.3
7		38.8		35.5		19.3		9.3		14.7
15*	4H	10.5	6H	33.5	1 H	13.7	4B		4H	22.5
16		17.3		63.5		39.0				33.6
17		17.5		56.7		40.4		44.8		48.7
18		11.2		55.4		29.9		44.8		17.5
22		14.4		32.2		28.5		40.3		41.6
36*			2H	15.1	4 H	24.0	6H	11.7	6H	20.8
37				27.4		31.3		12.2		50.8
38				17.2		44.9		41.7		37.6
39				16.7		46.3		26.0		37.2
43				9.9		41.3		34.7		9.4

* - La concentration en protéine a été déterminée sur des échantillons prélevés avant l'injection.

P - indique des échantillons prélevés avant l'injection.

H - indique une injection de NIF-NaHA (10 mg/ml); chiffre = les mls

B - indique une injection de SPT; chiffre = les mls injectés.

Quelques informations additionnelles ont été obtenues en étudiant la séquence des variations de la teneur en protéine pour une articulation particulière. Les études de 5 articulations du jarret pendant les 43 jours de l'expérience sont reportés sur le Tableau XXV.

De l'analyse de ces cinq cas nous avons tiré les conclusions suivantes:

- 1) Que ce soit des injections de solutions physiologique tamponnée ou de NIF-NaHA le résultat est le même: il ne reste dans l'articulation qu'une concentration très basse de protéine (Binding Agent et Truly Yours).
- 2) Il ne semble pas y avoir de corrélation entre la concentration en protéine et le nombre d'injections. Par exemple, pour Apple la concentration était plus basse après la troisième injection qu'après la première ou la seconde. Alors que pour Binding Agent la concentration en protéine était plus basse après la seconde injection qu'après la première.
- 3) Dans la plupart des cas, le laps de temps de deux semaines, entre le dernier échantillonnage (7 et 22 jours) et l'injection suivante (15 et 36 jours) a produit une baisse considérable de la concentration en protéine.

4) Même après 15 manipulations intra-articulaires sur une période de 6 semaines (qui incluait 3 injections), la concentration en protéine est restée normale (Apple et Truly Yours).

Il est nécessaire de souligner finalement que l'articulation du jarret n'a pas seulement une concentration en protéine moins élevée mais présente également moins souvent que l'articulation du carpe, une augmentation de la concentration. Ceci est probablement dû au fait que l'articulation du jarret est plus large et plus facilement accessible, et ressent moins le traumatisme de l'arthrocentèse.

E. Temps de demi-vie du NIF-NaHA injecté dans l'articulation du cheval

Afin d'évaluer le temps de demi-vie du NIF-NaHA injecté dans l'articulation, il faudrait d'abord établir dans quelles conditions, si conditions il y a, la diffusion du NaHA exogène suivait une cinétique du premier ordre. La Figure 16 montre les changements de concentration en NaHA dans l'articulation du carpe en fonction du temps après l'injection de différents volumes de solution de NIF-NaHA à 10 mg/ml.

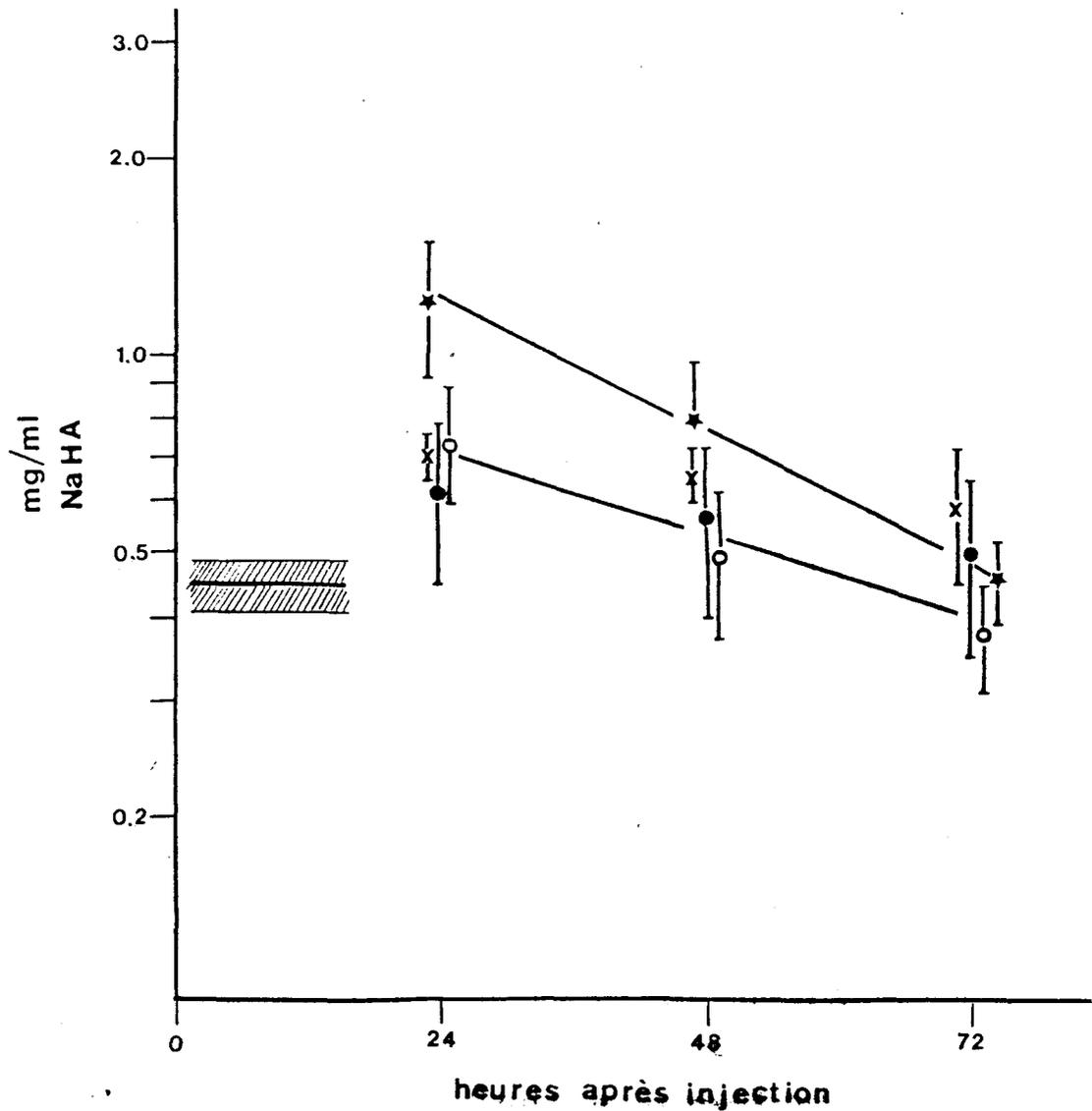


Figure 16 : Articulation du carpe. Concentration (mg/ml) en NaHA à des périodes différentes après l'injection de NIF-NaHA dans l'articulation. Les différents symboles représentent la quantité injectée dans l'articulation : astérisque, 40 mg (4 ml) ; cercle ouvert, 20 mg (2 ml) ; cercle plein, 10 mg (1 ml) ; croix 5 mg (0,5 ml). Les symboles montrent la valeur moyenne à chaque point avec l'erreur standard de la moyenne (barres verticales) (n = 4-6). La concentration en NaHA dans les articulations avant l'injection de NIF-NaHA est indiquée par les lignes horizontales à gauche du graphique (ligne centrale : moyenne, aire rayée : erreur standard de la moyenne).

BUS
LILLE

Aucune différence significative n'a été trouvée entre les différents groupes représentant différentes doses. Néanmoins deux droites les mieux ajustées ont été calculées, la première pour 5, 10 et 20 mg de NIF-NaHA injecté (ligne inférieure sur la Figure 16) et la

deuxième pour 40 mg injecté (ligne supérieure de la Figure 16). Ces deux lignes droites ont des pentes légèrement différentes mais la différence n'est pas significative.

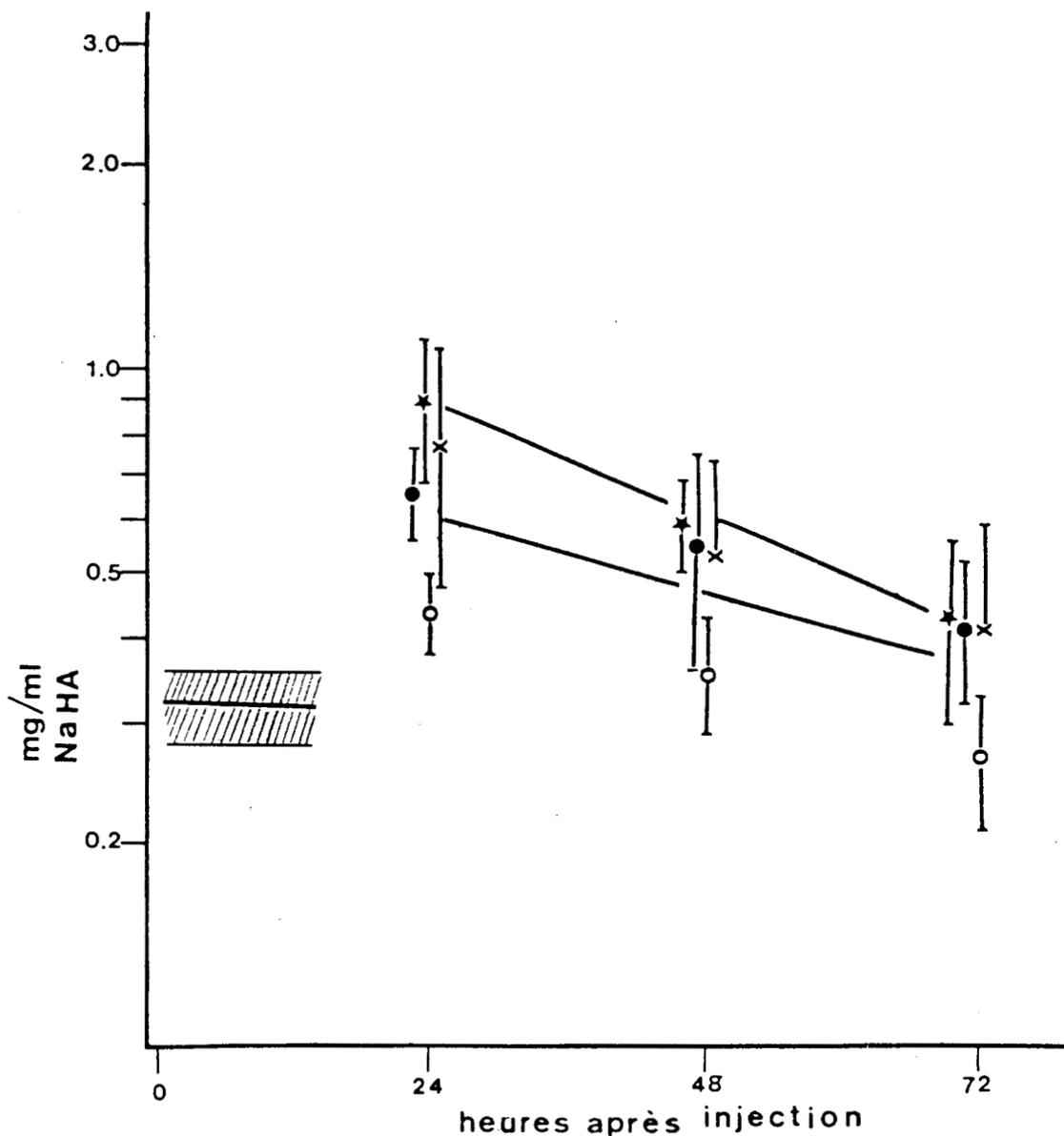


Figure 17 : Articulation du jarret. Concentration (mg/ml) en NaHA à des périodes différentes après l'injection dans l'articulation de NIF-NaHA. Les différents symboles représentent les quantités injectées dans l'articulation ; astérisque, 60 mg (6 ml); croix, 40 mg (4 ml); cercle ouvert, 20 mg (2 ml); cercle plein, 10 mg (1 ml). Les symboles montrent la valeur moyenne à chaque point avec l'erreur standard de la moyenne (barres verticales) (n = 4-6). La concentration en NaHA dans les articulations avant l'injection de NIF-NaHA est indiquée par les lignes horizontales à la gauche du graphique. (Ligne centrale : moyenne ; aire rayée erreur standard de la moyenne).

La Figure 17 représente un tracé similaire pour les résultats obtenus avec les articulations des jarrets. Ici aussi la droite la mieux ajustée pour 60 mg a été calculée séparément des trois autres, 10, 20 et 40 mg. Les pentes de ces deux droites ne présentent pas de différences significative.

Le temps suivant l'injection de NaHA exogène a été également été tracé en fonction du logarithme de C_t/C_{end} , où C_t est la concentration à un temps donné après l'injection, et C_{end} la concentration de NaHA endogène dans l'articulation avant l'injection. Les graphiques qui ne différaient pas substantiellement des Figures 16 et 17 ne sont pas représentés.

Le $\log C_t/C_{end}$ en fonction de t montrait une relation linéaire avec un très bon coefficient de corrélation ($r = -0,97$ pour le carpe et $r = -0,96$ pour le jarret), mais les valeurs légèrement plus élevées et les pentes quelque plus importantes pour les doses les plus élevées (60 mg pour le jarret et 40 mg pour le carpe) n'étaient pas significativement différentes de celles des doses moins élevées.

Il a été conclu, que pour ces deux articulations la diffusion (perte) du NaHA exogène suit une cinétique du premier ordre. Les constantes de vitesses sont les mêmes pour les doses les moins élevées des deux articulations. Les temps de demi-vie calculées à partir de ces résultats pour les deux articulations en utilisant les trois doses les moins élevées, étaient de 60 ± 10 heures.

Il est nécessaire de souligner, que pour les 24 premières heures suivant l'injection de NIF-NaHA exogène, la concentration en NaHA du carpe était de l'ordre de 0,6 - 0,8 mg/ml et celle du jarret, de 0,4 - 0,8 mg/ml. Ce sont les valeurs moyennes pour les trois doses les moins élevées. La concentration calculée immédiatement après l'injection (C_i) de ces trois doses dans l'articulation du carpe était de 1 - 3 mg/ml et dans le jarret de 0,7 - 2,7 mg/ml. Comme le liquide synovial n'a pu être prélevé pendant ces premières 24 heures, nous ne savons pas ce qui s'est passé pendant cette période initiale. Mais en supposant que le processus de diffusion suit également une cinétique du premier ordre, il est possible pour cette période de calculer le temps de demi-vie. Ce calcul a été fait pour les deux articulations en utilisant les trois doses les plus élevées c'est à dire 10, 20 et 40 mg pour le carpe et 20, 40 et 60 mg pour le jarret. Le temps de demi-vie varie entre 12 et 14 heures. Ceci signifie que pendant ce temps, la moitié du NIF-NaHA injecté disparaît de l'articulation. Cela signifie également que le mécanisme responsable de la diffusion est différent pendant les premières 24 heures de celui des jours suivants.

V. Hyaluronate de sodium exogène à la surface du cartilage et dans le tissu synovial du lapin

Pour décider combien de NIF-NaHA exogène peut pénétrer dans ou peut être absorbé par les tissus limitant l'espace synovial, la surface du cartilage et le tissu synovial ont été analysés à des temps différents après injection intra-articulaire de NIF-NaHA.

A. Surface du cartilage

Dans cette expérience, 110 genoux de lapin ont été étudiés. L'épongeage de la surface du cartilage a été effectué comme il est décrit dans Méthodes. Les différences morphologiques entre les cartilages non-traités, éponnés et lavés sont montrées dans la Figure 18, 19 et 20. Les sections de la surface articulaire du cartilage non-traité (condyle fémoral) ont montré une zone superficielle d'1 μm d'épaisseur contenant une surface amorphe granulaire entourée et attachée par un réseau de collagène (Figure 18). En-dessous de cette couche superficielle, il y a une deuxième couche de 2 μm , contenant des filaments de collagène plus minces que ceux qu'on trouve dans les zones plus profondes. Cette deuxième couche contient aussi quelques particules granulaires (Figure 18).

Après le lavage de l'articulation avec SPT par la méthode décrite afin de recueillir le NaHA de l'articulation, la morphologie de la surface du cartilage s'est trouvée légèrement modifiée. La Figure 19 montre un échantillon

représentatif d'un condyle fémoral fixé de la même façon que les tissus représentés sur la Figure 18.

La différence essentielle est la couche supérieure d'1 μm d'épaisseur, qui est plus lâche jusqu'à environ 1,5 μm de profondeur. Cette couche détachée contient toujours du matériel granulaire, qui semble être attaché à de fins filaments. En-dessous de cette couche, la deuxième couche de 2 μm apparaît essentiellement identique mais ne contient pas de matériel granulaire entre les fins filaments de collagène. Les fibrilles de collagène apparaissent légèrement plus épaisses. La différence dans l'épaisseur des fibrilles de collagène dans cette deuxième couche et dans les couches plus profondes n'est pas aussi nette que l'image représentée sur la Figure 18 le suggère. Les différences morphologiques entre la Figure 18 et 19 montrent que le lavage articulaire n'a pas éliminé la couche supérieure de 1 μm , mais l'a altérée suffisamment pour que l'on soit obligé d'admettre qu'une substance a été éliminée au cours du lavage de cette couche.

La Figure 20 montre une coupe transversale représentative d'un condyle fémoral épongé. La couche supérieure de 1 μm n'est pas visible. Une observation attentive des fibrilles de collagène indique que la plupart des fines fibrilles de collagène de cette deuxième couche ont été éliminées. Il faut conclure que l'épongeage enlève certainement la couche supérieure de 1 μm et une bonne partie de la deuxième couche de 2 μm . Ainsi, les éponges doivent contenir toutes les



Figure 18. Surface synoviale (à droite) du cartilage recouvrant le fémur du genou du lapin, fixée dans le glutaraldéhyde tamponné sans traitement préalable.



Figure 19. Même zone que celle montrée sur la Figure 18, mais fixation effectuée après que l'espace synovial ait été lavé pour déterminer le taux de NaHA dans la cavité articulaire.



Figure 20. Surface synoviale du cartilage épongé sans lavage préalable. Même zone et même fixation que dans les figures précédentes.



substances qui sont présentes dans ces 2 - 3 μm d'épaisseur de surface de cartilage. Les éponges ont été analysées seulement pour leur teneur en hyaluronate, et c'est pourquoi nous ne pouvons pas émettre des hypothèses sur d'autres substances qui pourraient être présentes dans ce matériel éliminé par épongeage. Des expériences sont encore en cours pour éclaircir ce point.

Il est intéressant de comparer la section du même cartilage après action de l'hyaluronidase (β - 1-3 hyaluronate hydrolase de sangsue). Le bout distal du fémur a été libéré par section du reste du fémur et a été suspendu avec les condyles vers le bas dans une solution contenant l'enzyme (SPT contenant 0,2 mg/ml d'enzyme) d'une façon telle qu'environ 3 mm du bout du fémur a été immergé dans la solution. On a fait attention à ce que la surface à fixer pour l'étude au microscope électronique ne soit jamais touchée. Après deux heures d'incubation à 37° dans une chambre humide, avec une douce agitation sur agitateur magnétique de la solution d'enzyme, la surface a été lavée par immersion du cartilage dans du SPT. Ensuite, le cartilage a été fixé pour des études de microscopie électronique.

La Figure 21 a et b montre clairement la similitude de la morphologie de cette coupe de cartilage traitée avec celle obtenue après épongeage (Figure 20). La couche supérieure de 1 μm d'épaisseur et la plus grande partie de la deuxième couche ont disparu pendant l'incubation avec l'enzyme (Figure 21 a), et au cours du lavage qui l'a suivi (Figure 21 b). Il faut souligner que les contrôles,



Figure 21a. Les surfaces non-traitées sont plongées dans l'acide hyaluronique hydrolase (voir détails dans le texte). Cette figure montre une surface représentative après traitement enzymatique et sans lavages. Même zone et même fixation que les figures précédentes.

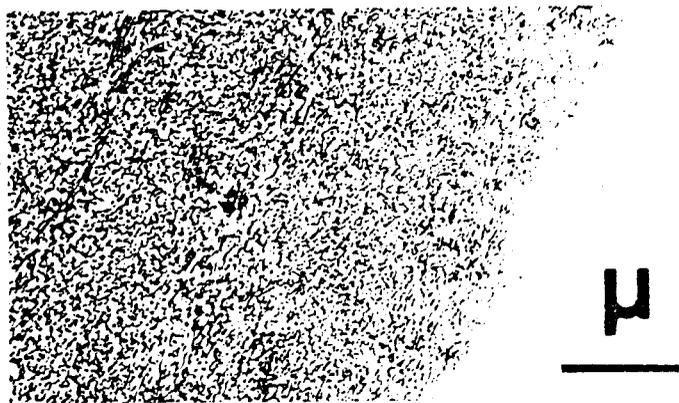


Figure 21b. Même traitement que celui sur la Figure 21a, mais la surface du cartilage a été lavée intensément avec SPT après traitement enzymatique. Même zone et même fixation que les figures précédentes.



c'est-à-dire l'incubation et le lavage effectués de la même façon mais en absence d'enzyme, ont donné des images tout à fait similaires à celle des contrôles montrés dans la Figure 19. Ainsi, nous devons conclure que l'enzyme hydrolysant spécifiquement l'hyaluronate enlève la couche superficielle d'une façon comparable à l'épongeage. Dans ces images de microscopie électronique, on ne peut pas voir l'hyaluronate ou les protéoglycannes, parcequ'ils ne se colorent pas avec les colorants métalliques utilisés pour la microscopie électronique. La substance filamenteuse granulaire à la surface du cartilage n'est pas de l'hyaluronate ou des protéoglycannes, mais plutôt une protéine qui est retenue dans les mailles de l'hyaluronate. La constatation que la couche de 2 - 3 μm à la surface du cartilage peut être sélectivement enlevée avec une enzyme clivant spécifiquement l'hyaluronate suggère que cette structure est stabilisée et retenue par un réseau de NaHA. Quand on enlève le NaHA par une digestion enzymatique, toute la couche est éliminée. Nous ne pouvons pas encore dire si le collagène est aussi éliminé en même temps ou s'il reste sur place dans une conformation quelque peu contractée.

Tableau XXVI Teneur en NaHA des articulations et de la surface du cartilage à des temps différents après injection de NIF-NaHA

Articulation lavée avant l'épongeage.	Avant l'injection	Après l'injection		
		immédiatement	6 heures	18 heures
non (n)	66 ± 6 (20)	-	529 ± 39 (10)	290 ± 115 (10)
oui (n)	18 ± 4 (15)	112 ± 24 (8)	153 ± 17 (8)	51 ± 15 (12)

Les chiffres indiquent μ g NaHA / articulation.

0,5 ml du NIF-NaHA (10 mg/ml) injecté.

(n) indique combien de genoux ont été utilisés dans chaque groupe.

La teneur en NaHA de la surface du cartilage est inférieure après lavage de l'espace synovial à la valeur avant lavage (Tableau XXVI). la différence est de 46,6 μ g par articulation. C'est-à-dire que le lavage articulaire enlève les deux tiers de l'hyaluronate qui adhère à la surface. Après injection de 5 mg de NIF-NaHA exogène, le NaHA adhérent à la surface du cartilage a été considérablement augmenté . Avant lavage la teneur en NaHA du cartilage articulaire est 3 à 5 fois supérieure à celle avant l'injection.

Tableau XXVII A Teneur en NaHA de l'articulation et de la surface du cartilage 18 heures après l'injection de quantités variables de NIF-NaHA

	Avant l'injection	18 h. après l'injection du NIF-NaHA (mg par artic.)			
		2.5	5.0	7.5	10.0
Articulation	250 ± 20	1200 ± 200	1580 ± 250	1880 ± 270	1700 ± 190
Surface du cartilage *	18 ± 4	60 ± 20	51 ± 15	60 ± 30	130 ± 40
n	15	4	12	4	19

* Une fois que le liquide synovial a été lavé de l'articulation.
Tous les chiffres cités ci-dessus représentent µg NaHA prélevé du lavage de l'articulation ou par épongeage du cartilage de l'articulation d'un genou.

Dans d'autres expériences, le NaHA de la surface du cartilage a été collecté après lavage de l'articulation. Ceci a été effectué 18 heures après l'injection intra-articulaire de quantités variables de NIF-NaHA (2,5 à 10 mg). La teneur en NaHA des lavages articulaires (Tableau XXVII A) indique une vitesse d'exportation similaire à celle montrée sur la Figure 7. La quantité de NaHA collectée à la surface du cartilage après lavage de l'espace synovial est la même après injection de 2,5, 5 ou 7,5 mg de NIF-NaHA. Après l'injection de 10 mg de NIF-NaHA, la valeur moyenne a été plus élevée (130 ± 40 µg), mais ceci n'est pas significativement différent des autres échantillons. Ainsi la surface du cartilage est saturée déjà après l'injection de 2,5 mg de NIF-NaHA. C'est-à-dire que les quantités supérieures à 2,5 mg de NIF-NaHA injecté dans l'articulation n'augmentent pas davantage la teneur en NaHA de cette couche

superficielle du cartilage. Ceci est vrai pour les 18 heures au moins pendant lesquelles le phénomène a été étudié.

En conclusion, l'injection intra-articulaire de NIF-NaHA a augmenté d'une façon significative la teneur en NaHA de la surface du cartilage; cette augmentation a atteint une saturation déjà à 2,5 mg de NIF-NaHA injecté par articulation.

B. Tissu synovial

La teneur en NaHA du tissu synovial (voir Méthodes, page 132) avant et après injection de NIF-NaHA a été étudiée sur 27 genoux de lapin. La teneur en NaHA dans l'articulation du genou normal dans ce groupe a été de $0,43 \pm 0,04\%$ de poids sec de tissu (Tableau XXVII B). Après une injection de NIF-NaHA (1 ml d'une solution de 10 mg/ml), le tissu synovial entre 6 et 30 heures contient des quantités de NaHA significativement supérieures à celles trouvées avant l'injection. 72 heures après injection, la teneur en NaHA est revenue à la normale. Ceci indique que l'injection de NIF-NaHA entre dans le liquide synovial et reste présent au moins pendant trente heures.

Tableau XXVII B Teneur en NaHA (% de poids sec) du tissu synovial du genou du lapin après injection intra-articulaire de 10 mg (1 ml) NIF-NaHA

	Délai après l'injection (heures)				
	Témoin	6	18	30	72
NaHA	0.43 *	1.14	1.03	1.05	0.5
% du poids sec du tissu	± 0.04	± 0.23	± 0.21	± 0.21	± 0.04
n	8	4	7	4	4

* La Moyenne ± l'erreur standard de la moyenne.

VI. Effet d'une pathologie induite chirurgicalement sur le métabolisme du NaHA endogène et exogène

A. Introduction d'une aiguille dans l'espace intra-articulaire

Comme contrôle le plus simple de toutes les expériences comportant des injections, une aiguille stérile a été introduite dans l'articulation mais sans faire d'injection. Cette expérience a été conçue pour servir d'expérience-témoin à deux types de modèles expérimentaux: la lésion aiguë, dans ce cas l'aiguille n'a été insérée qu'une fois, et la lésion chronique, pour laquelle l'aiguille a été insérée deux fois par semaine pendant une période prolongée. Les deux expériences-témoin suivantes ont donc été faites. Dans la première, 16 genoux de lapins ont été utilisés dans lesquels qu'une seule insertion a été faite avec une aiguille stérile dans des conditions aseptiques. Toutes les aiguilles utilisées ont été de la même taille (0.5 mm) au cours des études comportant des injections de NIF-NaHA de NaHA ou de SPT. Dans la seconde, les genoux de 10 lapins ont été traités par voie intra-articulaire deux fois par semaine sur une période de 5 semaines et demie. Dans les deux cas, les lapins ont été sacrifiés une semaine après la fin du traitement, par saignée et les espaces articulaires lavés. La teneur en NaHA et en protéines des articulations font l'objet du Tableau XXVIII.

Tableau XXVIII Teneur en NaHA et en protéines des articulations normales du lapin et des articulations traitées une fois (1x) ou 11 fois (11x) par une seule insertion d'une aiguille stérile

	Nbre. d'articulations	NaHA µg/artic.	Protéine mg/artic.	P
Témoin	68	286 ± 3	3.0 ± 0.2	
Aiguille 1 x	16	575 ± 68	5.1 ± 0.6	<0.001*
Aiguille 11x	10	457 ± 43	10.3 ± 1.8	<0.001*

* comparé au lapin normal, valable pour le NaHA et les protéines.

Dans les deux séries, la teneur en NaHA des articulations était significativement plus élevée que la normale. L'augmentation du nombre des ponctions et de la durée de l'expérience n'a pas augmenté davantage la teneur en NaHA de l'articulation. La teneur en protéine était également significativement plus élevée que la normale. De plus, des insertions répétées sur plusieurs semaines ont eu pour effet d'accroître la teneur en protéine des articulations au cours de l'expérience chronique (11x) d'une manière significative par rapport à celle obtenue lors de l'expérience aiguë (1x) ($p < 0,02$). Ces résultats suggèrent qu'une inflammation causée par des conditions traumatisantes chroniques a plus facilement raison de la barrière liquide sang-synovie qu'un traitement unique. Il est

toutefois intéressant de voir que lors d'un traitement unique, l'articulation n'avait toujours pas récupéré son état normal au bout de 5 jours. Comme aucune exsudation n'a été trouvée (quantité de liquide synovial prélevable, >0,1 ml) dans aucune des articulations, l'intensité de l'inflammation 5 jours après la dernière (ou unique) insertion était modérée mais suffisante pour maintenir un taux élevé en NaHA et en protéine dans l'articulation. Comme ces deux paramètres étaient plus élevés après 11 insertions d'aiguilles, le degré d'inflammation était proportionnel à ces traumatismes expérimentaux.

B. Coupes de cartilage sur une zone portante

Afin d'évaluer l'effet d'une atteinte relativement simple du cartilage sur l'effet du métabolisme du NaHA et sur la teneur en GAG du cartilage endommagé, l'expérience suivante a été effectuée. Des coupes pleine épaisseur du cartilage du condyle fémoral médian ont été pratiquées sur les deux genoux de 31 lapins (voir page 108). Dix articulations n'ont pas été opérées, mais traitées seulement avec des injections intra-articulaires de SPT. Ces animaux ont servi de témoins. Immédiatement après l'opération, et deux fois par semaine pendant toute la durée de l'expérience, les genoux droits de chaque lapin ont reçu 0,3 ml de NIF-NaHA et les genoux gauches le même volume de SPT. A la fin de 5 semaines et demie puis après 12 et 17 semaines, et toujours 5 jours après le dernier traitement, les lapins

ont été sacrifiés par saignée et les lavages synoviaux prélevés et analysés, pour leur teneur en NaHA et protéine. Puis des échantillons de cartilage ont été prélevés en vue d'analyses microchimiques de leur teneur en NaHA et en ChS. Le Tableau XXIX montre les teneurs en NaHA et en protéines des lavages synoviaux des lapins témoins et des lapins traités soit avec du SPT soit avec du NIF-NaHA pendant 5 semaines et demies et 12 et 17 semaines.

Tableau XXIX Teneur en NaHA en protéine des articulations après des coupes pleine épaisseur du cartilage du condyle fémoral médian.

	Témoins	Opérés traités à la SPT.			Opérés traités au NIF-NaHA		
		5½ sem.	12 sem.	17 sem.	5½ sem.	12 sem.	17 sem.
NaHA µg/genou (n)	432± 33 (10)	396± 62 (4)	793±236 (4)	440±125 (4)	544± 61 (7)	1116± 241 (6)	848± 182 (6)
p**		NS	NS	NS	NS	< 0.02	<0.05
Protéine mg/genou	6.1±0.7 (10)	5.2±0.5 (4)	10.3±0.8 (4)	-	9.8±1.0 (7)	17.6±3.4 (6)	-
p**		NS	<0.01		<0.01	<0.01	

§ Traité une fois avec de la SPT (0,3 ml) et sacrifié 5 jours plus tard.

* 15 mg/ml.

** p compare les résultats des groupes témoins avec les groupes opérés.

Pendant les 17 semaines de traitement au SPT la teneur en NaHA des articulations s'est élevée significativement au dessus de celle des articulations normales, mais elle ne différait pas de celle des articulations témoins. Il n'y a pas eu non plus de différence significative de la teneur en NaHA pendant les 17 semaines qui ont suivi. Par contre

le traitement répété au NIF-NaHA a produit après 12 et 17 semaines un accroissement significatif de la teneur en NaHA des articulations par rapport aux articulations témoins. Après un traitement répété au SPT (12 semaines) la teneur en protéine des articulations s'est élevée au dessus du niveau de celle des articulations témoins. Le traitement du NIF-NaHA a provoqué une augmentation encore plus forte de la teneur en protéine. Dans les deux cas, le traitement le plus long (injections les plus fréquentes) a provoqué une plus grande élévation de la teneur en protéines.

En résumé, le traitement répété au SPT augmente l'inflammation par élévation de la teneur en protéines de l'articulation. Cette inflammation n'a jamais été suffisamment sévère pour provoquer des exsudations. Par comparaison avec les articulations témoins, l'effet du NIF-NaHA exogène sur le métabolisme du NaHA a été évalué. Comme l'articulation est analysée (lavée) 5 jours après la dernière injection, la possibilité de rétention du NIF-NaHA est très faible. Après l'injection du NIF-NaHA (3 mg) au moins dans les articulations non opérées, la teneur en NaHA revient à la normale après 4 jours. En conséquence, pour ces articulations, une teneur en NaHA plus élevée que la normale indique un changement métabolique, c'est à dire un accroissement de la synthèse ou une diminution du catabolisme. Par l'un ou l'autre de ces mécanismes, les injections répétées de NIF-NaHA provoquent

une augmentation de la teneur en NaHA de l'articulation après 12 et 17 semaines.

Dans ces expériences la teneur en NaHA et en ChS du cartilage n'a pu être déterminée à cause du manque d'échantillons de taille suffisante. C'est pour la même raison que la teneur en eau des échantillons de cartilage n'a pu être déterminée, et par conséquent la teneur en GAG a été exprimée en % de poids sec. Il est important de se rendre compte que les échantillons de cartilage ne représentent pas uniquement l'aire endommagée (coupe). La seule coupe sur le condyle fémoral ne touche directement qu'une relativement petite surface du cartilage, mais affecte indirectement le reste du cartilage. L'échantillon obtenu à partir de chaque articulation dans cette expérience représente le cartilage de la surface coupée, aussi bien que le cartilage du reste de l'articulation. C'est pourquoi, lors de l'évaluation des résultats obtenues à partir d'échantillons de cartilage, l'on doit réaliser que c'est un effet total dû à une inflammation généralisée plutôt qu'une lésion spécifique qui exerce une influence sur la teneur en GAG du cartilage. Le Tableau XXX résume les résultats des analyses de cartilages.

Tableau XXX Teneur en NaHA et en ChS (% de poids sec) du cartilage d'articulations lésées par des incisions pleine épaisseur sur une zone portante

CARTILAGE		Témoins - § (non-opérés)	Opérés - traités par SPT			Opérés - traités par NIF-NaHA		
			5½ semaines	12 semaines	17 semaines	5½ semaines	12 semaines	17 semaines
			NaHA % du poids sec	0.6 ±0.04 (15)	2.8±0.8 (4)	0.4±0.1 (4)	0.9±0.1 (3)	2.1±0.2 (6)
p**		< 0.02	NS	< 0.01	< 0.01	NS	NS	
ChS % du poids sec	9.8±0.4 (15)	2.6±0.9 (4)	5.7±0.9 (4)	6.1±0.4 (3)	5.1±0.7 (7)	4.0±0.6 (7)	4.9±1.1 (5)	
p**		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	

§ Traités une fois par SPT (0.3 ml) et sacrifiés 5 jours plus tard.

• 15 mg/ml.

** p compare les résultats du groupe témoins (non-opérés) avec ceux des groupes opérés.

Dans les deux groupes opérés la teneur en sulfate chondroïtine du cartilage était significativement plus faible que celle des groupes témoins. Il n'y avait pas de différence entre les groupes traités par SPT et ceux traités par NIF-NaHA. La teneur en ChS est resté faible pendant toute la période du traitement. Ainsi le double traumatisme due à l'entaille et aux injections répétées de SPT ou de NIF-NaHA a produit une inflammation qui s'est propagée au reste du cartilage. Ce dommage a produit une baisse considérable (approximativement 50%) de la teneur en ChS, sur la base de la teneur en poids sec du cartilage. Si l'on suppose que dans tout processus inflammatoire la teneur en eau du cartilage s'accroît légèrement, la baisse de ChS par poids de tissu humide serait encore plus marquée.

Dans deux cas suivant un traitement du SPT (5 semaines et

et demies) la teneur en NaHA des échantillons de cartilage montrait une augmentation significative par rapport à celle des échantillons témoins. Cet accroissement était substantiel, 180 - 480% au dessus de la valeur témoin (0,9; 2,1; 2,8% par rapport à 0,58% valeur témoin). En supposant qu'il y a 65,8% d'eau dans les cartilages normaux (Wigren, Wik et Falk, 1975) et 72,4% (augmentation de 10%) dans les cartilages inflammés, la différence entre la concentration en NaHA dans les conditions normales et pathologiques serait plus faible. Toutefois, après 5 semaines et demies de traitement de solution physiologique tamponnée et de NIF-NaHA, les différences par poids de tissu humide seraient encore significatives: témoins: 0,20%, NIF-NaHA: 0,50% et SPT: 0,66%.

Le surplus de NaHA dans le cartilage ne peut pas provenir du NIF-NaHA injecté puisqu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats après traitements au NIF-NAHA et au SPT. Par conséquent on doit supposer que ce surplus est la cause d'une pathologie générale due au traumatisme.

vacin 14 ans, OA?

C. Instabilité de l'articulation

Afin d'étudier l'effet de l'instabilité de l'articulation et de la pathologie qui en découle sur le métabolisme du NaHA endogène et exogène, une instabilité a été induite dans 28 articulations de lapins selon la méthode décrite page 109 .

Seul le genou droit de chaque animal a été opéré. Nous avons injecté dans l'articulation deux fois par semaine dans les genoux opérés, soit du NIF-NaHA (0,5 ml de 20 mg/ml) soit du soluté physiologique tamponné (0,5 ml). Un troisième groupe n'a reçu aucune injection. Huit jours après la dernière injection et 2 semaines après l'opération, les lapins ont été sacrifiés et leurs articulations lavées. Nous avons alors déterminé la teneur en NaHA, en protéines et la viscosité intrinsèque du NaHA. Les échantillons de cartilage ont été prélevés sur les condyles fémoraux (supportant le poids) qui ont été inclus dans la paraffine et évalués histologiquement.

Le Tableau XXXI présente la teneur en NaHA, la $[\eta]_0$ du NaHA et la teneur en protéines des articulations instables. Les valeurs des mêmes paramètres pour l'articulation non opérée sont reportées en référence.

Tableau XXXI Modification de la teneur en NaHA, de sa viscosité $[\eta]_0$ et de la teneur en protéines des articulations artificiellement déstabilisées

	Témoins (non-opérés)	Opérés - pas de traitement	Opérés - traités par SPT - 2 fois / semaine	Opérés - traités par NIF-NaHA - 2 fois / semaine
NaHA en $\mu\text{g}/\text{artic.}$	345 ± 55 (10)	808 ± 90 (4)	852 ± 107 (10)	1249 ± 186 (14)
p **	1	< 0.01	NS	NS
	2		NS	0.05
$[\eta]_0$ cc/g	4345 ± 340 (10)	4760 ± 520 (4)	5814 ± 420 (10)	5724 ± 210 (14)
p **	1	NS	< 0.02	< 0.01
	2		NS	NS
Protéine mg/ml	4.8 ± 0.6 (10)	9.9 ± 0.9 (4)	11.6 ± 1.4 (10)	17.1 ± 1.9 (14)
p **	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	2		< 0.01	< 0.01

** p₁ compare les résultats du groupe "témoins (non-opérés)" avec ceux de tous les groupes opérés.

p₂ compare les résultats du groupe "opérés - pas de traitement" avec ceux des groupes "opérés - traités ...".

() En parenthèse, le nombre d'articulations dans chaque groupe.

La teneur en NaHA est significativement plus élevée pour tous les groupes opérés. Le traitement au NIF-NaHA accroît d'une façon significativement la teneur en NaHA de l'articulation ($p < 0,01$) plus que le traitement à la solution physiologique tamponnée et est supérieure à celle des articulations non traitées. La $[\eta]_0$ des articulations instables était légèrement mais non significativement plus élevée que celle des articulations normales. Toutefois il n'y avait pas de différence significative

entre les groupes opérés/traités. Les valeurs moyennes de $[\eta]_0$ pour les deux groupes traités étaient 20% plus basses que celles du groupe opéré et non traité. Cette différence toutefois n'était pas significative probablement à cause du nombre peu élevé des articulations de ce dernier groupe.

La teneur en protéines était significativement plus élevée pour toutes les articulations instables ($p < 0,01$).

Il est intéressant de voir que les deux traitements différents provoquent un accroissement significatif de la teneur en protéine ($p < 0,01$). C'est le NIF-NaHA qui provoque la plus grande augmentation (différence non

significative). Cette augmentation importante de la teneur en protéines des articulations instables indiquent clairement qu'un état inflammatoire continu se maintient dans ces articulations. Cet état induit un accroissement de la teneur en NaHA des articulations pour tous les

groupes. Mais il faut remarquer que cette inflammation chronique ne provoque pas une diminution de la $[\eta]_0$ du NaHA. De ce point de vue, l'arthrite chronique chez l'homme et les chevaux diffère de l'articulation instable du lapin; en effet dans ces conditions la teneur élevée en NaHA va toujours de pair avec une diminution de la $[\eta]_0$.

Au contraire la tendance de la $[\eta]_0$ du genou du lapin pendant cette arthrose induite artificiellement est à l'augmentation. Le traitement à la solution physiologique tamponnée ne provoque pas une augmentation de la teneur

plus
4 sem ?

en NaHA au dessus du niveau déjà atteint par l'instabilité contrairement à ce qu'on constate avec le traitement au NIF-NaHA. Comme la $[\eta]_0$ trouvée 8 jours après la dernière injection de NIF-NaHA est beaucoup plus élevée que celle de la solution de NIF-NaHA injecté (3000 cc/g), nous devons supposer que cette augmentation n'est pas due à l'accumulation du NIF-NaHA. La $[\eta]_0$ est également plus élevée dans les articulations normales après le traitement au NIF-NaHA, en conséquence ce traitement peut déclencher un changement dans la synthèse du NaHA.

Nous présentons dans le Tableau XXXII l'évaluation histologique du cartilage et de la radioactivité des échantillons de cartilage après incubation avec de la ^3H -proline et du ^{35}S -sulfate.

Tableau XXXII Evaluation histologique et incorporation de la proline et du sulfate dans les échantillons de cartilage prélevé sur une surface ne supportant pas de poids (condyle fémoral) dans les articulations instabilisées chirurgicalement

		Pas de traitement	SPT 2x /semaine	NIF-NaHA 2x /semaine
Evaluation histologique du cartilage		2 - 3 (5)	1 - 3 (10)	1 - 3 (13)
	P		NS	NS
^3H -proline incorporé §		7750 ± 2215	12750 ± 2340	6270 ± 1270
	P		NS	NS
^{35}S -Sulfate incorporé		5290 ± 1755	8805 ± 1670	4240 ± 940
	P		NS	NS

() les chiffres en parenthèse indiquent le nombre de genoux.

§ cpm/mg du poids sec du tissu (témoin 2,500, proline ^3H ; 1,200 sulfate ^{35}S .)

L'évaluation histologique ne montre qu'une ostéoarthrose modérée sans différence significative entre le groupe non traité et les deux groupes traités. Les teneurs en ^{35}S et ^3H du cartilage sont plus élevées que la valeur normale ce qui correspond à une détérioration du cartilage. Ceci signifie que l'instabilité qui a provoquée l'inflammation chronique (synovitis) a également provoqué une ostéoarthrose modérée. Il apparaît que la solution physiologique tamponnée à tendance à aggraver cette condition comme le montre l'augmentation de l'incorporation de la proline et du sulfate, toutefois l'augmentation de la radioactivité exprimée en cpm/mg de poids sec n'était pas statistiquement significative.

D. Immobilisation de l'articulation

Nous avons fait cette expérience pour rechercher l'effet de l'immobilisation sur le métabolisme du NaHA endogène et exogène. Nous avons inséré une aiguille (Voir page 110) dans le genou gauche ou droit sélectionné au hasard des 33 lapins. Dans l'autre genou en utilisant une aiguille de même taille, nous avons injecté 0,3 ml de NIF-NaHA (10 mg/ml). Après ce traitement, la moitié des genoux sélectionnés au hasard a été immobilisée en extension pendant sept jours. Après le sacrifice des animaux sept jours plus tard, nous avons trouvé dans quelques unes des articulations des exsudats. Ces articulations ont été ponctionnées avant de procéder aux lavages des articulations et nous avons recueillis le maximum d'exsudats. Nous avons

mesuré le volume de l'exsudat et déterminé la teneur en NaHA et en protéines. Puis les espaces intra-articulaires ont été lavés et les teneurs en NaHA et en protéines des lavages articulaires ont été déterminées. Les échantillons de cartilage ont été prélevés sur le plateau platellaire, les condyles fémoraux et les condyles du tibia. Nous avons également prélevé des échantillons de tissu synovial, et ces tissus et les échantillons de cartilage ont été pesés et immédiatement congelés pour analyse des GAGs.

Le Tableau XXXIII présente la détermination de la teneur en NaHA et en protéines de l'articulation.

Tableau XXXIII Teneur en NaHA et en protéines des articulations immobilisées et des articulations non immobilisées après la seule insertion d'une aiguille ou après traitement au NIF-NaHA.

	non-immobilisés		immobilisés	
	Témoins (aiguille introduite)	NIF-NaHA injecté	Témoins (aiguille introduite)	NIF-NaHA injecté
NaHA µg / articulation	575 ± 68 (16)*	550 ± 76 (14)	1260 ± 185 (15)	846 ± 106 (16)
p		NS	< 0.01	< 0.05
Protéine mg / articulation	5.1 ± 0.6 (15)	8.5 ± 2.1 (12)	32.6 ± 7.0 (14)	18.6 ± 2.2 (15)
p		NS	< 0.001	< 0.001

Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs du NaHA et celles du protéine pour les deux groupes immobilisés.

() chiffres en parenthèse indiquent le nombre de genoux.

La teneur en NaHA de toutes les articulations était significativement plus élevée que celle des articulations normales. Même l'insertion de l'aiguille dans les articulations non immobilisées provoquait un accroissement de la teneur en NaHA. Les articulations non

immobilisées ayant reçu du NIF-NaHA avaient la même teneur en NaHA que les articulations dans lesquelles seule une aiguille avait été insérée. L'immobilisation provoque une augmentation significative dans les articulations opposées. Il est important de noter que les valeurs les plus élevées ont été trouvées dans les articulations immobilisées et ayant reçu une seule insertion d'une aiguille et non pas dans les articulations immobilisées et ayant reçu des injections de NIF-NaHA.

Curieusement 7 jours après l'insertion de l'aiguille ou après l'injection de NIF-NaHA la teneur en NaHA des articulations non immobilisées était encore au dessus du niveau normal. La teneur en NaHA des articulations ayant reçu dans une expérience précédente la même quantité de NIF-NaHA (3 mg) est revenue à son niveau normal 4 jours plus tard (voir Figure 10). La seule différence entre ces deux expériences est que le genou opposé n'avait pas été immobilisé. On peut conclure que le l'immobilisation du genou opposé impose une restriction des mouvements et empêche les mouvements de l'animal dans sa cage. En conséquence les deux genoux seront atteints même si un seul genou seulement est immobilisé, bien que le degré de la lésion et la nature peuvent être différent.

Quand une aiguille stérile a été insérée dans l'articulation et que l'articulation a été immobilisée, la teneur en NaHA augmente jusqu'à atteindre le double du niveau de contrôle ($p < 0,01$; Tableau XXXIII). La teneur en NaHA de ces articulations immobilisées qui avaient juste reçu l'insertion d'une aiguille n'est pas statistiquement différente de celle des articulations qui avaient été immobilisées après injection de NIF-NaHA. Ceci suggère que c'est plus l'effet stimulant de l'immobilisation que le manque de mouvement ou l'absence de force mécanique (pression) qui provoque l'augmentation de la teneur en NaHA dans l'articulation.

L'immobilisation provoque également une augmentation significative de la teneur en protéines dans les articulations ($p < 0,01$) (Tableau XXXIII). Seules les articulations immobilisées présentaient des exsudat (jamais les genoux opposés (Tableaux XXXIV). Des exsudats ont été trouvés dans les genoux des quelques animaux des deux groupes immobilisés.

Tableau XXXIV Volume et concentration de NaHA ($\mu\text{g/ml}$) dans les exsudats d'articulations immobilisées

Lapin	Genou	Volume ml	Témoin	Traité par NIF-NaHA
463	G	0.50	2950	
542	D	0.20	2635	
554	G	0.60	1875	
470	D	0.70	1841	
532	D	0.65	1166	
553	G	0.10	1090	
534	G	0.25	1068	
538	D	0.80	960	
540	D	1.50	928	
530	G	0.55	922	
529	D	0.40	878	
551	D	0.40		1772
549	D	0.30		1700
550	D	0.30		1470
531	D	0.40		1410
548	D	0.20		1355
Moyenne	\pm		1480 \pm 220	1540 \pm 30

La Figure 22 présente la teneur en NaHA des exsudats tracé en fonction de celle des lavages articulaires. Il y a une bonne corrélation linéaire entre les deux paramètres ($r = 0,71$) comme on pouvait s'y attendre puisque les deux déterminations concernant le même paramètre c'est à dire la teneur en NaHA de l'espace articulaire enflammé et élargi (par l'exsudation).



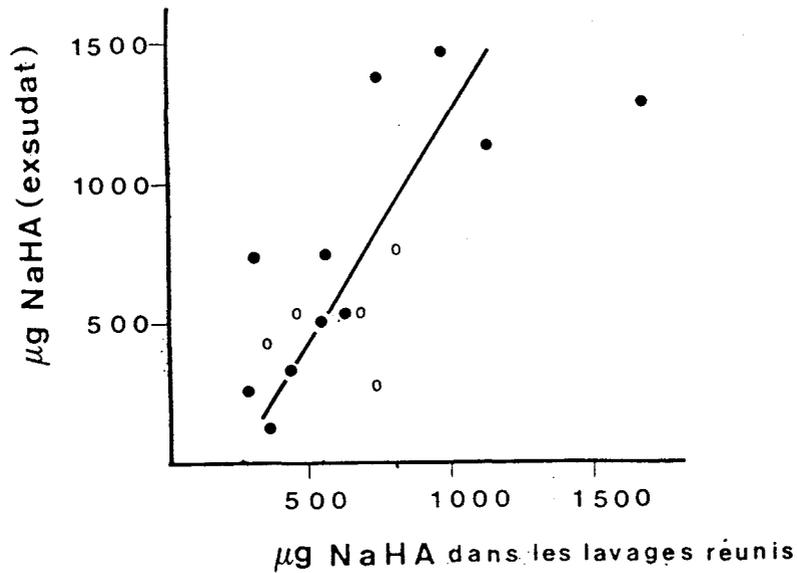


Figure 22. Teneur en NaHA des exudats prélevés rapportées contre la teneur en NaHA des lavages articulaires. Les exudats et les lavages des genoux témoins immobilisés sont représentés par les cercles pleins (●); ceux des articulations traitées au NIF-NaHA sont représentées par les cercles ouverts (○). La droite la mieux ajustée calculée pour les deux groupes combinés (n=16) a un coefficient de corrélation de $r=0,71$ ($p < 0,01$).

La concentration en NaHA de ces deux groupes n'était pas significativement différente mais le volume moyen et la fréquence des exsudats étaient significativement plus élevés pour le groupe immobilisé et ayant reçu l'insertion d'une aiguille et pour le groupe immobilisé ayant reçu des injections de NIF-NaHA. (Tableau XXXV)

Tableau XXXV Effet de NIF-NaHA sur la réaction inflammatoire (exudation) provoquée par l'immobilisation de l'articulation

	Articulations contenant de l'exsudate	Volume d'exsudat ml	Protéine d'exsudat mg/ml	Protéine dans les lavages de l'articulation.	
	nombre (%)			avec exsudat	sans exsudat
Témoins (n = 14)	11 (70)	0.57 ± 0.11	12.4 ± 2.7	38.8 ± 8	
Traités par NIF-NaHA (n = 15)	4 (33)	0.32 ± 0.04	5.2 ± 0.8	22.7 ± 2.6*	14.6 ± 2.3*
Signification (p)	< 0.01 *	NS	0.1 - 0.05	0.1 - 0.05	

* p < 0.05

* l'épreuve Chi de signification.

La concentration moyenne en protéine obtenue dans les exsudats des articulations traitées au NIF-NaHA était plus basse que celle des articulations qui n'avaient reçu qu'une insertion d'aiguille, mais la différence n'était pas significative (pour un taux de confiance de 90 - 95%. Ceci suggère une différence mais ne le prouve pas. De plus la différence de la teneur en protéines des lavages articulaires sans exsudats était significativement basse (p < 0.05) que dans les articulations présentant d'exsudation : on peut admettre que la présence d'exudats dans l'articulation et la teneur en protéines plus élevée de l'exsudats et des lavages articulaires indiquent une inflammation plus sévère que l'absence d'exudats et une concentration moins élevée en protéines. En conséquence il est possible de conclure qu'une seule injection de NIF-NaHA protège en quelque sorte l'articulation d'une inflammation sévère due à l'immobilisation;

Tableau XXXVI GAGs(% de poids humide dans le cartilage d'articulations immobilisées.

GAG	non-immobilisés		immobilisés	
	Témoins (aiguille introduite)	NIF-NaHA injecté	Témoins (aiguille introduite)	NIF-NaHA injecté
NaHA	0.24 ± 0.02 (8)	0.21 ± 0.02 (11)	0.18 ± 0.03 (11)	0.22 ± 0.02 (8)
KS	0.66 ± 0.08 (8)	0.56 ± 0.12 (10)	0.63 ± 0.11 (11)	0.55 ± 0.03 (8)
ChS	2.57 ± 0.09 (8)	2.70 ± 0.24 (11)	2.38 ± 0.24 (11)	2.50 ± 0.26 (8)

() les chiffres en parenthèse indiquent le nombre de genoux.

Il n'y a pas de différence significative entre les groupes.

L'analyse de la teneur en GAGs du cartilage (Tableau XXXVI) montre que les trois fractions de GAGs analysées en % de poids de tissu humide sont inchangé pour les trois groupes expérimentaux. Ceci signifie probablement que 7 jours d'immobilisation était une période trop courte pour qu'apparaisse un changement significatif dans la teneur en GAGs du cartilage. Il est important de noter que ces échantillons de cartilage sont représentatifs de tous les cartilages de surface intra-articulaire (plateau patellaire, condyles fémoraux et condyles du tibia).

Tableau XXXVII GAGs(% de poids humide) dans le tissu synovial d'articulations immobilisées

GAG	Non-immobilisés		Immobilisés	
	Témoins (aiguille introduite)	NIF-NaHA injecté	Témoins (aiguille introduite)	NIF-NaHA injecté
NaHA	0.031 ± 0.008 (8)	0.025 ± 0.005 (11)	0.067 ± 0.009 (11)	0.053 ± 0.007 (8)
KS	0.012 ± 0.005 (8)	0.050 ± 0.015 (11)	0.027 ± 0.011 (11)	0.009 ± 0.002 (8)
ChS	0.045 ± 0.011 (8)	0.060 ± 0.010 (11)	0.065 ± 0.008 (11)	0.075 ± 0.022 (7)

Signification :

NaHA : Témoins / non-immobilisés contre Témoins / immobilisés : p 0,01
NIF-NaHA / non-immobilisés contre NIF-NaHA / immobilisés : p 0,01

KS : Témoins / non-immobilisés contre NIF-NaHA / non immobilisés : p 0,01
NIF-NaHA / non immobilisés contre NIF-NaHA / immobilisés : p 0,01

ChS : pas de différence significative.

L'analyse de la teneur en GAGs (Tableau XXXVII) présente quelques différences entre les groupes expérimentaux. La fraction de NaHA était significativement plus forte pour les deux groupes immobilisés ($p < 0,01$). C'est à dire qu'indépendamment du fait que les articulations aient reçues ou non des injections de NIF-NaHA 7 jours plus tôt, le tissu synovial contenait une plus grande quantité de NaHA dans les genoux immobilisés que dans les genoux opposés non immobilisés. Donc la teneur plus élevée de NaHA du tissu synovial est bien corrélée avec la teneur plus élevée de NaHA de l'espace articulaire (lavage synovial; voir Tableau XXXIII).

La fraction de ChS ne présente aucune différence entre les différents groupes expérimentaux. La teneur en KS était significativement plus élevée dans le tissu synovial des genoux témoins immobilisés et dans les genoux opposés non

immobilisés et dans les genoux opposés non immobilisés ayant reçu des injections de NIF-NaHA que dans les genoux témoins n'ayant reçu qu'une insertion d'aiguille.

VII. Effet d'une pathologie induite chimiquement sur le métabolisme de NaHA endogène et exogène

A. Effet de l'ovalbumine (albumine de l'oeuf) : arthrite induite par un antigène

Afin d'étudier l'effet de l'arthrite induite par l'ovalbumine sur la teneur en NaHA de l'articulation, 20 lapins ont été immunisés avec de l'ovalbumine comme il est décrit à la page 112. 43 jours après le début du traitement de sensibilisation (le premier jour de traitement) 10 animaux sélectionnés au hasard ont reçu dans un genou (également sélectionné au hasard) une injection de NIF-NaHA (10 mg/ml 0,3 ml). Le jour suivant (jour de traitement N°2): les 10 genoux de ces 5 lapins ont reçu 10 mg d'ovalbumine (OA) dans 0,3 ml de liquide physiologique tamponné. Les genoux qui avaient reçu l'injection de NIF-NaHA ont été désignés OA/NIF-NaHA, et les autres OA-injecté. Les 5 autres animaux n'ont été traités que le premier jour et ont reçu une injection de sérum physiologique dans un genou et 10 mg d'OA (0,3 ml) dans le genou opposé. Ces deux groupes ont été appelés: Témoins/SPT injectés et OA injectés. Les OA injectés ont été réunis en un groupe pour l'analyse finale (Tableau XXXVIII).

Tableau XXXVIII. La teneur en NaHA et protéines des genoux du lapin après une arthrite induite par antigène (ovalbumine).

	Témoins SPT injectés	OA injectés	OA - NIF-NaHA injectés
NaHA µg (n)	305 ± 46 (5)	673 ± 143 (7)	418 ± 61 (5)
P ₁		< 0.05	NS
P ₂			NS
Protéine mg (n)	5.0 ± 2.0 (3)	33.7 ± 16.6 (3)	26.7 ± 8.9 (3)
P ₁		NS	0.1 - 0.05
P ₂			NS

P₁ compare les résultats du groupe "SPT-injectés" avec ceux des autres.

P₂ compare les résultats du groupe "OA-injectés" avec ceux du groupe "OA-NIF-NaHA injectés"

28 jours après le second jour de traitement, les animaux ont été sacrifiés et les articulations lavées. Nous n'avons trouvé aucune exsudation pour aucune des articulations. Le Tableau XXXVIII résume les résultats des analyses des concentrations de NaHA et des protéines des lavages synoviaux. La concentration en NaHA des témoins (injection de liquide physiologique) n'était pas significativement différente de celle des articulations normales (286 ± 3 µg). Toutefois la concentration de NaHA dans les

articulations OA-injectés était significativement plus élevé que pour les articulations témoins-liquide physiologique ($p < 0,05$). Les OA-NIF-NaHA présentait également un léger accroissement par rapport aux articulations "injections de liquide physiologique" mais la différence n'était pas significative.

Les valeurs moyennes de la teneur en protéine, dans les articulations présentait un accroissement substantiel pour les deux groupes expérimentaux (OA-injectés) par rapport au genou ($3,5 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux témoins-"injection de liquide physiologique" mais ces différences n'étaient pas statistiquement différentes à cause du nombre peu élevé d'échantillons et à cause de la large erreur de la moyenne pour les deux groupes d' OA-injectés. Toutefois tous les genoux traités à l'OA présentait une teneur en protéines plus élevée que pour le groupe témoin.

La teneur en protéines élevée indique que l'inflammation était encore présente 28 jours après le traitement pour les genoux traités à l'OA. L'inflammation a provoqué un accroissement significatif de la teneur en NaHA dans l'articulation. Une seule injection de NIF-NaHA un jour avant l'introduction de OA à quelque peu réduit la teneur en NaHA de l'articulation mais non significativement.

B. L'effet de la concanavaline A

Nous avons choisi la concanavaline A (CON A) comme modèle pour déterminer l'effet d'une stimulation non-immunogène sur le liquide synovial, le tissu synovial et le cartilage. Dans la première partie de l'expérience on a injecté dans les genoux de lapin 1,5 mg de CON A par genou. On a mesuré le diamètre latéral des articulations avec un micromètre avant l'injection. Dix-huit heures après l'injection on a tué les animaux, mesuré à nouveau le diamètre de l'articulation et collecté les lavages synoviaux pour déterminer la teneur en acide hyaluronique et en protéines. Le Tableau XXXIX résume ces résultats.

Tableau XXXIX. Teneur en NaHA et en protéines de l'articulation du genou du lapin 18 heures après l'injection intra-articulaire de 1,5 mg CON A. Le diamètre de l'articulation est donné avant et après ce traitement.

	Diamètre du genou (cm)		Après injection	
	Avant injection	Après injection §	NaHA (µg/genou)	Protéines (mg/genou)
CON A (n=6)	0.75 ± 0.03	0.93 ± 0.04	875 ± 120	47 ± 9
SPT (n=6)	0.75 ± 0.03	0.75 ± 0.03	495 ± 52	9 ± 2
p §§	NS	< 0.01	< 0.05	< 0.01

§ 1,5 mg CON A dans 0,3 ml SPT ; ou 0,3 ml SPT.

§§ p compare les genoux injectés avec SPT ou avec CON A.

Le diamètre des genoux injectés avec CON A a augmenté d'une façon significative par rapport aux articulations qui ont reçu l'injection de SPT seulement. Bien qu'il n'y ait pas eu d'exsudat aspirable, le tissu périarticulaire était gonflé et enflammé. La teneur en NaHA de l'articulation injectée avec SPT était supérieure à celle de l'articulation normale (comme mentionné à la page 239), l'augmentation de la teneur en NaHA de l'articulation ayant reçu l'injection de CON A a été supérieure d'une façon significative à celle des articulations ayant reçu la SPT seule ($p < 0,05$). La teneur en protéines a été aussi augmentée environ 5 fois par rapport à la teneur des articulations injectées avec la SPT seule, ce qui indique une réaction inflammatoire violente.

Dans la deuxième partie de cette expérience, nous avons suivi la cinétique de la réaction inflammatoire. La même quantité de CON A a été injectée dans 94 articulations du genou du lapin et on a tué les animaux à des temps différents après l'injection, entre 6 et 168 heures (7 jours). La Figure 23 montre la variation de la teneur en NaHA et de la viscosité intrinsèque ($[\eta]_0$; indice de viscosité intrinsèque de NaHA) en fonction du temps pendant cette période d'observation.

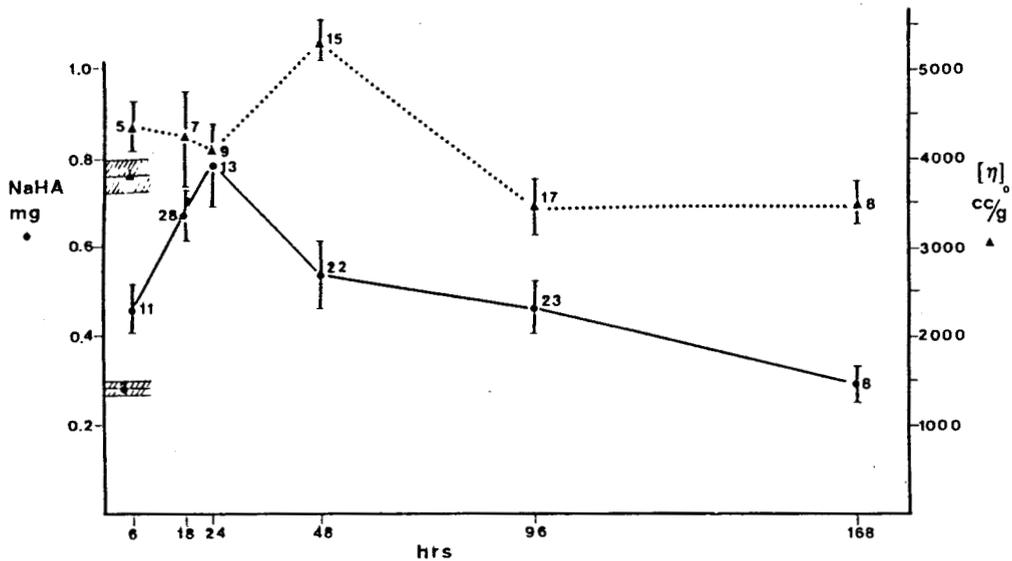


Figure 23. La modification de la teneur en NaHA et l'indice de viscosité limite de NaHA après injection de CON A dans l'articulation du genou de lapin.

Cercle plein : NaHA mg

Triangle plein : $[\eta]_0$ cc/g

Les barres verticales indiquent l'erreur standard et le chiffre indique le nombre d'articulations dans chaque groupe. La bande horizontale supérieure hachurée (▲) indique $[\eta]_0$ dans le genou normal non-traité et la bande horizontale inférieure hachurée (●) la teneur en NaHA dans le genou normal non-traité. La ligne du milieu représente la moyenne et l'aire hachurée montre les limites supérieures et inférieures de l'erreur type de la moyenne.

Déjà 6 heures après l'injection de CON A la teneur en NaHA de l'articulation est élevée par rapport à la valeur du contrôle. A 24 heures, cette augmentation est encore plus importante ($p < 0,001$). Deux jours après l'injection, ces valeurs baissent mais la valeur normale n'est atteinte qu'après une semaine après l'injection. L'augmentation de la viscosité suit une cinétique similaire mais est restée plus lente que celle de la teneur en NaHA de 24 heures environ. La viscosité intrinsèque la plus élevée a été observée à 48 heures, ensuite elle a diminué vers les valeurs normales qui sont atteintes en 96 heures.

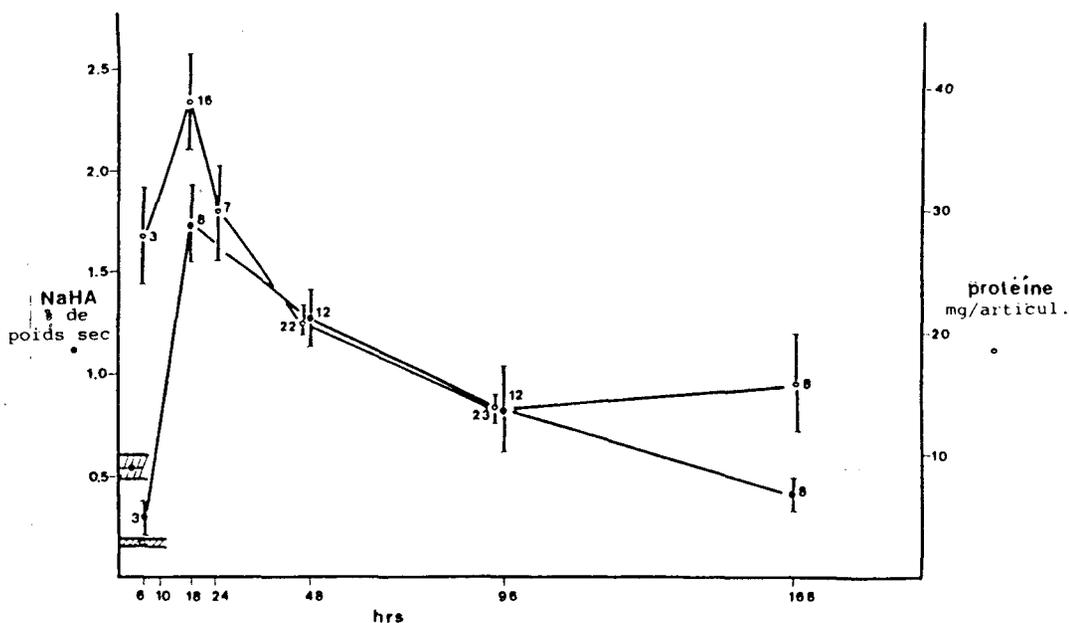


Figure 24. La teneur en protéines du lavage synovial par articulation (mg) et la teneur en NaHA (% de poids sec tissulaire) du tissu synovial sont représentées en fonction du temps après injection de CON A (1,5 mg par articulation) dans l'articulation du genou de lapin. Protéine dans le lavage synovial (mg) : cercle plein ; teneur en NaHA (% du poids sec tissulaire) : cercle ouvert. Les barres verticales représentent l'erreur type de la moyenne. Les chiffres à côté de chaque point indiquent le nombre d'articulations dans chaque groupe. Les barres horizontales près des ordonnées indiquent la moyenne et l'erreur type de la moyenne (surface hachurée) de la NaHA dans les tissus synoviaux non-traités normaux (cercle plein) et de la teneur en protéines (en mg) du lavage synovial dans l'articulation non-traitée normale (cercle ouvert).

La teneur en protéines de l'articulation a été aussi déterminée (Figure 24). Six heures après l'injection elle a été supérieure d'une façon significative à la normale et restée élevée pendant toute la durée de l'expérience (168 heures) (Figure 24). Ceci peut être interprété comme une persistance de l'état inflammatoire (fuite capillaire) même après le retour de la teneur en NaHA vers les valeurs normales. Le NaHA du tissu synovial (Figure 24) a présenté une augmentation significative (~ 3 fois) au dessus de la valeur normale déjà 18 heures après l'injection de CON A. Ceci est en corrélation avec l'augmentation de la teneur en NaHA et des protéines dans

les lavages synoviaux. A 96 heures, la teneur en NaHA du tissu synovial est déjà presque de retour à la normale.

La teneur en NaHA et en ChS du cartilage a été également déterminée. La Figure 25 montre la teneur en NaHA et ChS (en% du poids sec du tissu) du cartilage. La concentration de ces deux polysaccharides a baissé et est restée en-dessous des valeurs normales pendant toute l'expérience.

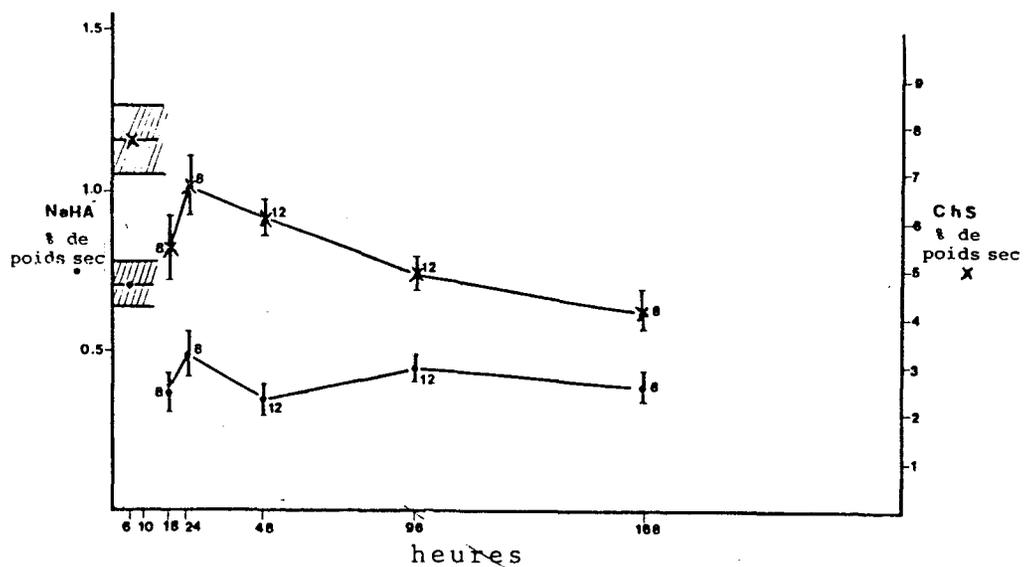


Figure 25. La teneur en NaHA et ChS (% de poids sec tissulaire) du cartilage artulaire est représentée en fonction du temps après injection intra-artulaire de CON A (1,5 mg par articulation) dans l'articulation du genou du lapin.

NaHA - ●
ChS - x

Les barres verticales représentent l'erreur type de la moyenne. Les nombres près de chaque point indique le nombre d'articulations dans chaque groupe. Les barres horizontales près des ordonnées indiquent la moyenne et l'erreur type de la moyenne (surface hachurée) de NaHA (cercle plein) et ChS (triangle plein) du cartilage normal.

Nous avons essayé d'inhiber l'effet de la CON A avec l' α -méthyl-D-mannopyranoside (un inhibiteur de la CON A) qui a été utilisé seul ou avec la CON A. 64 genoux ont été injectés soit avec la SPT ou avec 1,5 mg de CON A, soit avec 3,5 μ g de α -méthyl-D-mannopyranoside ou avec un mélange de 1,5 mg de CON A/ + 3,5 μ g α -méthyl-D-mannopyranoside. Les lavages synoviaux ont été collectés et analysés. Il n'y avait pas de différence dans la teneur en NaHA entre les genoux injectés avec la SPT ou avec l' α -méthyl-D-mannopyranoside seul. De plus il n'y avait pas de différence dans la teneur en NaHA des genoux injectés avec CON A et CON A plus α -méthyl-D-mannopyranoside bien que ces deux groupes aient présenté une teneur en NaHA plus élevée dans les articulations que les animaux injectés avec la SPT ou avec l'inhibiteur seul. Néanmoins, comme seulement une concentration unique de l'inhibiteur a été essayée, il n'est pas sûr qu'il n'y ait pas eu d'inhibition avec des concentrations plus élevées de cet inhibiteur.

Dans une expérience préliminaire nous avons essayé deux autres lectines, l'agglutinine du germe de blé (WGA) et l'agglutinine de soja (SBA) qui ont été injectées dans l'articulation à la même concentration que la CON A (1,5 mg/par articulation). A 96 heures les animaux ont été tués et les articulations lavées et analysées pour leur teneur en NaHA et en protéines. La WGA et la SBA injectées dans le genou n'ont pas provoqué d'augmentation de la teneur en NaHA. La teneur en

protéines par contre a augmenté d'une façon significative comme après l'injection de CON A. Ceci montre que la réaction inflammatoire produite par la WGA et la SBA est de la même intensité que celle induite par la CON A, bien que les deux premières lectines n'aient pas induit une augmentation de la concentration en hyaluronate dans l'articulation. Cette expérience doit être considérée comme de nature préliminaire puisqu'une seule concentration des deux lectines a été utilisée et que les animaux n'ont été examinés qu'à un seul temps après l'injection.

VIII. Fibronectine du cartilage articulaire et du vitré

A. Fibrilles du vitré recouvertes avec de la fibronectine

Dans une première série d'expériences nous avons étudié la présence de fibronectine dans le vitré. Pour ce faire, nous avons préparé des fibrilles de collagène natives à partir du vitré comme il est décrit dans la méthodologie. Après lavage avec SPT, la suspension des fibrilles du gel de collagène a été incubée soit dans le tampon Tris (pH 7,2; 0,1M) seul ou en présence de trypsine ou en présence d'hyaluronidase testiculaire.

Après l'incubation les fibrilles ont été lavées et mises en présence d'anticorps antifibronectine comme il est décrit dans la méthodologie. Après lavage nous avons ajouté l'antisérum anti-IgG de lapin marqué à la fluorescéine, rincé et examiné les préparations sous microscope à fluorescence.

Les résultats sont présentés dans les Figures 26 à 28. La Figure 26 montre que les fibrilles de collagène natives de type II du vitré réagissent avec l'antisérum anti-fibronectine, ce qui permet de conclure qu'à l'état natif ces fibrilles sont recouvertes dans le vitré d'une couche de fibronectine.

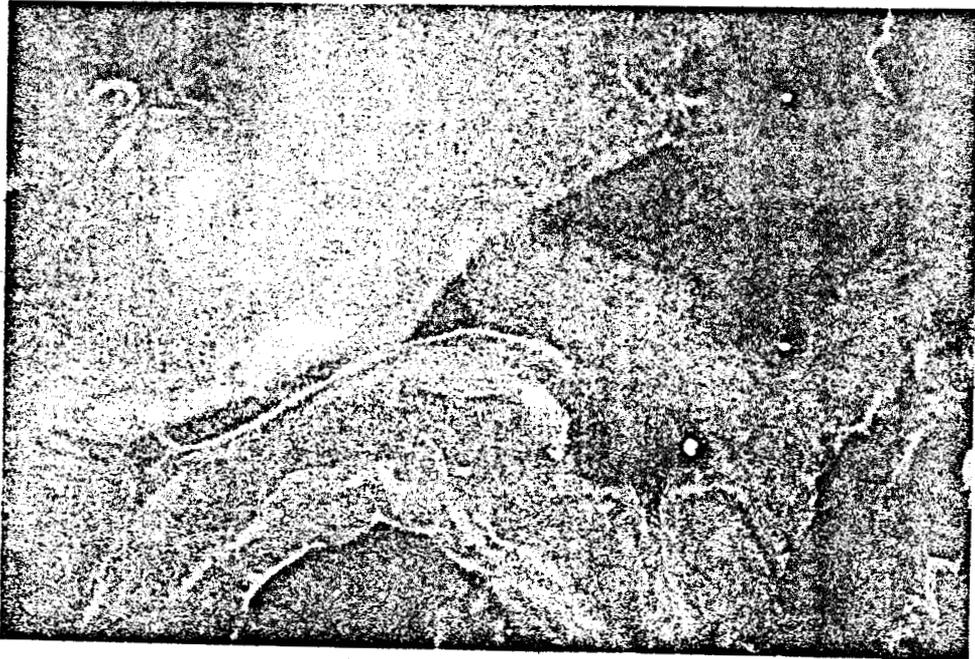


Figure 26. Agrégats de fibrilles natives du vitré réagissant avec l'antisérum antifibrinectine (x25).

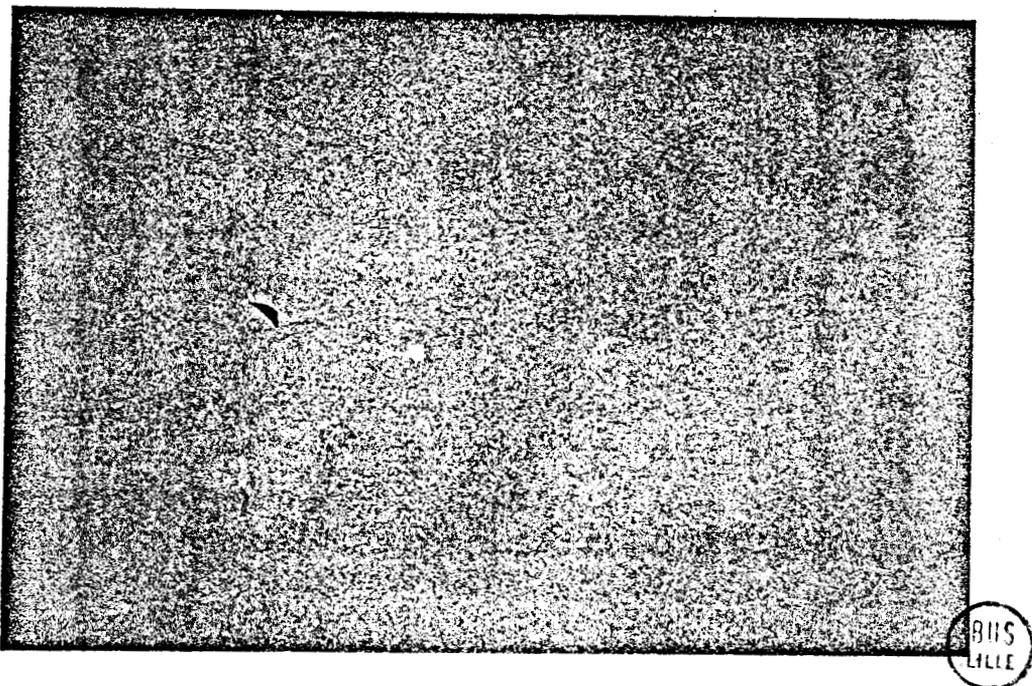


Figure 27. Agrégats de fibrilles natives du vitré après digestion avec de la trypsine, ne réagissant pas avec de l'antisérum antifibrinectine (x25).

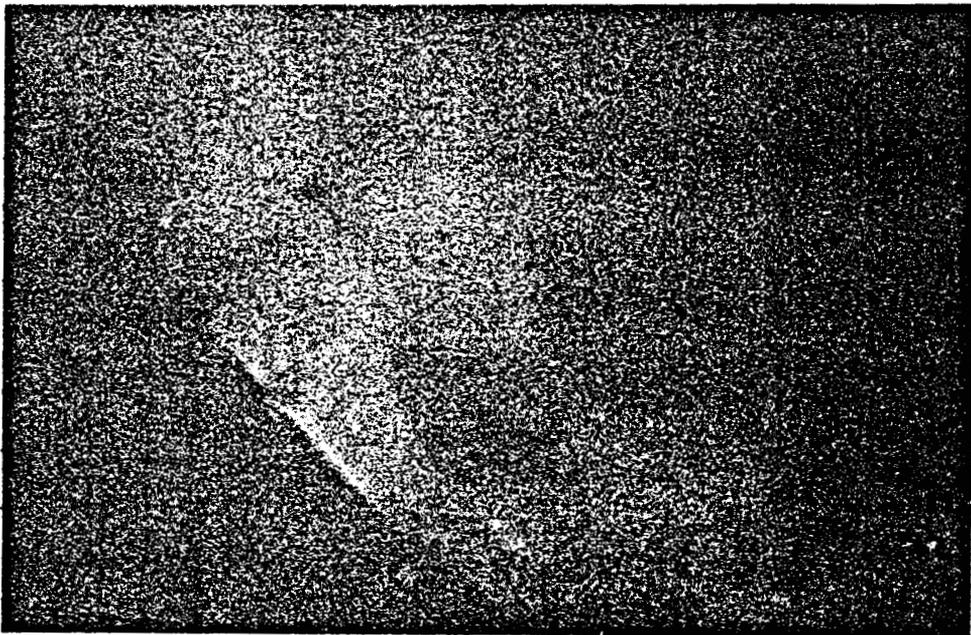


Figure 28. Agrégats de fibrilles natives du vitré après digestion à l'hyaluronidase testiculaire ne réagissant pas avec l'antisérum antifibrinectine (x25).

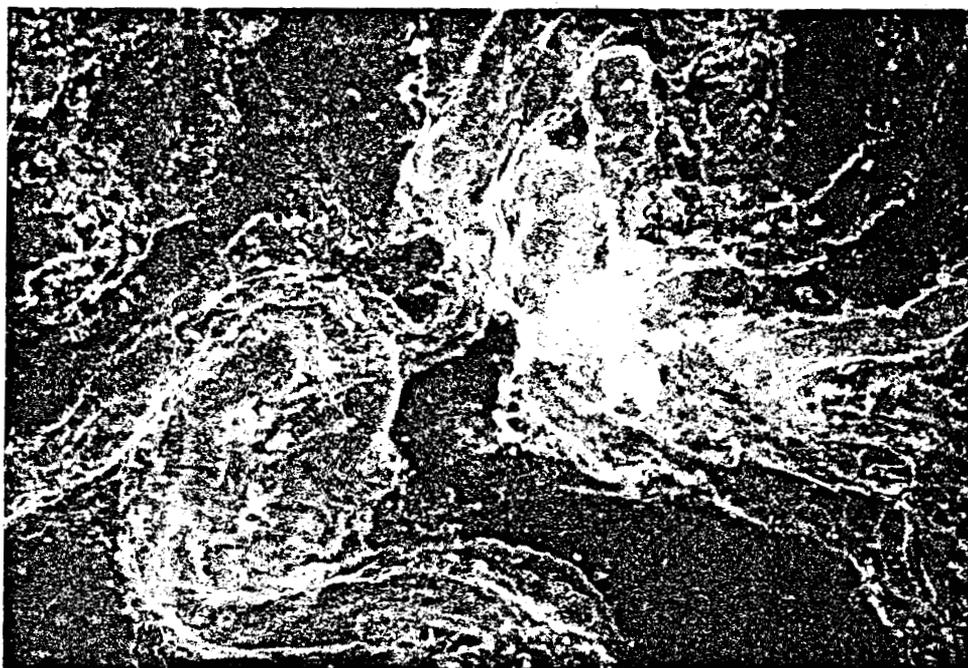


Figure 29. Agrégats de fibrilles natives du vitré après digestion avec la trypsine et traités avec FN purifiée réagissant avec l'antisérum antifibrinectine (x25).

AUS
LILLE

Après digestion à la trypsine ou l'hyaluronidase (testiculaire) la couche de fibronectine disparaît entièrement. Les Figures 27 et 28 montrent l'intensité de la fluorescence obtenue avec les fibrilles traitées avec ces enzymes. Dans tous les cas les contrôles ont été effectués en utilisant soit un sérum de lapin non-immunisé contre la fibronectine soit en réalisant l'extinction de fluorescence en ajoutant de la fibronectine purifiée à la préparation. Dans tous ces cas aucune fluorescence n'a pu être observée autour des fibrilles de collagène.

Nous avons également recherché la présence de fibronectine libre dans le surnageant du vitré centrifugé afin de détecter s'il s'agit d'un équilibre entre la fibronectine soluble et la fibronectine absorbée à la surface des fibrilles du collagène. En utilisant la méthode néphélométrique à laser nous n'avons pas pu mettre en évidence de fibronectine libre dans le surnageant de centrifugation. Nous en concluons que sa concentration est inférieure à environ 0,1 µg/ml, limite de sensibilité de détection de la méthode, si fibronectine il y a.

B. Interaction entre fibrilles de collagène purifiées du vitré et la fibronectine

Afin de confirmer notre conclusion précédente, nous avons mis les fibrilles de collagène (type II) du vitré traité soit avec l'hyaluronidase, soit avec la trypsine en présence d'une part de fibronectine purifiée et d'autre

part, de sérum humain. Après une demi heure d'agitation à 37°C, nous avons lavé ces fibrilles, ajouté l'antisérum antifibronectine et testé par l'immunofluorescence comme décrit ci-dessus. Nous avons constaté que les fibrilles de collagène natives de vitré traitées avec l'hyaluronidase ou avec la trypsine sont capables d'absorber directement la fibronectine à partir du sérum sanguin humain ou encore à partir d'une préparation de fibronectine purifiée (Figures 29 et 30). Il semble donc, que bien que, le complexe natif dans le vitré soit constitué de collagène de type II de NaHA et de fibronectine, ces mêmes fibrilles de collagène soit capables d'interagir directement avec la fibronectine en l'absence de NaHA.

C. Interaction entre les fibrilles de collagène du vitré traitées à la trypsine et la fibronectine purifiée

Afin de confirmer davantage nos conclusions concernant la possibilité des fibrilles de collagène du gel vitré trypsinisés à interagir directement avec la fibronectine, nous avons effectué l'expérience suivante:

Des fibrilles de collagène du vitré ont été traitée avec de la trypsine de la même façon que dans le paragraphe précédent, et ensuite nous avons mis en présence des quantités constantes de fibronectine (270 µg) avec des fibrilles traitées avec de la trypsine. Ces mélanges préparés dans un tampon Tris (pH 7,4) ont été incubés pendant 2 heures à 37°C avec

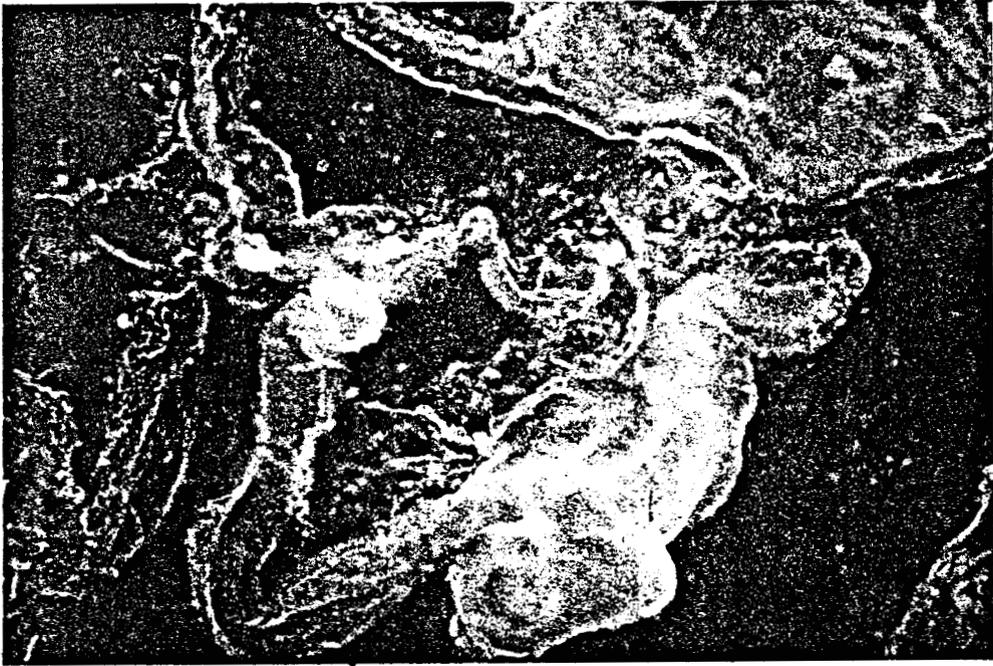


Figure 30. Agrégats de fibrilles natives du vitré après digestion avec l'hyaluronidase testiculaire et traité avec FN purifiée réagissant avec l'antisérum antifibronectine (x25).

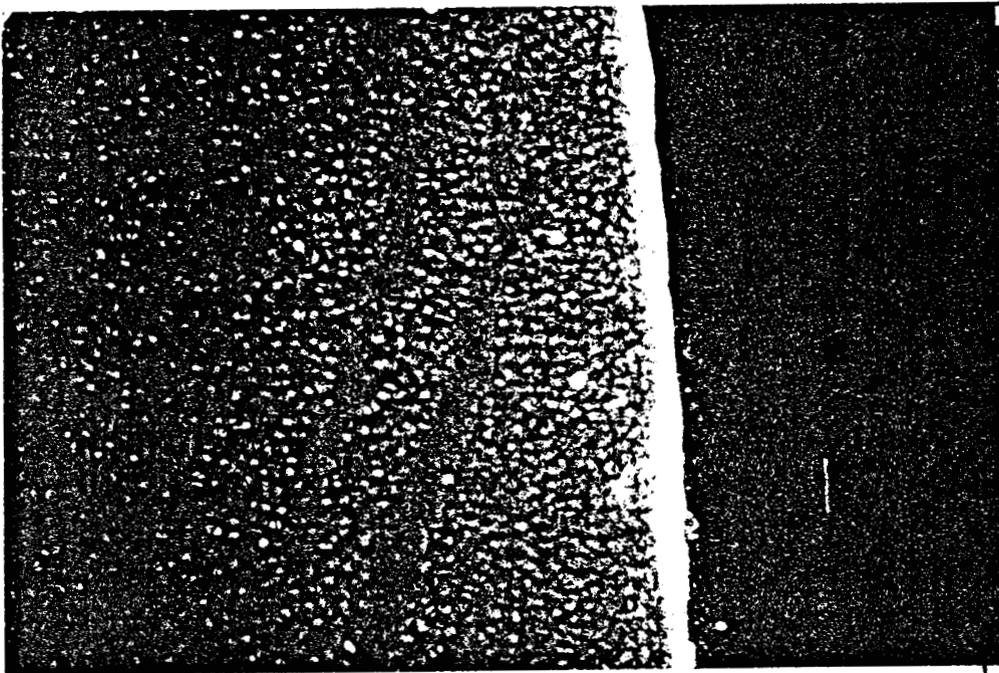


Figure 31. Cartilage articulaire de veau. Couche superficielle réagissant avec l'antisérum antifibronectine (x10).

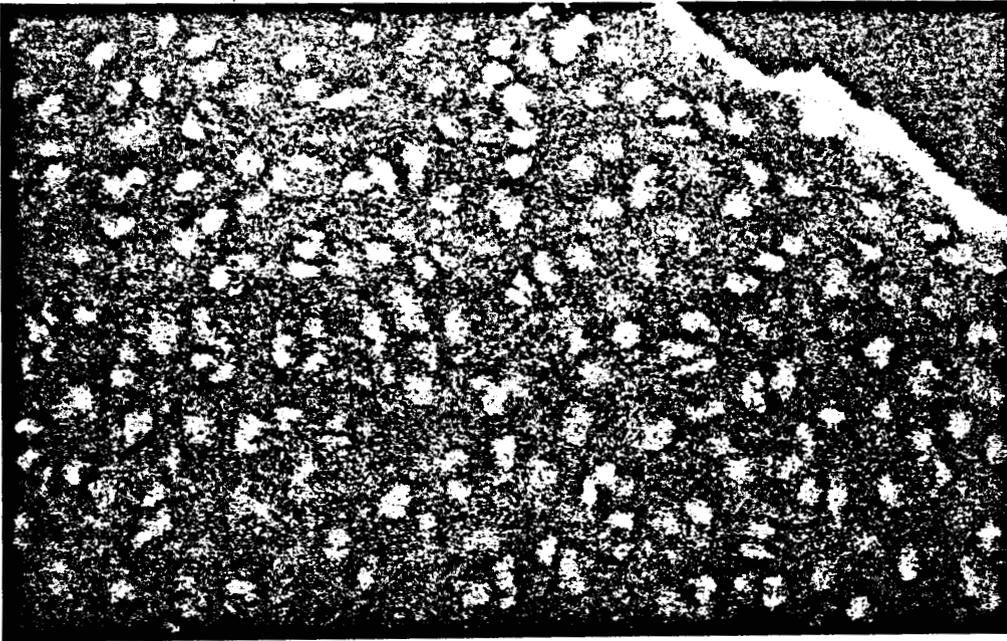


Figure 32. Cartilage articulaire de veau. Les noyaux des chondrocytes réagissant avec l'antisérum antifibronectine (x40).

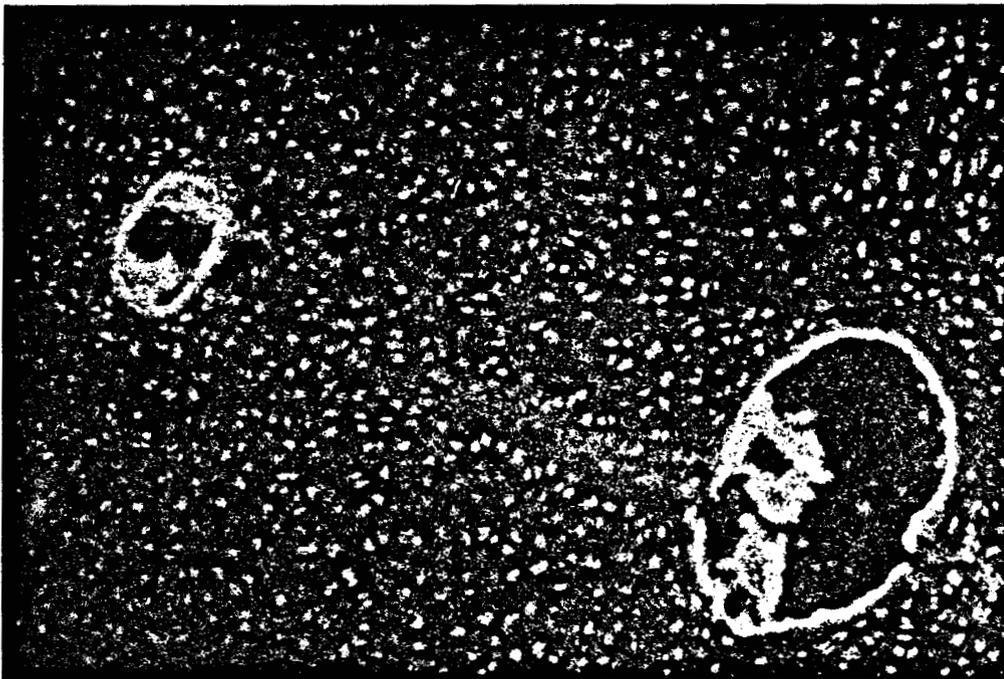


Figure 33. Cartilage articulaire de veau. Au niveau profond les lames basales des vaisseaux réagissant avec de l'antisérum antifibronectine (x25).

015
LILLE

une agitation constante, suivie de centrifugation et par détermination de la fibronectine dans le surnageant par immunonephélogométrie. Cette expérience montre qu'en augmentant la quantité de collagène dans le mélange réactionnel, on constate une diminution (20 - 30%) de la fibronectine dans le surnageant; ceci peut être interprété comme une interaction entre les fibrilles de collagène et la fibronectine, suivie par l'insolubilisation de la fibronectine à la surface des fibrilles de collagène.

D. Fibronectine dans la couche superficielle
du cartilage articulaire

Nous avons déjà exposé dans les chapitres précédents de cette thèse nos conceptions sur les différences de structure de la couche superficielle du cartilage articulaire et de la partie du cartilage située plus profondément. Afin d'explorer la possibilité que la fibronectine peut jouer un rôle dans l'organisation structurale de cette couche, nous avons effectué des études par immunofluorescence sur le cartilage articulaire d'un jeune veau. La Figure 31 montre l'image de l'immunofluorescence obtenue sur le cartilage articulaire du veau. On note une intense fluorescence, située uniquement au niveau de la couche superficielle du cartilage articulaire.

Les Figures 32 et 33 montrent à plus fort grossissement, l'immunofluorescence aussi dans le cartilage plus profond, où on ne note aucune immunofluorescence dans la matrice

intercellulaire. On observe par contre une fluorescence au niveau des noyaux des chondrocytes et aussi dans les lames basales des vaisseaux qui parcourent ce cartilage.

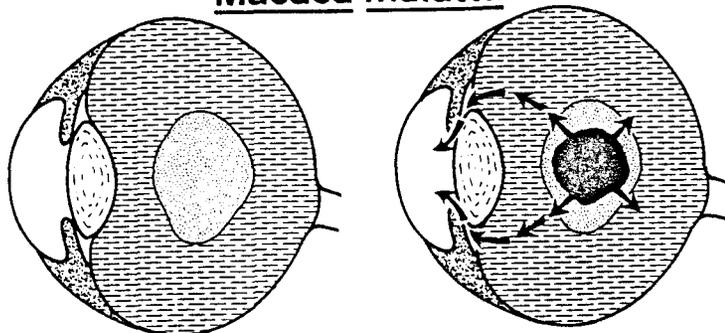
DISCUSSION

I. Exportation du NIF-NaHA des yeux de singes

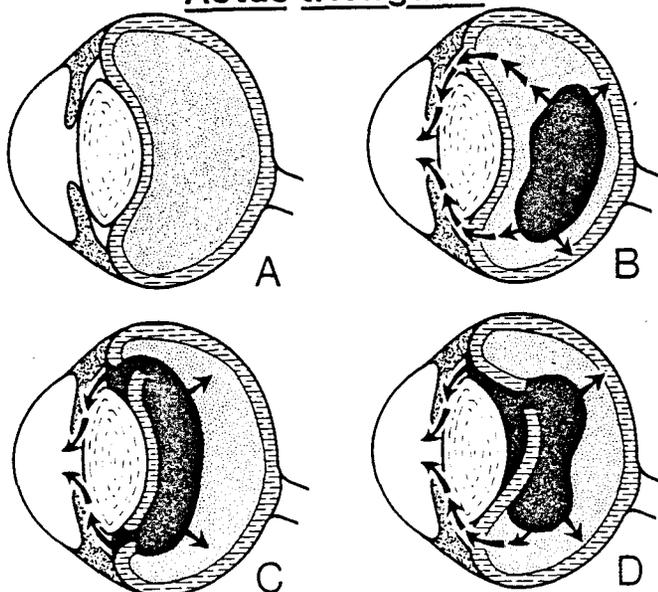
La différence fondamentale entre les yeux des deux singes utilisés dans ces études et rapportée dans cette thèse consiste en une couche corticale gélifiée beaucoup plus large, comparée au liquide vitré central dans le rhésus par rapport à la couche analogue chez le singe nocturne. Ceci est représenté à la page suivante. Ceci veut dire que le gel cortical antérieur qui sépare le liquide vitré, le cristallin et la chambre postérieure est beaucoup plus épais dans l'oeil du singe rhésus que dans celui du singe nocturne. Chez le singe nocturne étudié, 1 ml de liquide vitré ou 45% du vitré total ont été changés. Chez le rhésus étudié, 0,5 ml, c'est-à-dire 21% du vitré total, a été échangé avec NIF-NaHA. Deux conséquences ont été observées de ces différences anatomiques et expérimentales: tout d'abord chez le singe rhésus, l'échange a eu pour résultat beaucoup moins de traumatismes que chez le singe nocturne. Deuxièmement, chez le rhésus, le temps nécessaire pour équilibrer le NaHA du gel et du liquide vitré a été beaucoup plus long que chez le singe nocturne.

Chez le singe nocturne, il y avait une exportation très rapide dans 73% des yeux étudiés. Cette étude basée sur des opérations d'échange très soignées et des observations ophtalmologiques, montre clairement que là où il y avait une vitesse d'exportation du vitré très rapide ($t_{1/2}$: 2-3 jours) le gel cortical antérieur a été endommagé pendant l'échange du liquide vitré et dans les cas d'injection de NIF-NaHA,

Macaca mulatta



Aotus trivirgatus



Gel vitré
 Liquide vitré
 NIF-NaHA injecté

Représentation schématique des voies de passage du NIF-NaHA exogène chez deux espèces de singes. Chez le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), une partie du volume relativement faible (0,5 - 1,1 ml) du liquide vitré est remplacée par 0,5 ml de NIF-NaHA. Puis, l'espace du liquide vitré est encore séparé de la chambre postérieure par une couche épaisse de gel vitré cortical antérieur.

Chez le singe nocturne (*Aotus trivirgatus*), une partie du volume assez élevé (1,8 - 2,2 ml) du liquide vitré (A) est remplacée par 1 ml de NIF-NaHA (B). Ensuite, l'espace du liquide vitré est encore séparé de la chambre postérieure par une mince couche de gel cortical antérieur ou, si ce dernier est endommagé au cours du processus de remplacement (C), le NIF-NaHA injecté s'écoule vers la chambre postérieure et dans l'espace rétro-lenticulaire (D) d'où il est rapidement évacué par l'humeur aqueuse.



une partie de la solution injectée a été véritablement poussée à l'intérieur d'un espace rétrolenticulaire artificiellement créé. Cet espace, facilement visible à la lampe à fente, est accessible à l'humeur aqueuse de la chambre postérieure, c'est pourquoi dans un temps très court, en quelques jours, le NIF-NaHA a été éliminé par lavage à travers la chambre antérieure de l'oeil. La première vitesse d'exportation du NIF-NaHA (voir page 149) a été le résultat d'une opération d'échange. Plus tard, une vitesse plus faible a été trouvée dans notre laboratoire (Hultsch et Balazs, 1975). Dans un faible nombre d'animaux, ces auteurs ont calculé un temps de demi-vie de 16 jours. Les études ont clairement indiqué que chez le singe nocturne la barrière du gel cortical antérieur est maintenue, la vitesse d'exportation est lente. La Figure 1 montre clairement que cette vitesse faible n'est pas constante pendant l'entière période d'exportation du NIF-NaHA du vitré. La vitesse d'exportation pendant les 7 premiers jours est significativement plus rapide que pendant les mois suivants.

Tableau XL. Vitesse d'exportation du NIF-NaHA du vitré du singe

	Temps en jours d'étude	Nombre d'yeux	NIF-NaHA injecté mg	C ₀ mg/ml	a*	K	t _{1/2} jours
Singe nocturne	1-7	33	10	^{xx} 5.23	0.85	0.103	7
	7-100	44	10	2.00 ^x	1.00	0.011	63
Singe rhésus	2-90	40	5	1.55 ^x	1.00	0.033	21

^x C₀ a été déterminé à 48 h pour le rhésus et à 7 jours pour le singe nocturne après injection de NIF-NaHA.

^{xx} C₀ a été calculé à partir de la concentration en NaHA dans le vitré, le volume total du vitré (2ml), la quantité de NIF-NaHA injecté (10 mg) et le volume échangé (1 ml).

* 0,85 est la valeur extrapolée, les autres sont 1,0 par définition parce que C₀ est donné.

La constante de vitesse d'exportation (K) a été calculée d'après l'équation $C/C_0 = -Kt + \ln a$. C₀ est donné dans le tableau. Elle est déterminée par le dosage de NaHA dans le vitré à des temps différents.

t_{1/2} = temps de demi-vie de NIF-NaHA dans le vitré, calculé par l'équation : $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$

Le Tableau XL montre la comparaison de deux constantes de vitesse différentes (K) et du temps de demi-vie t_{1/2}, calculés de la ligne de régression de la Figure 1. Comme la ligne de régression montre un très bon accord des résultats (r = -0,90 entre 1 et 7 jours et r = -0,71 de 8 à 90 jours), et que le nombre des yeux dans les deux groupes est relativement élevé, l'erreur des valeurs calculées pour K et pour t_{1/2} est inférieure à 15%. Ceci veut dire que la différence entre les deux vitesses et les demi-vies est très significative. La signification biologique de cette

différence cependant n'est pas claire. On peut émettre l'hypothèse que le vitré sursaturé de NIF-NaHA (concentration supérieure à 2,0 mg/ml) a différents mécanismes d'exportation. Mais la nature de ces mécanismes n'est pas claire. Naturellement, il est possible que même avec la plus soignée des techniques opératoires, le gel cortical antérieur soit endommagé et qu'une partie du NIF-NaHA injecté soit éliminée par lavage par l'humeur aqueuse. Cette "blessure" du gel cortical antérieur peut "guérir" pendant la première semaine et le mécanisme contrôlé par la diffusion à travers le gel cortical antérieur peut être restauré. Les résultats récents de Laurent et Fraser (1982), utilisant un NIF-NaHA à peu près de la même taille moléculaire que celle utilisée dans cette étude, marquée au tritium sont en bon accord avec la demi-vie très faible constatée par nous à partir du 7ème jour. Ces auteurs ont trouvée un $t_{1/2}$ de 83 jours, qui est dans les limites des erreurs d'expérience, et est en bon accord avec les 63 jours trouvés dans ce travail.

La vitesse d'exportation du NIF-NaHA dans le singe rhésus relève d'un mécanisme plus simple, comme le montre la constance de la demi-vie après deux jours pendant toute la période. Comme le gel vitré est très important en comparaison du volume injecté et du volume du liquide vitré, il faut 48 heures avant que le NIF-NaHA puisse diffuser des poches liquides dans le gel entier (Tableau XI).

C'est pourquoi la constante de vitesse et la demi-vie ont été calculées seulement pour deux jours (Tableau XL). Les résultats utilisés pour le calcul de K et $t_{1/2}$ ont été obtenus de la ligne de régression qui est en bon accord avec les points expérimentaux ($r = -0,81$); l'erreur associée à cette droite calculée est d'environ de 15%. La demi-vie de 21 jours est beaucoup plus courte que la valeur la plus faible constatée chez le singe nocturne. Il faut donc admettre que la vitesse d'exportation de l'hyaluronate endogène et exogène obtenue de cette estimation ainsi que des travaux de Laurent et Fraser (1982) est un processus contrôlé par la diffusion à condition que le gel antérieur ne soit pas endommagé. Ainsi le mécanisme principal contrôlant l'exportation est d'ordre structural, c'est à dire qu'il dépend de la taille des pores entre le cristallin et le processus ciliaires à travers lesquels le NaHA doit diffuser de l'espace vitré vers la chambre postérieure. Ces pores annulaires autour du cristallin sont remplis avec deux types d'éléments structuraux, le gel cortical antérieur et les zonules. La place disponible pour le NaHA pour passer à travers ces "espaces annulaires" dépend de la section de ces pores, de la densité du réseau de collagène formant le gel antérieur et du nombre des fibres zonulaires occupant cet espace. Il faut donc se rappeler que l'espace vitré n'est pas séparé de la chambre postérieure par une lame basale. Comme le flux de l'humeur aqueuse est très rapide en comparaison avec la vitesse de

diffusion du NaHA à travers ces pores, on peut admettre que la concentration du NaHA dans la chambre postérieure n'est pas très différente de celle dans la chambre antérieure, c'est pourquoi il peut être négligé dans nos calculs. Ainsi, on peut s'attendre à des différences entre les espèces correspondant aux différences de structures des organes ci-dessus mentionnés. L'état d'équilibre ("steady state") de la concentration de l'hyaluronate dans le vitré dépendra donc entièrement de sa vitesse de synthèse et de la taille des pores annulaires ainsi que les dimensions du gel cortical antérieur.

Il est intéressant de noter que le décollement de la rétine, une pathologie très grave et qui concerne cet espace anatomique, n'a pas influencé la vitesse de transport de l'hyaluronate (Tableau IX). Ceci est en faveur de la théorie généralement acceptée qu'il n'y a pas de passage d'hyaluronate du vitré via la rétine ou vers l'espace subrétinal, surtout à cause de la présence des lames basales, imperméables à des molécules de cette taille. La théorie selon laquelle la densité du gel cortical antérieur régule le passage de l'hyaluronate est étayée par les résultats selon lesquels le vitré cortical antérieur pathologiquement condensé retient le NIF-NaHA dans le cas où le gel est détaché de la capsule cristalliniennne et ainsi on s'attend à ce que la vitesse d'exportation rapide prédomine (Tableau IX).

Le poids moléculaire naturel (Tableau II) de NaHA chez les macaques rhésus utilisés dans cette étude était nettement inférieur ($p < 0,01$) à celui observé ($2,9 \times 10^6$) ($n=20$) chez les macaques à peu près du même âge élevés librement au Centre d'étude des primates des Caraïbes (Denlinger, Eisner, Balazs, 1980). La seule explication qui peut être proposée est que les femelles utilisées pour les expériences ne produisaient pas d'oestrogènes. La teneur élevée en NaHA dans la peau sexuelle de cette espèce est contrôlée par les oestrogènes. Ceci s'apparente à la régulation hormonale existant dans la crête du coq où la testostérone stimule la synthèse du NaHA (Pour étude, voir Szirmai, 1966).

II. Taille moléculaire de NaHA et stabilité de cette molécule dans la matrice extracellulaire

A. Structure générale

Il est bien connu que l'acide hyaluronique à haut poids moléculaire sous une forme purifiée ou dans la matrice intercellulaire native est très sensible à des systèmes d'oxydo-réduction variés et aux radicaux libres produits par des radiations dans le solvant (pour une revue, voir Sundblad et Balazs, 1966). Une autre observation importante de portée générale, rapporté de nombreuses fois dans la littérature est que l'acide hyaluronique du liquide synovial de l'articulation normale (humaine, bovine ou de cheval) et dans le corps vitré des yeux normaux (homme, singe ou mouton) est très stable, à condition que les échantillons soient prélevés dans des conditions stériles et sans contamination avec des érythrocytes, leucocytes ou d'autres cellules. De telles matrices liquides prélevées dans ces conditions peuvent être conservées à 4°C dans des conditions stériles pendant des mois sans modification de leur viscosité $[\eta]$. Au cours des études rapportées dans cette thèse nous avons fait les mêmes constatations. Le vitré du singe nocturne et le liquide synovial de cheval se sont révélés extrêmement stables quant à leur viscosité quand ils étaient gardés dans des conditions stériles à 4°C. Nous avons par contre constaté des différences considérables dans le comportement du liquide synovial

de lapin. Après élimination des débris cellulaires immédiatement par centrifugation suivie de dialyse du surnageant, ces échantillons sont restés stables si on les garde à 4°C. Il faut néanmoins souligner que ces échantillons n'étaient pas entièrement libre de débris, de composants cellulaires ni de bactéries. On est donc obligé de conclure de ces résultats que des systèmes de dégradation extracellulaires sont ou bien absent ou bien contrôlés par des inhibiteurs.

Tableau XLI. Comparaison de $[\eta]_0$ du vitré et du liquide synovial d'espèces différentes.

		Espèces	$[\eta]_0$ cc/g	n	References
Liquide vitré		singe nocturne	4950 ± 90	133	cette étude
		singe rhésus	3100 ± 190	17	cette étude
		singe rhésus	4210 ± 210	15	Denlinger, Eisner & Balazs, 1980
		homme	5400 ± 140	7	Flood & Balazs, 1979
Liquide synoviale	genou	homme	5000 ± 150	20	Balazs, 1974
	genou	lapin	4060 ± 170	15	cette étude
	jarret	cheval	5260 ± 440	10	cette étude
	carpe	cheval	5250 ± 440	10	cette étude

Si on compare $[n]_0$ dans le liquide vitré et dans le liquide synovial dans cinq espèces différentes (Tableau XLI) on trouve une correspondance remarquable entre les valeurs de ces différentes espèces. Les résultats obtenus sur le matériel humain ont été aussi rapportés sur ce tableau, puisque les déterminations ont été faites exactement dans les mêmes conditions avec la même méthodologie et dans le même laboratoire. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les différentes valeurs excepté pour le singe rhésus dont les paramètres du vitré diffèrent des autres. La valeur moyenne de $[n]_0$ de ces 17 yeux a été inférieure d'une façon significative à celle trouvée dans des études antérieures par ces auteurs (Denlinger, Eisner et Balazs, 1980). La seule explication que l'on peut offrir est l'âge et les différences biologiques entre les deux groupes de singes étudiés. Les singes utilisés dans les études précédentes étaient des mâles et des femelles de 6 - 15 ans en bonne santé, d'une colonie semi-naturelle librement entrecroisés. Les singes utilisés dans cette étude sont des femelles âgées avec des ovaires non-fonctionnels vivant dans des cages. Comme les échantillons de leur liquide vitré ont été aussi très stables, il faut admettre que la différence constatée est due à des conditions hormonales ou à l'âge. Les femelles de cette espèce ont une peau sexuelle très riche en acide hyaluronique beaucoup plus que la peau normale et ceci à cause de l'effet stimulant des oestrogènes (pour une revue voir Szirmai, 1966). Il est intéressant de noter que la concen-

tration en NaHA du liquide vitré de singe de la colonie vivant librement est de $149 \pm 9 \mu\text{g/ml}$ ($n = 20$) contrairement aux singes de cette étude : $120 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ ($n = 38$). Cette différence est significative ($p < 0,05$) et suggère que le vitré est aussi un organe cible des oestrogènes, le taux des oestrogènes circulant peut influencer sa teneur en NaHA.

B. Le liquide vitré

Après l'injection de NIF-NaHA dans le vitré, pour remplacer la moitié (dans le singe nocturne) ou le quart (le singe rhésus) du volume du vitré total, la viscosité $[\eta]_0$ a été toujours inférieure quand on l'a mesurée pendant les trois premières semaines après l'opération. Il est important de noter que ces valeurs inférieures n'étaient jamais en-dessous de $[\eta]_0$ du NIF-NaHA injecté, ce qui suggère que la préparation injectée n'a pas été dégradée.

Dans une expérience effectuée par l'auteur et non-décrite dans cette thèse, on a injecté de l'endotoxine dans l'oeil pour déclencher une inflammation. Quelques jours plus tard on a injecté du NIF-NaHA avec l'endotoxine. La viscosité $[\eta]_0$ du NaHA dans le vitré 7 jours après l'injection au maximum de la réaction inflammatoire n'a pas été altérée (Denlinger, Balazs, Nakano, Ronner et Velazquez, 1978). Ceci indique que la présence de cellules inflammatoires et une teneur en protéines élevée dans le vitré ne provoquent pas de dégradation de NIF-NaHA injecté. Après injection d'endotoxine, la viscosité du NaHA endogène n'a pas été affectée.

La viscosité $[\eta]_0$ du NaHA dans les yeux du singe reste égale à celle de la préparation de NIF-NaHA injectée pendant un temps très long. Quand la vitesse d'exportation est faible il faut 84 jours avant qu'elle retourne à sa valeur normale. Avec une vitesse d'exportation rapide, après 23 jours déjà, la valeur élevée de $[\eta]_0$ réapparaît (Tableau IV). Comme le vitré avec une vitesse d'exportation rapide a une teneur en NaHA en-dessous de la valeur normale, il faut admettre que cette faible valeur de $[\eta]_0$ représente celle du NIF-NaHA injecté au moment où la régénération n'a pas encore commencé.

Dans les yeux avec une vitesse d'exportation lente, à 83 jours la concentration en NaHA et $[\eta]_0$ sont toutes les deux approximativement normales. Ceci doit correspondre au commencement d'une synthèse normale à un temps précoce et au remplacement déjà effectué de NaHA injecté par le NaHA néoformé.

En conclusion, les traumatismes associés à une vitesse d'exportation rapide paraissent endommager la synthèse de NaHA où le système chargé de la synthèse de NaHA qui commence à être opérationnel des mois plus tard par rapport à sa récupération quand le gel cortical antérieur n'est pas endommagé. Si la cause de la concentration faible en NaHA, entre 23-82 jours, était uniquement la destruction de la barrière entre le vitré et la chambre postérieure, la viscosité $[\eta]_0$ du NaHA devrait être normale, malgré sa faible concentration. Le fait qu'elle ne l'est pas suggère que la synthèse normale n'a pas encore commencé.

C. Liquide synovial.

D'après les diverses études menées dans ce domaine, il existe aucune preuve concluante de la présence d'un agent enzymatique, oxydant ou du type radical libre qui altérerait le NaHA dans le liquide synovial des articulations enflammées (Ropes, Robertson, Rossmiesl, Peabody et Bauer, 1947; Ragan et Meyer, 1949; Sundblad, 1965; Greenwald, 1981). Greenwald et Moy (1980) ont suggéré que les "radicaux libres dérivés de l'oxygène" produits par des granulocytes neutrophiles dans l'articulation malade, peuvent provoquer des ruptures dispersées dans la chaîne de NaHA. Ces dernières suffiraient à justifier la baisse de $[\eta]_0$ de NaHA. Aucun système de vérification de cette réaction dans le liquide synovial n'a été proposé. Il ne faut pas oublier que la $[\eta]_0$ de NaHA, même dans des articulations souffrant de très graves affections d'origine rhumatismale ou traumatique, est de 2000 - 4000 cc/g, soit 30 - 70% de la valeur normale. L'utilisation de colonnes de billes de verre à pores calibrés, a montré que cette baisse de la taille moléculaire n'est pas due à une altération fortuite de la chaîne du NaHA et à une augmentation conséquente de la polydispersité, mais plutôt à l'apparition de plusieurs espèces moléculaires de NaHA de taille inférieure. Selon l'étiologie et le degré de gravité de l'arthrite, des molécules de NaHA de taille inférieure (Balazs, Briller et Denlinger, 1981). Il est très difficile de concilier ces résultats avec la notion de présence d'un agent "altérant" du type radical libre dans le liquide synovial pathologique provoquant une "rupture éparpillée des maillons

covalents" des longues chaînes de NaHA (Greenwald, 1981).

L'un des résultats les plus intéressants des travaux présentés dans cette thèse est qu'aucun des deux modèles d'arthrite relevant de la chirurgie (instabilité et immobilisation) n'a modifié le $[\eta]_0$ du NaHA. Dans ces derniers, la présence d'une réaction inflammatoire grave a été mise en évidence par une teneur élevée en protéines, accompagnée dans les articulations immobilisées, d'un épanchement.

L'injection de SPT dans l'articulation saine du lapin ou du cheval ou dans les articulations instables et immobilisées du lapin n'a pas non plus modifié la $[\eta]_0$. Ce qui implique que la synovite bénigne ou grave résultant de ces divers traumatismes affectant l'articulation, n'altère pas la taille moléculaire de NaHA dans cette dernière.

Ce qui est plus important encore, est que 48 heures après injection de CON A dans les genoux du lapin, la $[\eta]_0$ dépasse considérablement la normale. Cette augmentation ne coïncide pas avec le niveau maximum de la teneur en NaHA, atteint 24 heures après injection intra-articulaire. La forte teneur en protéines du lavage synovial au cours de toute la période d'expérimentation (168 heures) et l'augmentation du diamètre de l'articulation indiquent que l'injection de CON A a provoqué une grave synovite. Il est important de remarquer que l'élévation de la teneur en protéines, en NaHA et de $[\eta]_0$ ne coïncident aucunement. Ce qui impliquerait l'existence du mécanisme suivant: la CON A pourrait provoquer une inflammation non spécifique du tissu synovial

qui déclencherait une dilatation vasculaire et entraverait l'irrigation lymphatique de l'articulation. Par conséquent, la vitesse de sortie de NaHA diminuerait et sa teneur dans l'articulation augmenterait. Mais la CON A stimule aussi spécifiquement les cellules synoviales qui, comme tous les macrophages, disposent de récepteurs de cette molécule. Cette stimulation entraîne la production d'une espèce moléculaire de NaHA de taille inférieure qui, en raison de sa taille, est évacuée de l'articulation à plus grande vitesse. La teneur en NaHA de cette dernière diminue donc. L'effet de la CON A sur les cellules synoviales ne dure pas aussi longtemps que l'ensemble de ses effets inflammatoires. L'accumulation de NaHA dans le tissu synovial est de 3 fois supérieure au niveau normal alors que dans le liquide synovial son augmentation est de 2 fois supérieure. La teneur en NaHA de l'articulation revient à la normale 96 heures après l'injection; la teneur en NaHA dans le tissu synovial revient à la normale dans le même temps.

L'effet de la CON A n'a pas été retrouvé avec l'injection d'une concentration équivalente de 2 autres lectines (WGA et SBA). Puisque l'effet inflammatoire de ces deux dernières a été aussi grave que celui de la CON A, il faut en conclure avec prudence que les cellules productrices de NaHA ne disposent sur leur surface que de récepteurs à la CON A.

Des expériences faites avec l'inhibiteur de la CON A

(α -methyl-D-mannopyranoside) ont été peu concluantes, probablement parce qu'une injection de ce carbohydrate de faible poids moléculaire n'a pas provoqué l'élévation de la teneur en NaHA autour des cellules à un niveau et pendant une durée suffisants pour compenser l'effet de la CON A.

III De la teneur en hyaluronate de sodium dans les articulations du cheval et du lapin

A. Cheval

La teneur en NaHA dans diverses articulations de cheval a déjà été déterminée (Persson, 1971). Les valeurs communiquées sont très proches de celles qui figurent dans cette thèse (voir p. 203-204). Par suite d'une grande dispersion des valeurs observées, Persson n'a pas trouvé de différences significatives entre la teneur en NaHA dans le jarret et le carpe. Les valeurs moyennes de la que nous avons relevées sont supérieures à celles mentionnées dans l'étude de Persson. Cependant, pour les mêmes raisons statistiques, les différences entre les résultats des deux études sont minimales.

L'injection de NIF-NaHA ou de SPT dans les articulations normal du cheval n'a provoqué aucune modification de la taille moléculaire du NaHA dans le liquide synovial.

L'augmentation de la teneur en protéines indique la nature traumatique de l'arthrocentèse. La synovite qu'elle provoque a souvent persisté pendant plusieurs semaines (Tableau XXV) mais aucun des échantillons de liquide synovial prélevés pendant cette période n'a révélé le moindre indice de la présence de molécules de NaHA de taille moléculaire inférieure à la normale.

La Figure 34 montre le schéma d'elution de liquides synoviaux d'équidés sur des colonnes de billes de verre à pores calibrés. Les fractions sont établis par dosage de l'acide hexuronique.

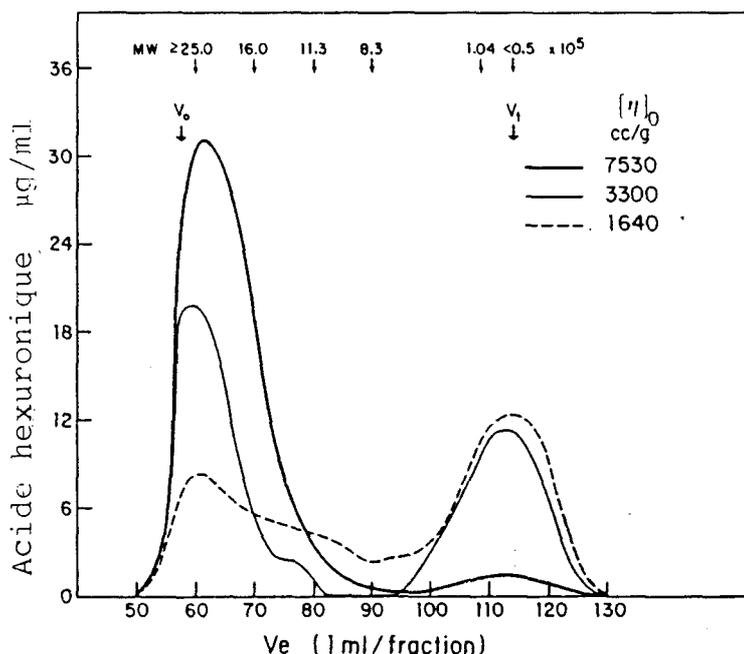


Figure 34 Fractionnement de liquides synoviaux normaux et arthritiques sur colonnes de billes de verre à pores calibrés. La $[\eta]_0$ d'un liquide normal (courbe pleine) et des deux liquides arthritiques sont présentées. Les poids moléculaires (flèches) indiquent la position des maxima atteints par les préparations de NaHA dont le poids moléculaire est connu.

La $[\eta]_0$ a été déterminée à partir d'un échantillon de liquide synovial avant fractionnement. La figure présente, outre la courbe d'elution du liquide normal, celles de deux liquides arthritiques à titre de comparaison. La courbe d'elution du liquide normal ne montre qu'un petit pic contenant de l'acide hexuronique (5%) de très bas poids moléculaire, et qui ne renferme pas de NaHA. Le grand pic presque symétrique, indique que toutes les molécules de NaHA ont une $[\eta]_0$ supérieure à 2 500 cc/g. Par contraste, les deux liquides arthritiques montrent clairement la présence des molécules de NaHA d'une $[\eta]_0$ inférieure à 2 500 cc/g. De plus, un grand pic de bas poids molécu-

laire a également été observé. La fraction collecté à partir de ce pic ne contient au total que 40 - 60% de NaHA. Le reste est très probablement constitué par des molécules de ChS. Ce qui est important est que les 18 liquides synoviaux prélevés dans les 2 articulations du carpe et celles des 4 jarrets, 2 - 14 jours après l'injection de NIF-NaHA, ont montré un schéma de répartition identique à celui des liquides synoviaux avant injection chez les mêmes chevaux. Ceci montre que les stimuli inflammatoires légers provoqués par l'arthrocentèse ne constituent pas un élément susceptible de favoriser l'apparition de molécules de NaHA de taille inférieure à la normale.

B. Lapin

Dès 1953, Sundblad a mesuré le volume total de NaHA dans l'espace articulaire et suggéré que ce volume plutôt que la concentration reflète les modifications pathologiques des articulations. Dans le cas d'un traumatisme articulaire par exemple, au fur et à mesure que l'effusion augmente, la concentration en NaHA décroît au-dessous de la normale. Par contre, le volume total de NaHA dans l'espace articulaire se situe nettement au-dessus de la normale. Le rhumatisme articulaire (ou l'osteo-arthrite avec épanchement) provoque une augmentation importante de la teneur en NaHA dans l'articulation. Aucun rapport n'a cependant été établi entre le volume de l'épanchement et la teneur en NaHA (Sundblad, 1953, 1965; Mäkinen, 1958).

Ainsi, afin d'étudier le métabolisme du NaHA dans l'espace articulaire dans des conditions pathologiques, il ne suffit pas de déterminer sa concentration dans le liquide synovial. Il faut mesurer la teneur totale en NaHA de l'espace synovial. Cette thèse décrit la méthode conçue à cet effet et appliquée à l'articulation du genou du lapin. Elle fournit une détermination quantitative et reproductible du NaHA dans une fourchette de 0,1 à 2,0 mg par articulation. Si 10 lapins sont utilisés pour chaque expérience, soit 10 genoux témoins et 10 sujets témoins, la méthode n'enregistre que 15% d'erreurs.

Nous avons pu ainsi établir une excellente corrélation entre le volume de NaHA déterminé dans l'articulation du lapin avec cette méthode et les données antérieures sur la teneur en NaHA dans le liquide synovial. Sundblad (1953) a établi la teneur en NaHA sur 2 échantillons de liquide synovial prélevés à l'aide d'une pipette dans les articulations du genou de 5 lapins. La teneur en NaHA, dans 2 échantillons de 5 genoux chacun était en moyenne de 3,89 mg/ml. Toujours selon Sundblad, le volume de liquide synovial prélevé dans chaque articulation était inférieur à 0,1 ml. Les études menées dans le cadre de cette thèse montrent que sur 45 genoux de lapins, la teneur moyenne en NaHA est de 0,281 mg par articulation. Ce qui correspond à 3,89 mg/ml de NaHA en supposant que le volume réel de liquide synovial prélevé par Sundblad dans chaque articulation était de 0,072 ml, soit moins de 0,1 ml.

Dans la même étude, Sundblad a également déterminé le $[\eta]_0$ dans le liquide synovial du genou de lapin. En utilisant des méthodes et un solvant analogues aux nôtres, il a trouvé une $[\eta]_0$ moyenne de 3740 cc/mg, compatible avec la valeur moyenne que nous avons obtenue, $4,060 \pm 170$ cc/g; ce résultat suggère que lors de l'opération de lavage, la $[\eta]_0$ ne se modifie pas. Les articulations ont été lavées avec du SPT et la $[\eta]_0$ a été déterminée (Balazs, Watson, Duff, et Roseman, 1967). Il est intéressant de remarquer que la $[\eta]_0$ trouvée dans les 1er, 2ème et 3ème lavages était identique. Elle était également semblable à celle trouvée dans les échantillons de liquide synovial prélevés par aspiration avant lavage des articulations. Cette observation montre aussi que le lavage de l'articulation n'altère pas le volume moléculaire du NaHA présent dans l'espace synovial.

En comparant la teneur en NaHA du liquide articulaire normal de différentes espèces (voir Tableau XLII), il est clairement apparu que les articulations des équidés et bovins, qui possèdent un volume élevé de liquide synovial, présentent la teneur la plus basse en NaHA, alors que les articulations du lapin et de l'homme, dont le volume de liquide synovial est 50 à 100 fois inférieur, ont une teneur en NaHA 5 à 10 fois plus élevée. Les écarts de $[\eta]_0$ entre les articulations des humains, des bovins et des équidés ne sont pas importants. Par contre, dans le liquide synovial du lapin, la $[\eta]_0$ est nettement inférieure.

Tableau XLII. Comparaison des teneurs en NaHA dans les liquides synoviaux de différentes espèces.

Espèce	Articulation	Volume du liquide synovial	Contenu en NaHA			Ref.
			mg par articulation	mg par ml	[n]₀	
Labin	Genou	≤ 0.1		3.89	3740 ± 220	1
		0.07*	-0.28 ± 0.02		4060 ± 170	2
Cheval	Jarret	40		0.45 ± 0.11	8400 ± 3300	3
		(25)		0.41 ± 0.06	6490 ± 430	2
	Carpe	15	7.35	0.49 ± 0.13	8300 ± 1200	3
				8.55	0.57 ± 0.07	6350 ± 540
Bétail	Jarret	13	3.96	0.33 ± 0.03	6420 ± 410	4
	Carpe	5	4.00	0.80 ± 0.05	8320 ± 590	4
Humain	Genou	0.3	0.74	2.49 ± 0.01	5500 ± 200	5

Toutes les données ont été obtenues des articulations saines de jeunes adultes.

1. Sundblad (1953)
2. Cette étude
3. Persson (1971)
4. Seppälä and Balazs (1969)
5. Balazs (1969)

* Valeur estimée



Il est possible d'évaluer la teneur totale en NaHA dans l'articulation du genou du lapin et la proportion de NaHA présente dans la couche superficielle du cartilage, dans les tissus et le liquide synoviaux (Tableau XLIII).

Tableau XLIII. Teneur totale en NaHA dans une articulation saine du genou du lapin

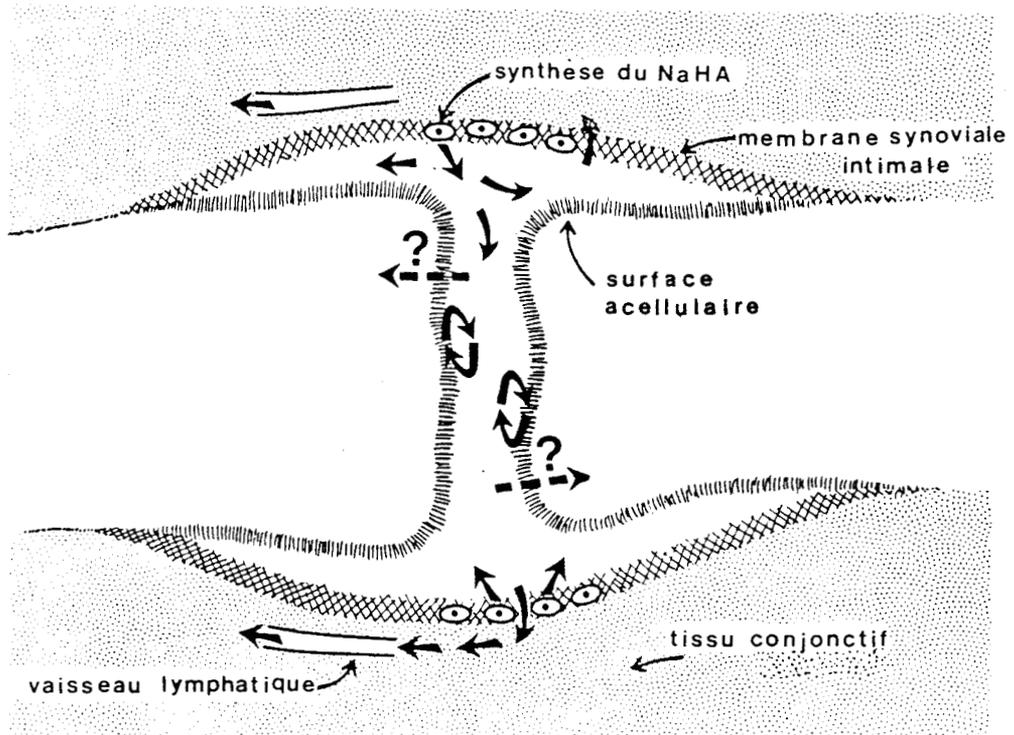
	Volume* ml	Contenu en NaHA mg	Concentration en NaHA mg/ml
Liquide synovial (lavage)	0.071	0.28	3.9
Cartilage Couche superficielle.	0.0012	0.018	15.0
Tissu synovial.	0.5	3.6	7.2**
Total	0.5722	3.898	-

* Volumes, et dans les cas de tissu synovial, les poids humides ont été estimés.

** Cette estimation est basée sur le dosage de NaHA dans le tissu synovial (0,43% du poids sec) (Table XXVIII) correspondant à 0,12% du poids humide. De surcroît, il est admis que l'espace disponible pour le NaHA dans la matrice représente 40% du volume total du tissu hydrate.

Ces calculs montrent clairement que le tissu synovial occupe le volume le plus élevé dans ces trois compartiments matriciels (87% de l'espace total) et présente la teneur totale la plus importante en NaHA (92% du total). Cette dernière est cependant plus élevée dans la couche superficielle du cartilage.

Toutes les données expérimentales disponibles actuellement suggèrent que le NaHA est synthétisé par les cellules du tissu synovial les plus proches du liquide synovial et qu'il est transporté par les vaisseaux lymphatiques vers les couches plus profondes du tissu synovial. Ces voies sont schématiquement représentées ci-dessous.



Les différences de concentration en NaHA dans les 3 compartiments de l'articulation ne peuvent être maintenues que si les molécules de NaHA sont transportées entre ces derniers par écoulement global, selon un système complexe de pompage actionné par les mouvements constants de l'articulation. Les résultats de ces mouvements sont: en premier lieu, le maintien d'une teneur très élevée en NaHA dans la couche superficielle du cartilage par l'introduction de ces molécules dans le réseau fibrillaire du collagène; en second lieu, l'échange constant de NaHA entre le liquide et les tissus synoviaux; enfin, l'évacuation du NaHA excédentaire du tissu synovial pompée par les vaisseaux lymphatiques. Ainsi on peut prédire, après immobilisation de l'articulation, un accroissement du volume du liquide synovial et de la teneur en NaHA dans le

liquide et le tissu synovial. Ces observations faites dans le cadre de cette thèse confirme entièrement cette hypothèse.

IV. NaHA à la surface du cartilage

Le fait que la teneur en NaHA de la surface du cartilage diminue après le lavage de l'articulation de $46 \pm 6 \mu\text{g}$ signifie qu'à peu près 16% du NaHA total contenu dans le lavage vient probablement de cette surface. Ceci ne veut pas dire que cette quantité de NaHA est absorbée à la surface du cartilage, mais indique simplement que les molécules de NaHA sont enchevêtrées à la couche superficielle de collagène. Cette couche de collagène est probablement celle qui a été identifiée sur l'image EM (Figure 18) comme la couche supérieure d' $1 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Le changement visible de cette couche après le lavage de l'articulation (Figure 19) suggère qu'approximativement deux tiers du NaHA et probablement d'autres molécules sont prélevés de la couche supérieure.

Il est possible d'évaluer la concentration en NaHA de la couche supérieure du cartilage. Si l'on suppose que cette couche dans l'articulation du lapin est épaisse de $3 \mu\text{m}$ et que la surface totale à partir de laquelle a été collecté par épongement le NaHA est de 4 cm^2 , le volume total est d'alors $0,0012 \text{ cc}$. De plus il a été supposé que seulement $18 \mu\text{g}$ du NaHA prélevé par épongement après que l'articulation ait été lavée vient de cette surface de $3 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Par conséquent la concentration en NaHA de la surface du cartilage est de $0,018 \text{ mg} / 0,0012 \text{ cc} = 15 \text{ mg/cc}$. Ceci est 4 à 5 fois la concentration en NaHA évaluée dans le liquide synovial du lapin ($3,9 \text{ mg/ml}$; Sundblad, 1965).

Ce résultat doit être du même ordre que d'autres concentrations élevées trouvées dans les tissus humains. Pour certains genoux d'humains adultes normaux, la concentration en NaHA du liquide synovial était de 4,5 mg/ml et pour le liquide de ganglions humains de 10 à 20 mg/ml (Balazs, communication personnelle). Il est possible de supposer que cette concentration élevée de NaHA est le résultat de deux facteurs. D'une part, la pression constante et les mouvements de l'articulation diarthrodial se répercutent sur le liquide synovial et le pousse, avec ses molécules de NaHA, dans le réseau fibrillaire lâche du collagène de la surface du cartilage. D'autre part, l'effet de tamis que ce réseau fibrillaire exerce et qui ne permet pas aux grandes molécules de NaHA d'être poussées trop loin dans le cartilage. Comme l'eau est le solvant du NaHA du liquide synovial, et que les petits composants moléculaires peuvent pénétrer dans les couches supérieures du cartilage articulaire, l'hypothèse selon laquelle les échanges de métabolisme de la couche supérieure du cartilage articulaire se font par liquide synovial est généralement acceptée.

V. Teneur en protéines de l'articulation et réaction inflammatoire provoquée par différents mécanismes de contraintes

La barrière entre le sang et le liquide synovial comporte deux éléments structuraux: la paroi endothéliale des vaisseaux et le liquide synovial. Les nombreux capillaires qui se trouvent dans la proximité immédiate (100 - 200 μ m) de la surface synoviale ont des fuites à cause de leurs fenestrations (Sutter et Majno, 1964). On comprend ainsi que des molécules protéiques puissent passer dans l'espace intercellulaire (Renkin, 1979).

Le deuxième composant de la barrière est la matrice qui contient plus de NaHA que la plupart des matrices des tissus conjonctifs. Si nous admettons que les cellules, le sang et les vaisseaux lymphatiques et les fibres de collagène occupent 60% de l'espace tissulaire, ainsi en nous basant sur les données rapportées dans cette thèse, nous pouvons calculer une concentration en l'hyaluronate de la matrice du tissu synovial du lapin, de 7,3 mg/ml. Cette valeur est beaucoup plus élevée que la concentration en NaHA estimée dans le liquide synovial (2,9 mg/ml). Une matrice avec une teneur aussi élevée en hyaluronate doit exercer sans aucun doute un effet non négligeable sur le passage des macromolécules. Il a été proposé par plusieurs auteurs que le mouvement des protéines du sang vers le liquide synovial est régulé par la matrice du tissu synovial contenant l'hyaluronate. Dans un système modèle, il a été

démontré que les mouvements translationnels des protéines dans une solution d'hyaluronate sont retardés (Laurent et Obrink, 1972; Obrink et Laurent, 1974; Preston, Obrink et Laurent, 1973). Ces auteurs ont calculé que dans une solution d'hyaluronate à 10 mg/ml la diffusion de la sérum albumine est réduite à la moitié de sa valeur normale.

L'autre phénomène structural qui influence le passage des protéines par la matrice est l'effet d'exclusion stérique exercé par l'hyaluronate. Ainsi par exemple, une solution de NaHA à 5 mg/ml exclut 25% de l'espace de la solution pour la sérum albumine (Laurent, 1964).

Le passage des protéines à travers la membrane synoviale est cependant compliqué davantage par le fait que ce tissu ne représente pas un système non-perturbé dans lequel la diffusion ou le flux constant contrôlent le mouvement des molécules. Le tissu synovial est perturbé et déformé à tout moment par l'articulation diarthroïdale. Plus encore, quand l'articulation est soumise à une charge, le tissu synovial est comprimé entre la capsule (tendons) et la surface du cartilage. Dans ces conditions le tissu synovial, comme le liquide synovial se trouve sous une pression constamment variable. La pression intra-articulaire dans l'articulation normale montre de grandes variations. Des valeurs négatives ont été rapportées quand l'articulation est étirée tout en étant soumise à une pression de plusieurs centaines de mm de Hg.

La pression dans l'articulation arthritique avec effusion non-chargée peut être 2 - 3 fois plus élevée (400 - 500 mm Hg) que dans la même articulation avec charge (pour une revue voir Jayson, 1981). Le mécanisme de régulation du passage des protéines par la matrice remplie de NaHA dans un système dynamique est très difficile à évaluer. Comme les études sur des modèles concernant le passage des macromolécules dans une matrice de collagène remplie de NaHA sont sujettes à des variations de pression et d'agitations, n'ont pas encore été effectuées, toute spéculation nous paraît utile.

Tableau XLIV. Concentration en protéines dans le liquide synoviale normale d'espèces différentes.

Espèces	Artic.	Protéines (mg/ml)		Références
		Jeune Adulte	Adulte âgé	
Humain	genou	20.5 ± 0.8	18.5 ± 2.6	Balazs, 1974
Bovine	carpe	14.2 ± 1.7	23.2 ± 3.0	Seppälä and Balazs, 1969
	jarret	7.7 ± 0.8	9.4 ± 0.9	
Cheval	carpe	23.9 ± 3.2	-	cette étude
	jarret	14.6 ± 2.6	-	
Lapin	genou	30 ± 2 *	-	cette étude

* Estimé sur la base d'une teneur en protéines de 3,0 ± 0,2 mg trouvée dans le lavage d'un genou normal et 0,1 ml de liquide synoviale.

Quel que soit l'effet de NaHA sur le passage des protéines dans le tissu synovial, il n'empêche pas l'augmentation de la teneur en protéines plasmatiques dans l'articulation pendant l'inflammation. La concentration en protéines dans le liquide synovial normal varie légèrement d'une articulation à l'autre ainsi qu'avec l'espèce et l'âge (voir Tableau XLIV.). La raison de cette variation est inconnue. La teneur en protéines calculée dans l'articulation du genou du lapin n'est que légèrement supérieure à celle de l'articulation humaine. Les valeurs chez le lapin pourraient être plus élevées que la valeur réelle à cause de la sous-estimation du volume du liquide synovial ($\sim 0,1$ ml) ou à cause du fait que les lavages articulaires contiennent aussi certaines des protéines cellulaires des tissus avoisinants.

Dans tous les modèles expérimentaux utilisés dans cette étude, la teneur en protéines de l'articulation a été élevée (voir Tableau XLV) et d'une façon significative. Cette augmentation a été moins sévère un simple traumatisme qu'après des traumatismes multiples comme par exemple l'insertion d'une aiguille. Elle a été aussi moins marquée après l'injection de SPT, la section du cartilage et dans l'articulation déstabilisée comme après l'application d'un agent inflammatoire comme l'ovalbumine ou la CON A. D'une façon intéressante, l'immobilisation qui n'implique pas de pénétration de la capsule de l'articulation, provoque une augmentation de la teneur en protéines équivalente à celle d'une inflammation sévère.

Ainsi, on peut imaginer que dans le cas de l'arthrite inflammatoire, l'alimentation du cartilage articulaire est modifiée par la concentration accrue en protéines du liquide synovial, initialement à cause de l'effet inflammatoire puis, sous l'effet de la douleur, de la réduction de la mobilité de l'articulation.

Tableau XLV. Teneur en protéines du lavage articulaire du genou du lapin et la concentration en protéines dans l'articulation du cheval après des traumatismes intra-articulaires variés.

Traumatisme	Genou de lapin	Genou de cheval	Temps après le dernier traumatisme
	mg/articulation	mg/ml de liquide synovial	
Aucun	3.0 ± 0.2	c 23.9 ± 3.2	
		j 14.6 ± 2.6	
Insertion d'aiguille	5.1 ± 0.6		5 d *
	10.3 ± 1.8		7 d *
Injection de SPT	7.1 ± 0.9	c 37.9 ± 6.2	1 d
	8.6 ± 1.6	j 32.8 ± 6.4	2 d
Section du cartilage	10.3 ± 0.8		12 w
Articulation instable	9.9 ± 0.9		14 w
Articulation immobilisée	32.6 ± 7.0		1 w
Ovalbumine	33.7 ± 16.6		4 w
CON A	39.0 ± 4.0		1½ d

c = carpe

j = jarret

* 1 injection seulement

** 11 injections pendant 5,5 semaines.

Le temps indiqué en jours (j) ou en semaines (s) est l'intervalle de temps entre le dernier traumatisme (s'il y en avait plusieurs) et le prélèvement de l'échantillon.

Ceci montre l'importance de la mobilité de l'articulation diarthroïdale pour le passage normal des protéines du sang vers l'espace synovial et leur retour vers le système lymphatique. Si l'absence de mouvement dans l'articulation peut produire une teneur en protéines élevée dans le liquide synovial comparable à celle de l'inflammation, on peut se demander dans quelle mesure les restrictions ou l'absence de mouvement dans ces articulations contribuent à la douleur dans l'inflammation. Ainsi en plus de l'effet de l'agent inflammatoire sur les parois capillaires, il faut aussi prendre en considération l'effet limitant de la douleur sur les mouvements des articulations.

La question est de savoir si oui ou non l'augmentation de la teneur en NaHA du tissu synovial après le traumatisme influence la teneur en protéines du liquide synovial ne peut pas encore être décidée avec certitude à partir des données actuellement disponibles.

L'étude de l'effet possible de tamis du phénomène du volume exclu au niveau de la matrice du tissu synovial sur les protéines est davantage compliquée par le fait que chaque fois que la teneur en protéines augmente au-dessus de la valeur normale dans une articulation de cheval, un caillot de fibrine apparaît invariablement dans le liquide synovial. Donc le fibrinogène qui n'est pas présent normalement apparaît dans ces conditions dans le liquide synovial. La formation de ce caillot de fibrine a été observée même après l'injection de SPT ou NIF-NaHA, ce qui indique qu'une inflammation même très légère peut augmenter la perméabilité

de la barrière d'une façon significative. Nos études sur le cheval ont montré que l'arthrocentèse et la ponction d'un faible volume de liquide synovial (1 ml sur 25 ml) de liquide dans l'articulation du jarret représente un traumatisme qui peut causer une augmentation de la teneur en protéines. Ces études ont montré (Tableau XXV) qu'il existe des variations individuelles importantes aussi bien pour la nature traumatique de l'arthrocentèse que pour la capacité de régénération de l'articulation à la suite de ce traumatisme. En pénétrant, l'aiguille peut percer les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et même la surface cartilagineuse. Les variations de cette agression provoquent des degrés divers de saignement intra-articulaire et de lésions cellulaires. Malgré l'utilisation des meilleures techniques de l'arthrocentèse, il est encore possible de trouver des erythrocytes et de la fibrine dans l'échantillon de liquide synovial, indiquant une hémorragie intra-articulaire.

En conclusion, la teneur en protéines du liquide synovial est un paramètre important qui reflète à la fois le traumatisme du prélèvement du liquide et l'état inflammatoire de l'articulation. Dans l'étude du métabolisme du NaHA dans l'articulation, il est essentiel de déterminer ce paramètre pour évaluer les lésions de la barrière entre le sang et le liquide synovial causées par l'arthrocentèse.

VI. Modifications de la teneur en GAGs du cartilage et du tissu synovial

Le processus inflammatoire général dans l'articulation, et pas nécessairement la blessure spécifique, peut modifier la teneur en GAGs du cartilage articulaire. La teneur en ChS (par poids sec) a diminué dans le cartilage articulaire à la suite de divers types de situations inflammatoires telles que celles causées par des incisions du cartilage ou par l'injection de CON A. Par ailleurs, l'immobilisation de l'articulation pendant une semaine n'a aucunement modifié la teneur en GAGs du cartilage articulaire. Des expériences pratiquées par d'autres chercheurs (voir Généralités) révèlent qu'une immobilisation de plus de 8 semaines entraîne une diminution générale de tous les GAGs dans le cartilage.

Toutefois, la teneur en NaHA du cartilage ne correspond pas au schéma observé pour le ChS. L'incision du cartilage provoque une augmentation de la teneur en NaHA du cartilage, alors que l'injection de CON A a un effet contraire. Ceci implique que le contrôle métabolique de ces deux GAGs est très différent. Ce n'est pas surprenant puisque la testostérone ou les oestrogènes stimulent la synthèse du NaHA dans la crête de coq ou la peau sexuelle des singes mais n'ont aucun effet sur la synthèse du ChS (Szirmai, 1966).

La teneur en NaHA et en KS du tissu synovial s'élève au bout de 7 jours d'immobilisation, mais celle du ChS demeure

inchangée. Une injection de NIF-NaHA pendant la période d'immobilisation n'a pas entraîné d'augmentation supplémentaire de la teneur en NaHA du tissu synovial. Ces faits suggèrent que l'augmentation de NaHA peut être due à une stimulation de la synthèse plutôt qu'à un blocage du mécanisme d'écoulement.

VII. Conséquences de l'injection de NIF-NaHA dans l'articulation

L'augmentation de la teneur en NaHA dans l'articulation par injection de quantités variables de NIF-NaHA soulève deux types de questions essentielles. Le premier est lié au problème de la teneur artificiellement élevée en NaHA dans l'articulation: l'articulation saine a-t-elle un mécanisme régulateur qui rétablit rapidement la teneur initiale en NaHA? En outre, le mécanisme d'évacuation du NIF-NaHA injecté dépend-il de l'intégrité de l'articulation? En d'autres termes, et par rapport à l'articulation saine, ce dernier diffère-t-il dans une situation d'arthrite artificiellement créée?

Le second type de questions s'ordonne autour du problème de l'effet biologique de l'augmentation de la concentration et de la teneur en NaHA dans l'articulation après injections de NIF-NaHA. La viscosité accrue du liquide synovial et la teneur accrue en NaHA du tissu synovial et de la couche superficielle du cartilage, modifient-elles les fonctions de l'articulation saine ou l'un quelconque des symptômes de l'arthrite?

En ce qui concerne le premier type de questions, ces études ont clairement montré que l'articulation dispose d'un système régulateur permettant de maintenir la taille moléculaire et le niveau normal du NaHA. Lorsque la teneur en NaHA de l'articulation s'élève après injection de NIF-NaHA ou sous l'effet d'une grave synovite provoquée par injection

de CON A, le retour à la normale s'effectue assez rapidement. Ceci comprend non seulement le rétablissement de la teneur normale en NaHA et protéines, mais aussi la taille moléculaire normale du NaHA.

La vitesse d'évacuation du NIF-NaHA injecté dépend du rapport total du NaHA endogène/quantité injectée (Figure 35). En comparant l'articulation du genou du lapin avec le jarret et le carpe de cheval, il est possible de constater que lorsque le NIF-NaHA injecté ne provoque qu'une faible élévation de la teneur en NaHA endogène, ces trois articulations de taille très différentes réagissent de la même manière et évacuent 4 - 5%/heure de la teneur en NaHA. La différence entre les articulations du lapin et du cheval ne réside pas seulement dans la taille mais également dans la mobilité de l'articulation après l'injection. Les chevaux, même dans leurs boxes, sont plus mobiles que les lapins dans leurs cages.

Par conséquent, il est possible de dire que s'il n'y a pas injection excessive de NaHA exogène dans l'articulation, les différences existant dans la taille et la mobilité des articulations n'entraînent probablement pas des écarts dans le pourcentage du NaHA évacué de l'articulation. Par contre, lorsqu'une dose excessive de NIF-NaHA exogène est injectée dans l'articulation, la taille et la mobilité de cette dernière constituent alors des facteurs importants.

Une arthrite provoquée par des incisions du cartilage ou par une instabilité de l'articulation, a considérablement

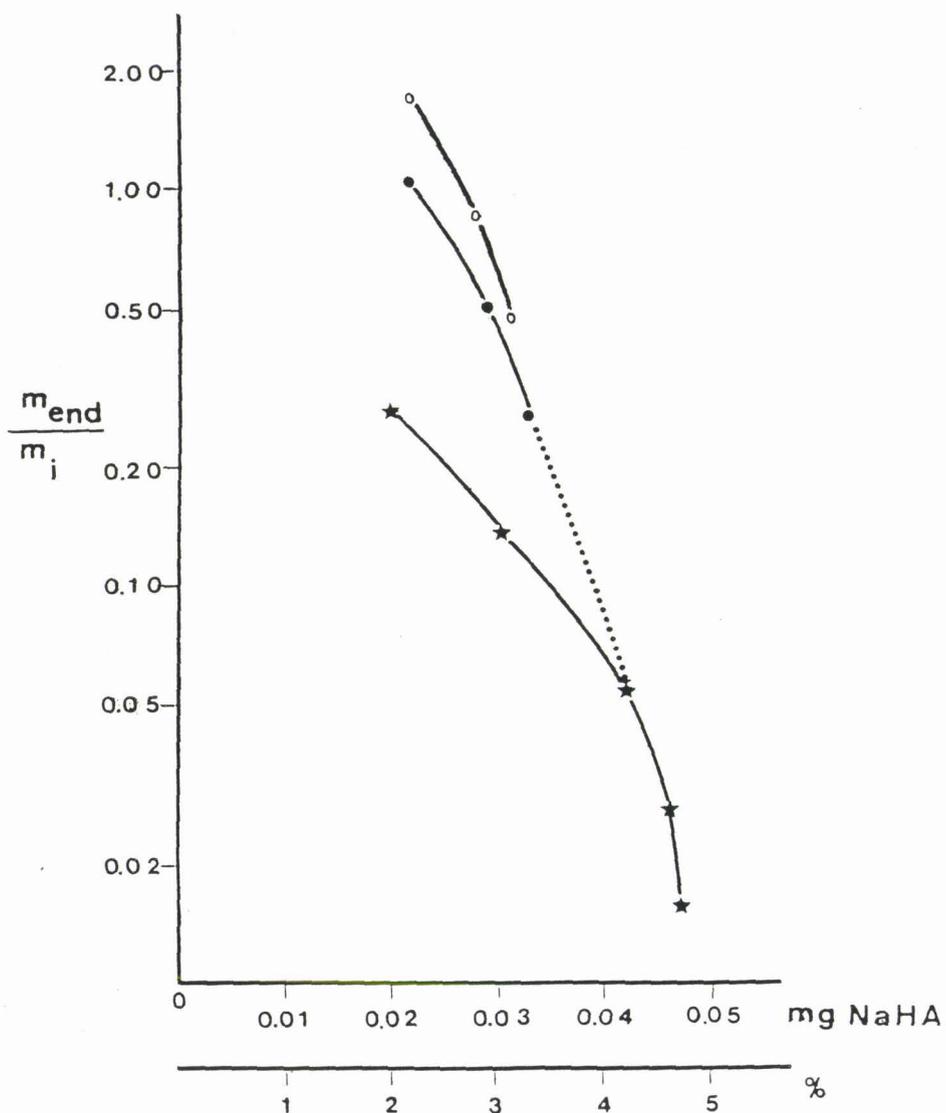


Figure 35. Logarithmes du rapport de la quantité totale de NaHA (m_{end}) endogène et du taux de NIF-NaHA injectée (m_i) sont portés en fonction de la vitesse de sortie du NaHA des articulations du lapin et du cheval. Cette dernière est exprimée en mg de NaHA sorti de l'articulation/heure/mg de NIF-NaHA injecté. Cette vitesse est également portée en abscisse en % de NIF-NaHA injecté et exporté par heure et par articulation. Ces résultats ont été calculés d'après la vitesse de sortie pendant les premières 24 heures après injection de NIF-NaHA (voir Figures 9 et 14). Les cercles ouverts représentent l'articulation carpe, les cercles pleins celle du jarret et les astérisques l'articulation du genou du lapin.



transformé l'évacuation de NIF-NaHA dans l'articulation. D'après les expériences pratiquées, il est difficile de dire si, dans ce type de situation, l'élévation importante de la teneur en NaHA de l'articulation après injection de NIF-NaHA a été occasionnée par une évacuation plus lente de ce dernier, ou par une synthèse plus rapide ou encore par un écoulement plus lent du NaHA endogène. Par ailleurs, lorsque l'ovalbumine a engendré la synovite, le NIF-NaHA injecté dans l'articulation enflammée n'a pas entraîné une augmentation de la teneur en NaHA de l'articulation supérieure aux niveaux témoins (injection de SPT). Ceci implique que l'effet peut être différent sur le métabolisme du NaHA de l'arthrite selon que cette dernière est provoquée par une inflammation synoviale (ovalbumine) ou par une lésion du cartilage ou du tendon.

L'injection de NIF-NaHA dans des articulations saines n'entraîne aucune inflammation mais n'empêche pas la légère réaction inflammatoire causée par l'arthrocentèse. D'autre part, le métabolisme du NaHA est affecté par l'injection de cette dose supplémentaire.

Il est intéressant de comparer le temps nécessaire pour le retour à la normale de la teneur en NaHA après injection de NIF-NaHA et après la seule introduction d'une aiguille. Lorsqu'une aiguille est introduite une fois (sans que rien ne soit injecté) dans l'articulation, cela constitue un stimulus inflammatoire qui accroît la teneur en NaHA. Sept jours plus tard, cette dernière est deux fois supérieure à la normale et la teneur en protéines a également beaucoup augmenté (voir Tableau XXVIII). Mais lorsque du NIF-NaHA 10 mg (dans 0,3 ml) est injecté avec une aiguille de même taille, la teneur en NaHA revient à la normale en 3 jours (Figure 10). Pendant les premières 24 heures, elle a été beaucoup plus élevée qu'après une simple introduction de l'aiguille. Puisque le traumatisme de la paracentèse est analogue dans les deux cas, il faut supposer que l'augmentation soudaine de la teneur en NaHA dans l'articulation provoquée par l'injection de NIF-NaHA, contrecarre (inhibe) l'effet stimulant du traumatisme causé par l'arthrocentèse.

VIII. Du rôle des phagocytes mononucléaires (macrophages)
dans le métabolisme du NaHA

Le rôle du système réticulo-endothélial dans le catabolisme du NaHA est clairement défini. Les travaux de T. Laurent, U. Laurent et de leurs collaborateurs indiquent que le cycle des voies métaboliques du NaHA s'achève dans les cellules phagocytaires du foie (cellules de Kupfer) et de la rate (histiocytes). Le NaHA, qui est drainé des matrices du tissu conjonctif dans le sang par les voies lymphatiques est absorbé par pynocytose dans ces macrophages. A faible concentration ($< 50 \mu\text{g/ml}$), le NaHA stimule le mouvement, la phagocytose et le rassemblement des macrophages, alors qu'à forte concentration ($> 100 \mu\text{g/ml}$), il les inhibe. Ces observations tendent à prouver l'existence d'un système de reconnaissance et des récepteurs spécifiques au NaHA, sur la surface de ces cellules.

Une gamme étendue de cellules, des bactéries à celles des mammifères, disposent du système enzymatique nécessaire à la synthèse du NaHA. Il a été démontré que de nombreuses cellules fabriquent ce polysaccharide en culture tissulaire. Toutefois de nombreuses cellules, capables de produire en culture une substance de type donnée, ne produisent pas cette substance lorsqu'elles font partie intégrante d'un tissu. Par conséquent, il n'est pas possible de se fonder sur ce type d'expérience pour désigner les cellules responsables de la production de NaHA dans le tissu conjonctif.

Il est généralement admis que dans les tissus en voie de développement aussi bien que dans les tissus adultes, le NaHA est produit par des fibroblastes ou des fibrocytes. Par ailleurs, Balazs et ses collaborateurs ont suggéré que dans le vitré, où les fibroblastes sont absents, les hyalocytes produisent du NaHA. Il a été démontré qu'une population isolée de hyalocytes contient du NaHA intracellulaire ainsi que tous les enzymes nécessaires à sa synthèse. Dans le tissu synovial, les macrophages sont responsables de la synthèse de NaHA. Des études analogues de localisation métabolique n'ont pas été menées sur les cellules A et B de l'intima synoviale. Les cellules A et les hyalocytes présentent une analogie morphologique remarquable. Nous supposons donc que, dans l'articulation comme dans l'oeil, ces histiocytes (hyalocytes) sont à l'origine de la production de NaHA.

L'observation selon laquelle la synthèse de NaHA peut être stimulée in vitro par du NaHA dans les macrophages alvéolaires et péritonéaux, et inhibée par le ChS dans le milieu de culture, suggère un phénomène intéressant de rétroaction qui favoriserait le remplissage d'un compartiment matriciel par le NaHA. Un phénomène semblable a été constaté pour les chondrocytes, favorisant l'accumulation de ChS-protéoglycane autour de ces cellules. De tels mécanismes impliquent l'idée d'une matrice qui disposerait de territoires spécifiques dans lesquels l'espace intermédiaire ou superficiel des réseaux fibrillaires de collagène serait rempli

d'un type de GAG (PG ou NaHA). Le centre métabolique et souvent anatomique de ces territoires est une cellule (hyalocyte, chondrocyte, kératocyte, etc) spécialisée dans la fabrication de GAGs qui l'entourent. Le mécanisme de rétroaction positive expliquerait cette accumulation d'un GAG spécifique dans le milieu.

Le NaHA, soit par diffusion comme dans le vitré, soit par écoulement comme dans les cavités antérieure et postérieure de l'oeil, soit par mélange mécanique, comme dans le liquide et les tissus synoviaux, ou sur la surface cartilagineuse, passe de la proximité des centres cellulaires métaboliques vers les tissus périphériques où il pénètre dans les terminaisons ouvertes du système lymphatique. La possibilité selon laquelle les cellules mononucléaires du type phagocyte sont à la fois responsables de la synthèse intracellulaire et du fractionnement de la molécule de NaHA, évoque l'éventualité d'une réutilisation ou même d'une réparation du NaHA intracellulaire.

Ces opérations peuvent être rendues possibles par le caractère doublement fonctionnel de ces cellules: pynocytose et synthèse. Les molécules synthétisées et libérées par les cellules peuvent être réintégrées par pynocytose au sein du milieu cellulaire pour réutilisation ou réparation.

IX. Relation possible entre le métabolisme du NaHA et des protéoglycannes et la réaction inflammatoire.

A. Protéoglycannes

Il est généralement admis aujourd'hui que les synthèses du collagène et des protéoglycannes dans le cartilage ne sont pas associées (Benya et Nimni, 1979; Linsenmayer et Kochhar, 1979). Ce fait n'exclut pas l'existence d'une certaine coordination de leur biosynthèse dans des conditions normales (Muir, 1979); mais même dans ce cas cela ne se passe pas à l'intérieur d'une même cellule produisant les deux composants. Il en découle que les stimulants physiologiques ou pathologiques du métabolisme, ainsi que les inhibiteurs agissent indépendamment sur ces deux composants de la matrice.

Dans le cadre de l'association de ChS-PG et NaHA, il est important de mentionner les effets positifs et négatifs de rétroactivation et rétro-inhibition ("feed-back") observés en cultures cellulaires. Dans les cultures de fibroblastes ou de macrophages, la synthèse de NaHA est inhibée par du ChS exogène et stimulée par du NaHA exogène (Jacobson et Balazs, cités par Balazs et Darzynkiewicz, 1973). Par ailleurs, dans les cultures de chondrocytes, la synthèse de ChS est freinée par le NaHA exogène et stimulée par le ChS (Wiebkin et Muir, 1973, 1977; Wiebkin, Hardingham et Muir, 1975; Handley et Lowther, 1976). Ces expériences suggèrent que s'il y a association entre le contrôle métabolique de ces deux polysaccharides matriciels, c'est probablement grâce à l'intervention des GAGs

eux-mêmes dans le milieu environnant immédiat des cellules synthétisantes. Ceci suppose la présence sur la surface cellulaire de récepteurs pour les GAGs, ou un mécanisme intracellulaire de reconnaissance qui peut se faire par internalisation endocytotique d'un échantillon du milieu.

Il est tout à fait possible que le même processus endocytotique, qui contrôle apparemment le catabolisme du ChS-PG dans le cartilage, soit directement associé au contrôle de synthèse. Les échantillons extracellulaires de la matrice, remplissant les vésicules pynocytotiques fournissent le signal de début d'un processus de synthèse puis subissent un catabolisme intracellulaire.

B. Réaction inflammatoire

Il s'agit de savoir si l'augmentation de la teneur en NaHA et en protéines que l'on trouve dans l'articulation de l'arthrite inflammatoire, sont associés. Dans les différents types d'arthrites examinés au cours de cette étude, il est indéniable que l'augmentation de la teneur en NaHA dans l'articulation s'accompagne toujours d'un accroissement de la teneur en protéines du liquide synovial. Quatre hypothèses peuvent être avancées pour établir un lien de causabilité entre ces deux phénomènes. En premier lieu, la synthèse du NaHA pourrait être stimulée et l'accumulation consécutive de NaHA dans la matrice du tissu synovial risquerait d'inhiber le transport des protéines. Cette explication a été proposée par Nettelblad, Sundblad et Jonsson (1963) et fait l'objet d'une

étude dans cette thèse. En second lieu, les modifications du sang et du système lymphatique dues aux stimuli inflammatoires bloqueraient les voies de sortie des protéines ainsi que celles de NaHA. En troisième lieu, les stimuli inflammatoires déclencheraient directement ou indirectement l'accélération de la synthèse du NaHA et détruiraient également la barrière entre le sang et le liquide synovial. Enfin, il est possible d'imaginer un mécanisme plus complexe selon lequel la synthèse du NaHA serait parallèle à la destruction de la barrière entre le sang et le liquide synovial, ce qui se traduirait par un blocage des voies de sortie à la fois du NaHA et des protéines. Les trois dernières hypothèses seront étudiées ci-dessous.

La dilatation capillaire est une caractéristique connue de la synovite. Cette inflammation a pour résultante un ralentissement de la circulation sanguine, une formation d'oedème et même une extravasation des érythrocytes dans le tissu synovial (Kulka, 1966, Goldie, 1970). Il a été constaté que la dilatation du système capillaire, étudiée chez les humains sous arthroscopie grossissante (Inoue, Yoshio, Nishioka, Satoh et Mickanagi, 1979) était modéré dans l'ostéo-arthrite du genou en l'absence d'épanchement, mais importante dans le cas contraire. Dans l'arthrite déformante (rhumatisme articulaire), une forte dilatation a toujours été observée. En règle générale, une corrélation étroite a été établie entre cette dernière et le volume d'épanchement synovial.

L'irrigation lymphatique de l'articulation constitue un élément important de la circulation du NaHA. Il est relativement bien établi que le transit des protéines de l'articulation se fait par l'intermédiaire du système lymphatique (Bauer, Short et Bennett, 1933) et que leur vitesse d'évacuation est plus élevée dans les articulations des chiens soumis à des exercices ou des massages. D'après plusieurs observations, la vitesse d'évacuation de protéines radioactives dans les articulation d'hommes et de lapins, semble indépendante de leur poids moléculaire. En particulier, l'évacuation des macromolécules de la diarthrose ne se fait pas par diffusion, mais par écoulement massif par le système lymphatique (Rodnan et MacLachlan, 1960; Brown, Cooper et Bluestone, 1969).

Des auteurs ont cherché à établir une corrélation entre la vitesse de disparition du ^{133}Xe de l'espace articulaire et la sévérité de la synovite (voir Liew et Dick, 1981). Cette vitesse de disparition augmente parallèlement au degré de gravité de l'inflammation et elle diminue sous l'effet des agents anti-inflammatoires. Toutefois, le ^{133}Xe n'est pas évacué par le système lymphatique, mais par le système veineux.

En conclusion, si le système lymphatique constitue la voie de sortie normale du NaHA, il est tout à fait possible que l'augmentation de sa teneur dans l'articulation en cas de synovite soit provoquée par l'obstruction de la circulation lymphatique. En d'autres termes, ce n'est pas la synthèse du NaHA qui serait stimulée, mais plutôt son transport qui se trouverait être entravé. Si tel était le cas, il faudrait s'attendre à ce que l'augmentation de la teneur en NaHA soit parallèle à l'accroissement du contenu en protéines, dans la mesure où les deux macromolécules sont évacuées de l'articulation par le système lymphatique.

X. Interaction entre fibronectine et les fibrilles de collagène du cartilage et du vitré

A. Cartilage

Nous pouvons donc conclure de ces études, que seule la couche superficielle du cartilage articulaire contient de la fibronectine, c'est précisément cette couche qui est riche en NaHA et qui joue un rôle important au cours des mouvements de l'articulation et qui protège le collagène du cartilage des contraintes mécaniques.

Il est possible que dans la couche superficielle du cartilage, la fibronectine joue un rôle important dans la médiation de l'interaction entre les fibrilles de collagène et NaHA. Au niveau de la couche superficielle du cartilage et uniquement au niveau de celle-ci, comme dans le vitré de l'oeil, on peut mettre en évidence à l'état natif l'existence de complexes ternaires entre les fibrilles de collagène de type II, NaHA et la fibronectine.

Il s'agit là d'un complexe exceptionnel car dans le cartilage on trouve également des fibrilles de collagène de type II - l'interaction entre les chondrocytes et les fibrilles de collagène sont médiés par une autre glycoprotéine de structure: la chondronectine.

B. Vitré

Ces expériences montrent clairement que ces fibrilles de collagène de type II du vitré réagissent à l'état natif avec la fibronectine. L'expérience effectuée avec la trypsine montre que l'interaction peut être rompue par la digestion de la fibronectine; mais l'expérience avec l'hyaluronidase suggère que la digestion de NaHA enlève aussi la fibronectine dont l'interaction serait médiée par une couche de NaHA entre collagène et fibronectine.

Il est intéressant de noter à ce sujet que les fibrilles de collagène du vitré ont été décrites par les histologistes en tant que fibrilles de reticuline, c'est à dire qu'elles sont capables de réduire les sels d'argent. Il semble que chaque fois que de telles fibrilles ont été décrites, on a toujours pu mettre en évidence de la fibronectine associée avec des fibrilles natives de collagène. Si cette conclusion est valide, et si, on peut la généraliser, il semblerait donc que l'association collagène - fibronectine puisse être responsable de la réaction argyrophile des fibrilles de collagène décrite dans la littérature.

Dans cette thèse, le terme "exportation" est utilisé pour désigner le passage du NaHA de poids moléculaire élevé du site de synthèse et de premier stockage extracellulaire (vitré et liquide synovial) vers les espaces extracellulaires voisins et le système lymphatique. Nous pensons que ce terme décrit d'une manière plus précise le mouvement de cette molécule entre les compartiments de la matrice parce qu'elle n'est ni transportée à travers une barrière, ni éliminée de ces compartiments par un processus catabolique. Comme l'hyaluronate utilisé pour ces études n'était pas marqué, les études portent sur des variations de la concentration de l'hyaluronate dans ces tissus.

GLOSSAIRE

AR	Arthrite rhumatoïde
cFN	Fibronectine cellulaire
ChS	Chondroïtine sulfate
CON A	Concanavaline A
CPC	Cetylpyridinium chloride
FN	Fibronectine
GAG	Glycosaminoglycane
Hep	Heparin
HSA	Sérum albumine humaine
KS	Keratane sulfate
LcL	Lens culinaris lectine
MW	Poids moléculaire
n	Nombre d'échantillons
NaHA	Hyaluronate de sodium
NIF-NaHA	Fraction de NaHA apyrogène et très purifié
OA	Ovalbumine

p	Signification
pFN	Fibronectine plasmatique
PG	Protéoglycannes
PsL	Lectine de pisum satium
r	Coefficient de corrélation (Pearson)
AR	Arthrite rhumatoïde
SBA	Agglutine de soja
SPT	Solution physiologique tamponnée
$S_{\bar{x}}$	Erreur standard de la moyenne
t	Statistique utilisé pour comparer les moyennes de groupes d'échantillons différents
WGA	Agglutine de germe de blé
\bar{x}	Moyenne
$[\eta]_0$	Viscosité intrinsèque
$[\eta]_{40}$	Viscosité réduite (η_r) mesurée à concentration 40 $\mu\text{g/ml}$ NaHA
η_s	Viscosité spécifique ($\eta - \eta_0 / \eta_0$)
η_r	Viscosité réduite (η_s/c)
σ	Déviation standard (écart-type) de la moyenne

BIBLIOGRAPHIE

- Abelsdorff, G. and Wessely, K. (1909).
Vergleichend-physiologische Untersuchungen über der
Flüssigkeitswechsel des Auges in der Wirbelthierreiche.
Arch. f. Augenheilk. 64, 65-125.
- Akeson, W.H. (1961). An experimental study of joint
stiffness. J. Bone Jt. Surg. 43-A, 1022-1034.
- Akeson, W.H. and Amiel, D., Mechanic, G.L., Woo, S.L.Y.,
Harwood, F.L. and Hamer, M.L. (1977). Collagen
cross-linking alterations in joint contractures: changes
in the reducible cross-links in periarticular connective
tissue collagen after nine weeks of immobilization.
Conn. Tiss. Res. 5, 15-19.
- Akeson, W.H. and LaViolette, D.F. (1964). The
connective tissue response to immobility: total
mucopolysaccharide changes in dog tendon. J. Sur. Res.
IV, 523- 528.
- Akeson, W.H., Amiel, D. and LaViolette, D. (1966). The
connective tissue response to immobility: A study of
hyaluronic acid turnover in periarticular connective
tissue of control and immobilized knees of dogs.
Presented at the International Connective Tissue
Symposium in Lyon, France, September, 1965. In
"Biochimie et Physiologie du Tissue Conjonctif" (P.
Comte, ed.,) pp. 679-689, Societe Ormeco et Imprimerie,
Lyon, France.
- Akeson, W.H., Amiel, D. and LaViolette, D. (1967). The
connective-tissue response to immobility: a study of the
chondroitin-4 and 6-sulfate and dermatan sulfate changes
in periarticular connective tissue of control and
immobilized knees of dogs. Clin. Orth, and Rel. Res.
51, 183-197.
- Akeson, W.H., Amiel, D. , LaViolette, D and Secrist, D.
(1968). The connective tissue response to immobility:
an accelerated aging response? Exp. Geront. 3, 289-301.
- Akeson, W.H., Woo, S.L.Y., Amiel, D. Coutts, R, D., and
Daniel, D. (1973). The connective tissue response to
immobility: biochemical changes in periarticular
connective tissue of the immobilized rabbit knee. Clin.
Ortho. and Rel. Res. 93, 356-362.

Algvere, P. and Balazs, E.A. (1974). Experimental retinal detachment in owl monkeys. *Mod. Probl. Opth.* 12, 152-166.

Allen, W., Otterbein, S.C. and Wardi, A.H. (1977). Isolation and characterization of the sulfated glycosaminoglycans of the vitreous body. *Biochim. Biophys. Acta* 498, 167-175.

Altman, R.D., Pita, J.C., and Howell, D.S. (1973). Degradation of proteoglycan in human osteoarthritis cartilage. *Arth. Rheum.* 16, 179-185.

Amiel, D., Akeson, W.H., Harwood, F.L., Schmidt, D.A. and Mechanic, G.L. (1977). Effect of low dosage schedule of D-penicillamine on collagen cross-linking in a nine week immobilized rabbit knee. *Conn. Tiss. Res.* 5, 179-183.

Anadere, I., Chemiel, H. and Laschner, W. (1979). The viscosity of normal and pathological synovial fluid. *Biorheology*, 16, 179-184.

Antonias, K.N., Fraser, J.R.E. and Muirden, K.D. (1973). Distribution of biologically labelled radioactive hyaluronic acid injected into joints. *Ann. Rheum. Dis.* 32, 103-111.

Antonopoulos, C.A., Gardell, S., Szirmai, J.A. and Tyssonsk, E.R. de. (1964). Determination of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from tissues on the microgram scale. *Biochim. Biophys. Acta*, 83, 1-19.

Åsheim, A. and Lindblad, G. (1976). Intra-articular treatment of arthritis in race horses with sodium hyaluronate. *Acta Vet. Scand.*, 17, 379-394.

Atherton, B.T. and Hynes, R.O. (1981). The difference between plasma and cellular fibronectin located with monoclonal antibodies. *Cell*. Vol. 25, pp 133-141.

Balazs, E.A. (1942). The interaction of chemical and mechanical factors in bone regeneration. Thesis, Faculty of Medicine, University of Budapest.

Balazs, E.A. (1954). Structure of the vitreous gel. *Acta XVII Cong. Opth.* 11, 1019-1024.

Balazs, E.A. (1958). Physical chemistry of hyaluronic acid. *Fed. Proc.*, 17, 1086-1093.

Balazs, E.A. (1959). The Vitreous Body. Studies on Its Physical State, Chemical Composition and Biological Role. Scientific Exhibit at the XVIII International Congress of Ophthalmology. Brussels. Brochure, pp. 1-10.

Balazs, E.A. (1960). Physiology of the vitreous body. In Importance of the Vitreous Body in Retina Surgery with Special Emphasis on Reoperations. (Proceedings of the II Conference of the Retina Foundation, Ipswich, May 30-31, 1958). (ed. Schepens, C.L.), C.V. Mosby, St. Louis, pp. 29-48.

Balazs, E.A. (1965). Amino sugar-containing macromolecules in the tissues of the eye and the ear. In The Amino Sugars: The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugar. II-A. Distribution and Biological Role. (eds. Balazs, E.A. and Jeanloz, R.W.) Acad. Press, N.Y., pp.401-460.

Balazs, E.A. (1966). Sediment volume and viscoelastic behavior of hyaluronic acid solutions. Fed. Proc., 25, 1817-1822.

Balazs, E.A. (1968a). Die Mikrostruktur und Chemie des Glaskorpers. In Bericht über die 68. Zusammenkunft der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft in Heidelberg 1967. (ed. Jaeger, W.) pp. 536-572. J.F. Bergmann Verlag, Munich.

Balazs, E.A. (1968b). Viscoelastic properties of hyaluronic acid and biological lubrication. Univ. Mich. Med. Ctr. J. 255-259.

Balazs, E.A. (1973). The vitreous. In Ocular Fine Structure for the Clinician. International Ophthalmology Clinics (ed. K. Zinn) Vol 13, Little, Brown and Co., Boston, pp. 169-187.

Balazs, E. A. (1974). "The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid". In Disorders of the Knee (ed. A. J. Helfet), J. B. Lippincott, Philadelphia, pp. 63-75..

Balazs, E.A. (1977). Intercellular Matrix of Connective Tissue. In Handbook of the Biology of Aging. (eds. Finch, C.E. and Hayflick, L.) Van Nostrand, Reinhold, Co., New York., pp.222-240.

Balazs, E. A. (1979). Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof. United States Patent #4,141,973, October 17, 1975.

- Balazs, E. A., Berntsen, K.O., Karossa, J. and Swann, D.A. (1965). An automated method for the determination of hexuronic acids. *Analyt. Biochem.* 12, 547-558.
- Balazs, E.A., Bloom, G.D. and Swann, D.A. (1966). Fine structure and glycosaminoglycan content of the surface layer of articular cartilage. *Fed. Proc.*, 25, 1813-1816.
- Balazs, E.A., Briller, S.O. and Denlinger, J.L. (1981). Na-hyaluronate molecular size variations in equine and human arthritic synovial fluids and the effect on phagocytic cells. In Seminars in Arthritis and Rheumatism, Vol 11 (Talbot, J.H., ed) Grune and Stratton, pp. 141-143.
- Balazs, E.A. and Darzynkiewicz, Z. (1973). The effect of hyaluronic acid on fibroblasts, mononuclear phagocytes and lymphocytes. In Biology of the Fibroblast (paper of the symposium held in Turku, Finland, 1972). (eds. Kulonen, E. and Pikkarainen, J.), Academic Press, London, pp.237-252.
- Balazs, E.A. and Denlinger, J.L. (1979). Vitreous and joint: comparative morphology and biochemistry. Fondazione Ronchi, Centro de Studio e di Vitra, Capri, Italy. *Atti Della Fondazione Giorgio Ronchi XXXIV* (6),637-647.
- Balazs, E.A. and Denlinger, J.L. (1982). The vitreous., in The Eye, 3rd ed. (ed. H. Davson), Academic Press, New York, In Press.
- Balazs, E.A. and Flood, M.T. (1978). Age-related changes in the physical and chemical structure of human vitreous.(Abstr.). Third International Congress for Eye Research, Osaka, Japan.
- Balazs, E.A., Freeman, M.I. and Regnault, F. (1973). The fate of hyaluronic acid injected into the vitreous of the owl monkey (personal communication).
- Balazs, E. A. and Gibbs, D. A. (1970). The rheological properties and biological function of hyaluronic acid. In Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix (ed. E.A. Balazs) Academic Press, New York, pp. 1241-1254.
- Balazs, E.A. and Hultsch, E. (1976). Replacement of the vitreous with hyaluronic acid, collagen and other polymers. Ch. 57 in Advances in Vitreous Surgery, (eds. Irvine, A.R. and O'Malley, C.) Charles C. Thomas: Springfield, Ill. pp. 601-623.

- Balazs, E.A. and Laurent, T.C. (1951). Viscosity function of hyaluronic acid as a polyelectrolyte. *J. Poly. Sci.*, 6, 665-668.
- Balazs, E.A., Laurent, T.C., Laurent, U.B.G, DeRoche, M.H. and Bunney, D.M. (1959). Studies on the structure of the vitreous body. VIII. Comparative biochemistry. *Arch. Biochem. and Biophys.* 81, 464-479.
- Balazs, E.A. and Piller, L. (1943). The formation of synovial fluid. *Magy. Orv. Arch.* 44, 1-11.
- Balazs, E.A. and Sundblad, L. (1959). Viscosity of hyaluronic acid solutions containing proteins. *Acta Soc. Med. Upsal.* 64, 137-146.
- Balazs, E.A., Sundblad, L. and Toth, L.Z.J. (1958). In Vitro Formation of Hyaluronic Acid by Cells in the Vitreous Body and By Comb Tissue. *Abstr. Fed. Proc.* 17 (1,1), 184.
- Balazs, E.A. and Sweeney, D.B. (1966). Replacement of the Vitreous Body of Monkeys with Reconstituted Vitreous and Hyaluronic Acid. In Modern Problems in Ophthalmology (Surgery of Retinal Vascular Diseases and Prophylactic Treatment of Retinal Detachment, Amersfoort, 1963) (ed. Streiff, E.B.), Vol. IV, S, Karger, Basel, pp. 230-232.
- Balazs, E.A., Toth, L., Eckl, E.A. and Mitchell, A.P. (1964). Studies on the structure of the vitreous body. XII. Cytological and histochemical studies on the cortical tissue layer. *Exp. Eye Res.* 3, 57-71.
- Balazs, E.A., Toth, L.Z.J., Jutheden, G.M. and Collins, B. (1965). Cytological and biochemical studies on the developing chicken vitreous. *Exp. Eye Res.* 4, 237-248.
- Balazs, E.A., Watson, D., Duff, I.F. and Roseman, S. (1967). Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. *Arth. Rheum.* 10, 357-376.
- Bárány, E., Berggren, L. and Vrabec, F. (1957). The mucinous layer covering the corneal endothelium in the owl Strix aluco. *Br. J. Ophth.* 41, 25-30.
- Barland, P., Novikoff, A.B., and Hamerman, D. (1962). Electron microscopy of the human synovial membrane. *J. Cell Biol.*, 14, 207-220.

- Barland, P., Smith, C., and Hamerman, D. (1968). Localization of hyaluronic acid in synovial cells by radioautography. *J. Cell. Biol.* 37, 13-26.
- Bauer, W., Short, C.L. and Bennet, G.A. (1933). The manner of removal of proteins from normal joints. *J. Exp. Med.* 57, 419-432.
- Bennett, G.A., Bauer, W. and Maddock, S.J. (1932). A Study in the repair of articular cartilage. *Am. J. Path.* 8, 499-523.
- Benya, P.D., and Nimni, M. (1979). Stability of collagen phenotype during stimulated collagen, glycosaminoglycan, and DNA synthesis by articular cartilage organ cultures. *Arch. Biochem. Biophys.*, 192, 327-335.
- Berman, E.R. and Gombos, G.M. (1969). Studies on the incorporation of U-¹⁴C-glucose into vitreous polymers in vitro and in vivo. *Invest. Opth.* 8, 521-534.
- Berman, E.R. and Michaelson, I.C. (1964). The chemical composition of the human vitreous body as related to age and myopia. *Exp. Eye Res.* 3, 9-15.
- Bettelheim, F.A. and Balazs, E.A. (1968). Light-Scattering Patterns of the Vitreous Humor. *Biochim. Biophys. Acta.* 158, 309-312.
- Bland, J.H. (1972). The effect of Healon^R on the healing of experimental cartilage injury in rabbit's knee joints. Personal communication.
- Bollet, A. J. (1956). The intrinsic viscosity of synovial fluid hyaluronic acid. *J. Lab. Clin. Med.* 48, 721-728.

Bollet, A.J., and Nance, J.L. (1966). Biochemical findings in normal and osteoarthritic articular cartilage. II. Chondroitin sulfate concentration and chain length, water and ash content. *J. Clin. Invest.*, 45, 1170-1177.

Boselli, J.M., Macarak, E.J., Clark, C.C., Brownell, A.G., Martinez-Hernandez, A. (1981). FN. Its relationship to Basement Membranes. I. Light microscopic studies. *Collagen Rel. Res.*, 1981, 1, 391-404.

Bostrom, H. (1952). On the metabolism of the sulfate group of chondroitinsulfuric acid. *J. Bio. Chem.* 196, 477-481.

Brandt, K.D. (1974). Enhanced extractability of articular cartilage proteoglycans in osteoarthritis. *Biochem. J.*, 143, 475-478.

Brandt, K.D. and Palmoski, M. (1976). Organization of ground substance proteoglycans in normal and osteoarthritic knee cartilage. *Arth. Rheum.*, 19, 209-215.

Bray, B. A. (1978). Cold insoluble globulin (fibronectin) in connective tissues of adult human lung and in trophoblast basement membrane. *J. Clin. Invest.* 62, 745-752.

Breen, M., Bizzell, J.W. and Weinstein, H.G. (1977). A galactosamine containing proteoglycan in human vitreous. *Exp. Eye Res.* 24, 409-412.

Brooke, J. W. and Slack, H.G.B. (1959). Metabolism of connective tissue in limb atrophy in the rabbit. *Ann. Rheum. Dis.* 18, 129-136.

Broom, N. D. and Myers, D. D. (1980). Fibrous waveforms or crimp in surface and subsurface layers of hyaline cartilage maintained in its wet functional condition. *Conn. Tiss. Res.*, 7, 165-175.

Brown, D.L., Cooper, A.G., and Bluestone, R. (1969). Exchange of IgM and albumin between plasma and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 20, 644-651.

- Bruschwig, A. and Henry, L. D. (1933). Experimental chronic arthritis (synovitis)--produced by intra-articular injections of bacterial filtrates and other foreign proteins. *Arch. Surg.* 27, 1065-1071.
- Burstein, N.A. and Waksman, B.H. (1964). The pathogenesis of adjuvant disease in the rat. II. A Radioantographic study of early lesions with the use of H3-thymidine. *Yale, J. Biol. Med.* 37, 195-203.
- Calandruccio, R.A. and Gilmer, W.S. (1962). Proliferation, regeneration, and repair of articular cartilage of immature animals. *J. Bone Jt. Surg.* 44-A, 431-454.
- Campbell, J. (1969). The healing of cartilage defects. *Clin. Orthop.* 69, 45-63.
- Carsons, S., Mosesson, M.W. and Diamond, H.S. (1981). Detection and quantitation of fibronectin in synovial fluid from patients with rheumatic disease. *Arth. Rheum.* 24, 1261-1267.
- Castor, W.C. (1960). The microscopic structure of normal human synovial tissue. *Arth. Rheum.*, 3, 140-150.
- Caterson, B. and Lowther, D.A. (1978). Changes in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta* 540, 412-422.
- Charnley, J.C. (1948). Positive pressure in arthrodesis of the knee joint. *J. Bone Jt. Surg.* 30-B, 478-486.
- Clarke, I.C. (1971). Articular cartilage: A review and scanning electron microscope study. *J. Bone Jt. Surg.*, 53, 732-749.
- Cleland, R.L. (1970). Ionic polysaccharides. IV. Free-rotation dimensions for disaccharide polymers. Comparison with experiment for huyaluronic acid. *Biopolymers*, 9, 811-824.

Cleland, R.L. (1971). Ionic polysaccharides. V. Conformational studies of hyaluronic acid, cellulose and laminaran. *Biopolymers* 10, 1925-1948.

Cleland, R.L. (1977). The persistence length of hyaluronic acid : An estimate from small-angle X-ray scattering and intrinsic viscosity. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 57-68.

Cleland, R.L. (1979). Effect of temperature on the limiting viscosity number of hyaluronic acid and chondroitin 4-sulfate. *Biopolymers*, 18, 1821-1828.

Cleland, R.L. & Wang, J.L. (1970). Ionic polysaccharides. III. Dilute solution properties of hyaluronic acid fractions. *Biopolymers* 9, 799-810.

Collins, D.H. and McElligott, T.F. (1960). Sulphate uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteo-arthritic human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 19, 318-330.

Comper, W.D. and Laurent, T.C. (1978). Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* 58, 255-315.

Consden, R., Doble, A. Glynn, L.E. and Nind, A.P.P. (1971) Production of a chronic arthritis with ovalbumin. Its retention in the rabbit knee joint. *Ann. Rheum. Dis.* 30, 307-315.

Cooke, T.D., Hurd, E.R., Ziff, M. and Jasin, H.E. (1972). The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 135, 323-338.

Coulter, W.H. (1962). The characteristics of human synovial tissue as seen with the electron microscope. *Arth. Rheum* 5, 70-80.

Crelin, E.S. and Southwick, W.O. (1960). Mitosis of chondrocytes induced in the knee joint articular cartilage of adult rabbits. *Yale. J. Biol. Med.* 33, 243-244.

Crelin, E.S. and Southwick, W.O. (1964). Changes induced by sustained pressure in the knee joint articular cartilage of adult rabbits. *Anat. Rec.*, 149, 113-134.

Curri, S.B. and Campailla, E. (1966). Acido ialuronico e osteogenesi: influenza sull'acrescimento embrionale e sull'evoluzione del callo osseo. Clin. Ort. 18, 433-467.

Curri, S.B. and Campailla, E. (1967). Acido ialuronico e condrogenesi: influenza del mucopolisaccaride sui processi riparativi della cartilagine. Biochim. Biol. Sper. 4, 31-70.

Curri, S.B. and Maschio, C. (1959). Significato die mucopolisaccaridi acidi nella condrogenesi normale e patologica. Riv. Anat. Pat. Oncol. 15.

Cuthbertson, E.M., Siris, E. and Gilfillan, R.S. (1965). The femoral diaphyseal medullary venous system as a venous collateral channel in the dog. J. Bone Jt. Surg, 47A, 965-974.

Davidson, E.A. (1970). Glycoprotein and mucopolysaccharide hydrolysis (glycoprotein and mucopolysaccharide hydrolysis in the cell). In : Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis, Vol. I. (W.H. Fishman, ed.) Academic Press, New York, pp. 327-

Davies, D.V., Barnett, C.H., Cochrane, W., and Palfrey, A.J. (1962). Electron microscopy of articular cartilage in the young adult rabbit. Ann. Rheum. Dis., 21, 11-20.

Dekel, S. and Weissman, S.L. (1978). Joint changes after overuse and peak overloading of rabbit knees in vivo. Acta. Orthop. Scand., 49, 519-528.

Denlinger, J.L., and Balazs, E.A. (1980). Replacement of the liquid vitreous with sodium hyaluronate in monkeys. I. Short term evaluation. Exp. Eye Res. 31, 81-99.

Denlinger, J.L., Balazs, E.A., Nakano, G., Ronner, H. and Velazquez, N. (1978). Hyaluronic acid and the inflammatory reaction in the vitreous and anterior chamber. Third Int. Cong. Eye Res., Osaka, Japan.

Denlinger, J.L., Eisner, G. and Balazs, E.A. (1980). Age-related changes in the vitreous and lens of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Exp. Eye Res. 31, 67-79.

Denlinger, J.L., El-Mofty, Aly A.M., and Balazs, E.A. (1980). Replacement of the liquid vitreous with sodium hyaluronate in monkeys. II. Long term evaluation. Exp. Eye Res. 31, 101-117.

DePalma, A.F., McKeever, C.D. and Shubin, D. K. (1966). Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine. Clin. Orthop. 48, 229-242.

- Dessau, W., Adelman, B.C., Timpl, R. and Martin, G.R. (1978). Identification of the sites in collagen α -chains that bind serum-antigelatin factor (cold insoluble globulin). *Biochem. J.* 169, 55.
- Deutsch, H.F. (1957). Some properties of a human serum hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 224, 767-774.
- Deutsch, H.F. and Morton, J.I. (1956). Some properties of a hyaluronic acid from human serum. *Fed. Proc.* 15, 242.
- Dische, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* 167, 189-198.
- Downie, N.M. and Heath, R.W. (1965). Basic Statistical Methods, 2nd ed; Harper and Row, New York, 325 p.
- Dumonde, D.C. and Glynn, L.E. (1962). The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Brit. J. Exp. Path.* 43, 373-383.
- Dziewiatkowski, D.D., DiFerrante, N., Bonner, F and Okinaka, G. (1957). Turnover of S³⁵-sulfate in the epiphyses and diaphyses of suckling rats. *J. Exp. Med.* 106, 509-524.
- Eisenbath, G.S., Benttel, S.C. and Leibovitz, H.F. (1974). Inhibition of cartilage macromolecular synthesis by prostaglandin A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 189, 213-220.
- Ekholm, R. (1951). Articular cartilage nutrition. *Acta Anat. Suppl.*, 15, 1-76.
- Ekman, L. Nilsson, G and Persson, L. (1980). Volume of the synovia in certain joint cavities in the horse. (personal communication).
- Ely, L. W., and Mensor, M.C. (1933). Studies on the immobilization of the normal joints. *Surg. Gynec. Obstet.* 57, 212-215.
- Engl, G.A. and Chrisman, O.D. (1977). Experimental arthritis in rabbit knees: study of relief of pressure on one tibial plateau in immature and mature rabbits. *Clin. Orthop.*, 125, 221-226.
- Engvall, E. and Ruoslahti, E. (1977). Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* 20, 1-5.
- Engvall, E., Ruoslahti, E and Miller, E.J. (1978). Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibronectin. *J. Exp. Med.* 147, 1584-1595.
- Enneking, W.F. and Horowitz, M. (1972). The intra-articular effects of immobilization on the human knee. *J. Bone Jt. Surg.* 54-A, 885-973.

Eronen, I., Videman, T., Friman, C. and Michelsson, J.E. (1978). Glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthritis caused by immobilization. *Acta Orthop. Scand.*, 49, 329-334.

Evans, E.B., Eggers, G.W.N., Butler, J.K. and Blumel, J. (1960). Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. *J. Bone Jt. Surg.* 42-A, 737-758.

Finsterbush, A., Friedman, B. (1973). Early changes in immobilized rabbits knee joints: A light and electron microscopic study. *Clin. Orth. Rel. Res.*, 92, 305-319.

Fisher, A.G.T. (1923). Some researches into the physiological principles underlying the treatment of injuries and diseases of the articulations. *Lancet*, 2, 541-548.

Fletcher, E., Jacobs, J. and Markham R.L. (1955). Hyaluronic acid of synovial fluid in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Sci.* 14, 653-660.

Franzen, A. Heinegard, D. and Inerot, S., Variations in the composition of bovine hip articular cartilage proteoglycans with distance from the articular surface (personal communication).

Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Engstrom-Laurent, A. and Laurent, U.B.C. (1982). The clearance of hyaluronic acid from the blood stream in human (personal communication).

Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Pertoft, H. and Baxter, E. (1981). Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.* 200, 415-424.

Freeman, M.I., Jacobson, B. and Balazs, E.A. (1979). The chemical composition of vitreous hyalocyte granules. *Exp. Eye Res.* 29, 479-484.

Friedberger, E. (1913). Ueber aseptische erzeugte Gelenkschwellungen beim Kaninchen. *Berliner Klin. Wochenschr.* 50, 88.

Friman, C. and Brunish, R. (1966). A one electrophoretic study of acid mucopolysaccharides (AMPS) in normal human serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122, 599-601.

- Fuller, J.A. and Ghadially, F.N. (1972). Ultrastructural observations on surgically produced partial thickness defects in articular cartilage. Clin. Orth. Rel. Res. 86, 193-205.
- Gardner, D.L. (1960). The experimental production of arthritis: A review. Ann Rheum. Dis. 19, 297-317.
- Ghadially, F.N. (1975). In Ultrastructural Pathology of the Cell. Butterworth, London.
- Ghadially, F.N. (1978). Fine structure of joints, in The Joints and Synovial Fluid, Vol. 1, (ed. L. Sokoloff), Academic Press, New York, pp. 105-176.
- Ghadially, F.N. (1981). Structure and function of articular cartilage. Clin. Rheum. Dis. 7, 3-28.
- Ghadially, F.N., Fuller, J.A., and Kirkaldy-Willis, W.H. (1971). Ultrastructure of full thickness defects in articular cartilage. Arch. Path., 92, 356-369.
- Ghadially, J.A. and Ghadially, F.N. (1975). Evidence of cartilage flow in deep defects in articular cartilage. Virchow's Arch. B: Cell Path. 18, 193-204.
- Ghadially, J.A., Ghadially, R., Ghadially, F.N. (1977). Long-term results of deep defects in articular cartilage. Virchow's Arch. B. Cell Path. 25, 125-136.
- Ghadially, F.N. and Roy, S. (1966). Ultrastructure of rabbit synovial membrane. Ann. Rheum. Dis. 25, 318-325.
- Ghadially, F.N. and Roy, S. (1969). Ultrastructure of synovial joints in health and disease., London, Butterworth Ltd., p. 97-104.
- Ghadially, F.N., Thomas, I., Oryschak, A.F. and Lalonde, J.M.A. (1977). Long-term results of superficial defects in articular cartilage. J. Path. 121. 213-217.
- Gibbs, D.A, Merrill, E.W, Smith, K.A and Balazs, E.A. (1968) Rheology of Hyaluronic acid. Biopolymers, 6, 777-791.

Gibbs, D.A., Merrill, E.W., Smith, K.A. and Balazs, E.A. (1968). The rheology of hyaluronic acid. *Biopolymers*, 6, 777-791.

Gillard, G.C., and Lowther, D.A. (1976). Carrageenin-induced arthritis. III. The effect of intra-articular injection of carrageenin on the synthesis of proteoglycan in articular cartilage. *Arth. Rheum.* 19, 918-922.

Ginsberg, J.M., Eyring, E.J. and Curtiss, P.H. (1969). Continuous compression of rabbit articular cartilage producing loss of hydroxyproline before loss of hexosamine. *J. Bone Jt. Surg.* 51-A, 467-471.

Glaser, L. and Brown, D.H. (1955). The enzymatic synthesis in vitro of hyaluronic acid chains. *National Acad. Sci.*, 41, 253-260.

Glynn, L.E. (1968). The chronicity of inflammation and its significance in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 27, 105-121.

Glynn, L.E. (1969). The etiology of rheumatoid arthritis with regard to chronicity. *Ann. Rheum. Dis.* 28 (Suppl), 3-4.

Goldie, I. (1970). The synovial microvascular derangement in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Acta Orthop. Scand.* 40, 751-764.

Greenwald, R.A. (1981). The role of oxygen-derived free radicals (ODFR) in connective tissue degradation. III. Studies on hyaluronic acid (HA) depolymerization in inflamed synovial fluids (SF).

Greenwald, R.A. and Moy, W.W. (1980). Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arth. Rheum.* 23, 455-463.

Gritzka, T.L., Fry, L.R., Cheesman, R.L. and LaVigne, A. (1973). Deterioration of articular cartilage caused by continuous compression in a moving rabbit joint. *J. Bone Jt. Surg.* 55- A, 1698-1720.

Hahn, L. (1945). Über die Spaltung der Hyaluronsäure durch Mucopolysaccharasen aus Blutegel und Cl. perfringens. *Arkiv Kemi. Miner. Geol.* 19, A, 1-10.

Hall, J.M. and Pribnow, J.F. (1977). Effect of concanavalin-A on ocular immune responses. J. Reticuloendothel. Soc. 21,163-170.

Hall, M.C. (1963). Cartilage changes after experimental immobilization of the knee joint of the young rat. J. Bone Jt. Surg. 45-A, 36-44.

Handley, C.J., Lowther, D.A. (1976). Inhibition of proteoglycan biosynthesis by hyaluronic acid in chondrocytes in cell culture. Biochim. Biophys Acta 444, 69-74.

Handley, C.J. and Phelps, C.F. (1972). The biosynthesis in vitro of chondroitin sulphate in neo-natal rat epiphysial cartilage. Biochem. J., 126, 417-432.

Harrison, M.H.M., Schajowicz, F., and Trueta J. (1953). Osteoathritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. J. Bone Jt. Surg. 35-B, 598-626.

Hasselbacher, P. (1981). Structure of the synovial membrane. Clin. Rheum. Dis. 7, 57-69.

Hay, J. B. (1973). The production of biologically active factors in lymph following stimulation with concanavalin A. Int. Arch. Allergy 44, 569-584.

- Helfet, A.J. (1974). Disorders of the Knee, T.B. Lippincott Co., Philadelphia, p. 179.
- Herman, J.H., Nozoe, M. and Nutman, T.B. (1977). Phytomitogen induced lymphokine mediated suppression of chondrocyte glycosaminoglycan synthesis. Abst. XIV Int. Cong. Rheum., San Francisco, p. 225.
- Hewitt, A.T., Kleinman, H.K., Pennypacker, J.P. and Martin, G.R. (1980). Identification of adhesion factor for chondrocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 385-388.
- Hoffman, P., Linker, A. Sampson, P., Meyer, K. and Korn, E.D. (1957). The degradation of hyaluronate, the chondroitin sulfates and heparin by bacterial enzymes (flavobacterium). Biochem. Biophys. Acta. 25, 658-659.
- Hollander, J.L. (1969). A pathogenetic rationale for early synovectomy in rheumatoid arthritis. Proc. of the Symposium on Early Synovectomy in Rheumatoid Arthritis, April, 1967. (eds. W. Hijmans, W.D. Paul, and H. Herschel,) Amsterdam, Excerpta Medica, p. 61-71.
- Hollander, J.L., McCarty, D.J., Astorga, G. and Castro-Murillo, E. (1965). Studies on the pathogenesis of rheumatoid joint inflammation. I. The "R.A. cell" and a working hypothesis. Ann. Int. Med. 62, 271-280.
- Hooper, K. E., Adelman, B.C., Gentner, G. and Gay, S. (1976). Recognition by guinea-pig peritoneal exudate cells of conformationally different states of the collagen molecule. Immunology 30, 249-259.
- Hultsch, E. and Balazs, E.A. (1973). In vitro synthesis of glycosaminoglycans and glycoproteins by cells of the vitreous. Association for Research in vision and Ophthalmology, Annual Meeting, p. 43.
- Hultsch, E. and Balazs, E.A. (1975). Transport of hyaluronic acid from vitreous: mechanism and dynamics. Annual Meeting of the Association for research in Vision and Ophthalmology (ARVO) p. 2.
- Hultsch, E., Freeman, M.I. and Balazs, E.A. (1974). Transport and Regeneration of Hyaluronic Acid in Extracellular Ocular Compartments. ARVO Abstr. 11, p. 97. Sarasota.

- Huzella, T. (1932). Der "elastomotorische" Histomechanismus der Krebsinfiltration. *Virchow's Arch. Path Anat. Phys.* 287, 491-512.
- Huzella, T. (1937). Mikromechanische Grundlage der Wundheilung. *Arch. klin. Chir.* 188, 411-425.
- Huzella, T. (1939). Nature de la paroi alveolaire du poumon. *Compt. rend d'Ass. des Anat.* 34, 155-166.
- Huzella, T. and Lengyel, J. (1932) Orientation de la croissance des cultures de tissue sur la trame fibrillaire artificielle coagulée de la solution de "collagene A" (Nageotte) par les forces de la cristallisation. *Compt. rend. Soc. de Biologie*, 109, 515-518.
- Iammartino, A.J., Anderson, B., Donakowski, C. and Schmid, F.R. (1980). Detection of fibronectin in rheumatoid and non-rheumatoid synovial fluids and cryoproteins. *Arth. Rheum.* 23, 694.
- Inerot, S. Heinegård, D., Audell, L. and Olsson, S.E. (1978). Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis. *Biochem. J.*, 169, 143-156.
- Inerot, S. and Heinegård, D. (1982a). Structure and composition of articular cartilage proteoglycans in experimental osteoarthritis (personal communication).
- Inerot, S. and Heinegård, D. (1982b). Articular cartilage proteoglycans at ageing and osteoarthritis. In Glycoconjugates, Vol. IV. (ed. Horowitz), Academic Press, N.Y. and London. (In press).
- Inoue, K., Yoshio, O., Nishioka, K., Satoh, Y., and Mikanagi, K. (1979). Examination of the vascular network in the knee synovium and capsule with the magnifying arthroscope. *Orthop. Clin. N. Am.* 10, 549-557.
- Irwin, D.H.G. (1980). Sodium hyaluronate in equine traumatic arthritis. *J.S. Afr. Vet. Assn.* (personal communication).
- Jacobsen, S. and Sperling, S. (1978). Scanning electron microscopic observations of a mucopolysaccharide coating on human corneal endothelium. *Acta Ophth.* 56, 161-167.
- Jacobson, B. (1970). The biosynthesis of hyaluronic acid. In Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. (ed. E.A. Balazs) Academic press, 2, 763-781.
- Jacobson, B. (1975). Biosynthesis of hyaluronic acid in the vitreous. Studies on a particulate hyalocyte glycosyl transferase. *Abst. Spring 1973 Meeting, ARVO*, p. 2

Jacobson, B. (1978a). Biosynthesis of hyaluronic acid in the vitreous. V. Studies on a particulate hyalocyte glycosyl transferase. *Exp. Eye Res.* 27, 247-258.

Jacobson, B. (1978b). Biosynthesis of hyaluronic acid in the vitreous. VI. Isolation of a complex containing hyaluronic acid and glycosyl transferase activity and studies on the activity of a soluble glycosyl transferase. *Exp. Eye Res.* 27, 259-273.

Janis, R. and Hamerman, D. (1969). Articular cartilage changes in early arthritis. *Bull Hosp. Joint. Dis.* 30, 136-152.

Jasin, H.E., Cooke, T.D., Hurd, E.R., Smiley, J.D. and Ziff, M. (1973). Immunologic models used for the study of rheumatoid arthritis. *Fed. Proc.* 32, 147-152.

Jasin, H.E. and Ziff, M. (1969). Immunoglobulin and specific antibody synthesis in a chronic inflammatory focus: antigen-induced synovitis. *J. Immunol.* 102, 355-369.

Jayson, M.I.V. (1981). Intra-articular pressure. In *The Biology of the Joint* (Clinics in Rheumatic Disease), Vol. 7, (ed. P. Hasselbacher). W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 149-166.

Jebens, E. H. and Monk-Jones, M.E. (1959). On the viscosity and pH of synovial fluid and the pH of blood. *J. Bone, Jt. Surg.* 41B, 388-400.

Jilek, F. and Hörmann, H. (1979). Fibronectin (Cold-insoluble globulin), VI. Influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of native collagen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 597-603.

Johansson, S. and Höök, M. (1980). Heparin enhances the rate of binding of fibronectin to collagen. *Biochem. J.* 187, 521-524.

Kendall, F.E., Heidelberger, M. and Dawson, M.H. (1937). Serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus. *J. Biol. Chem.* 118, 61-69.

Key, J.A. (1928). The synovial membrane of joints and bursae. In *Special Cytology*. (ed. E.V. Cowdry). P.B. Hoeber, New York, pp. 735-766.

Kind, L.S. and Petersen, W.A. (1968). Concanavalin A in vivo: induction of hemorrhagic skin lesions (arthus-like reactions) in mice. *Science*, 160, 312-313.

- Kleinman, H.K., McGoodwin, F.B. and Klebe, R.J. (1976). Localization of the cell attachment regions in type I and II collagens. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72, 426-432.
- Kloucek, F. (1967). The corneal endothelium. *Acta. Univ. Carol. Med.* 13, 321-375.
- Kulka, J.P. (1966). Vascular derangement in rheumatoid arthritis. In Modern Trends in Rheumatology (ed. A. Hill), Butterworth, London, pp. 49-69.
- Kurki nen, M., Alitalo, K., Vaheri, A., Stenman, S., and Saxen L. (1979). Fibronectin in the development of embryonic chick eye. *Dev. Biol.* 69, 589-600.
- Labat-Robert, J. (1981). Structural glycoproteins of connective tissue. In Connective Tissue Research: Chemistry, Biology, and Physiology (eds. Z Deyl and M. Adam), Alan. R. Liss, Inc., New York, pp. 73-86.
- Labat-Robert, J., P. Birembaut, Robert, L. and Adnet, J.J. (1981). Modification of fibronectin distribution pattern in solid human tumours. *Diagnostic Histopathology*, Vol. 4, 299-306.
- Labat-Robert, J., Derouette, J.C., Mercantini, F. and Potazman, J.P. (1981). Micro-method for determination of plasma fibronectin by laser nephelometry. (Personal communication).
- Labat-Robert, J., Potazman, J.P., Derouette, J.C. and Robert, L. (1981). Age-dependent increase of human plasma fibronectin. *Cell Bio. Int. Rep.*, 5, 10, 969-973.
- Lai, W.M., Kuei, S.C. and Mow, V.C. (1977). Computation of stress relaxation function and apparent viscosity from dynamic data of synovial fluids. *Biorheology*, 14, 229-236.
- Lai, W.M., Kuei, S.C. and Mow, V.C. (1978). Rheological equations for synovial fluids. *J. Biomech. Engin.*, 100, 169-186.
- Landells, J.W. (1957). The reactions of injured human articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg.* 39B, 548-562.
- Langenskiöld, A., Michelsson, J-E., and Videman, T. (1975). Osteoarthritis of the knee in the rabbit produced by immobilization. *Scand. J. Rheum. suppl.* 8, 7-8.
- Langlois, P. (1981). Acide hyaluronique en pratique vétérinaire equine., presented at the 1st European Conference for Medecine and Equestrian Sports, Saumur, France, September 18-20, 1981.

- Latterra, J. and Culp, L.A. (1982). Differences in hyaluronate binding to plasma and cell surface fibronectins. *J. Biol. Chem.* 719-726.
- Laurent, T.C. (1957). *Physico-Chemical Studies on Hyaluronic Acid*, Almquist & Wiksells Boktryckeri AB, Uppsala, Sweden, p. 28.
- Laurent, T.C. (1964). The interaction between polysaccharises and other macromolecules. IX. The exclusion of molecules from hyaluronic acid gels and solutions 1. *Biochem. J.* 93, 106-112.
- Laurent, T. (1970). Structure of hyaluronic acid. In The Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Vol. II (ed. E.A. Balazs). Academic Press, New York, pp. 703-732.
- Laurent, T.C., Barany, E., Carlsson, B. and Tidare, E. (1969). Determination of hyaluronic acid in the microgram range. *Anal. Biochem.* 31, 133-145.
- Laurent, T.C. and Gergely, J. (1955). Light scattering studies on hyaluronic acid. *J. Biol.Chem.* 212, 325-333.
- Laurent, T.C. and Obrink, B. (1972). On the restriction of the rotational diffusion of proteins in polymer networks. *Eur. J. Biochem.* 28. 94-101.
- Laurent, T.C. Ryan, M. and Pietruszkiewicz, A. (1960). Fractionation of hyaluronic acid. The polydispersity of hyaluronic acid from the vitreous body. *Biochim. Biophys. Acta* 42, 476-485.
- Laurent, U.B.G. (1982). Hyaluronate in aqueous humour *Exp. Eye Res.*, 33, 147-155.
- Laurent, U.B.G. and Fraser, J.R.E. (1982). Turnover of hyaluronate in the aqueous humour and vitreous body of the rabbit. (personal communication).
- Laurent, U.B.G. and Granath, K.A. (1982). The molecular weight of hyaluronate in the aqueous humor and vitreous body of rabbit and cattle eyes (personal communication).
- Laurent, U.B.G. and Laurent, T.C. (1981). On the origin of hyaluronate in blood. *Biochem. Internat.* 2, 195-199.
- Laurent, U.B.G. and Tengblad, A. (1980). Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. *Anal. Biochem.*, 100, 386-394.

- Lengyel, J. (1930). La solution collagene comme milieu de culture. Compt. rend. de l'Ass. Zellf., 11.
- Levenson, H. and Cochrane, C.G. (1964). Non-precipitating antibody and the arthus vasculitis. J. Immunol. 92, 118-127.
- Liew, M., and Dick, C.W. (1981). The Anatomy and physiology of blood flow in a diarthrodial joint. Clin. Rheum. Dis. 7, 131-148.
- Lillie, R.D., Histopathologic Technique and Practical Histochemistry. Philadelphia, McGraw-Hill Book Co., 1965.
- Lindblad, G., Ollson, S.E. Schrantz, Heinegard, D., Inerot, S., and Reiland (1982). The effect of Healon^R on experimental osteoarthritis in the dog (personal communication).
- Linder, E., Stenman, S., Lehto, V.P. and Vaheri, A. (1978). Distribution of fibronectin in human tissues and relationship to other connective tissue components. Ann. N.Y. Acad. Sci. 312, 151-159.
- Linder, E., Vaheri, A., Ruoslahti, E. and Wartiovaara, J. (1975). Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo. J. Exp. Med. 142, 41-49.
- Linker, A., Meyer K. and Hoffman, P., (1956). The production of unsaturated uronides by bacterial hyaluronidases. J. Biol. Chem. 219, 13-25.
- Linker, A., Meyer K. and Hoffman, P. (1960). The production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali. J. Biol. Chem 235, 924-927.
- Linker, A., Meyer, K., and Weissmann, B. (1955). Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. J. Biol. Chem. 213, 237-248.
- Linsenmayer, T.F., Kochhar, D.M. (1979). In vitro cartilage formation: effects of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) on glycosaminoglycan and collagen synthesis. Dev. Biol. 69, 517-528.

- Loewi, G. (1968). Experimental immune inflammation in the synovial membrane. I. The immunological mechanism. *Immunology* 15, 417-427.
- Longas, M.O. and Meyer, K. (1981). Sequential hydrolysis of hyaluronate by B-glucuronidase and B-N-acetylhexsaminidase. *Biochem. J.* 197, 275-282.
- Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lowther, D.A., Sandy, J.D., Santer, B.S. and Brown, H.L.G. (1978). Antigen-induced arthritis: Decreased proteoglycan content and inhibition of proteoglycan synthesis in articular cartilage. *Arth. Rheum.*, 21, 675-680.
- Makinen, P. (1958). Synovial fluid in rheumatoid arthritis with special reference to intra-articularly applied hydrocortisone. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Suppl. 7)* 36, 1-70.
- Mankin, H.J. (1962). Localization of tritiated thymidine in articular of rabbits. I. Growth in immature cartilage. *J. Bone Jt. Surg.*, 44-A, 682-698.
- Mankin, H.J. (1974). The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. *N. E. J. Med.* 291, 1285-1292.
- Mankin, H.J. and Boyle, C.J. (1967). The acute effects of lacerative injury on DNA and protein synthesis in articular cartilage. *Proceedings of a Workshop on Cartilage - Degradation and Repair. Nat. Res. Council, Nat. Acad. of Sci., Nat. Acad. of Engineering, Washington, D.C. pp. 185-199.*
- Mark, K. von der, Mark, H. von der, Rimpl, R. and Trelstad, R.L. (1977). Immunofluorescent localization of collagen types I, II, and III in the embryonic chick eye. *Dev. Biol.* 59,75-85.
- Markovitz, A., Cifonelli, J.A. and Dorfman, A. (1959). The biosynthesis of hyaluronic acid by group A streptococcus. VI. Biosynthesis from uridine nucleotides in cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* 234, 2343-2350.

- Markovitz, A. and Dorfman, A. (1962). Synthesis of a capsular polysaccharide (hyaluronic acid) by protoplast membrane preparations of group A streptococcus. *J. Biol. Chem.* 237, 273-279.
- Maroudas, A. and Venn, M. (1977). Chemical composition and swelling of normal and osteoarthritic femoral head cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 36, 399-406.
- Martinez-Hernandez, A., Marsh, C.A., Clark, CC, Macarak, E.J., Brownell, A.G. (1981). FN. Its relationship to Basement Membranes II. Ultrastructural studies in rat kidney. *Collagen Rel. Res.* 1981, 1, 405-418.
- Matalon, R. and Dorfman, A. (1968). The accumulation of hyaluronic acid in cultured fibroblasts of the Marfan Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 32, 150-154.
- Matoltsy, A.G., Gross, J. and Grignolo, A. (1951). A study of the fibrous components of the vitreous body with the electron microscope. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 76, 857-860.
- Mayor, M.B. and Moskowitz, R.W. (1974). Metabolic studies in experimentally-induced degenerative joint disease in the rabbit. *J. Rheum.* 1, 17-23.
- McDevitt, C., Gilbertson, E. and Muir, H. (1977). Experimental model of osteoarthritis: early morphological and biochemical changes. *J. Bone Jt. Surg.*, 59B, 24-35.
- McDevitt, C.A. Muir, H., and Pond, M.J. (1974). Biochemical events in early osteoarthritis. In Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage, (eds. S.Y. Ali, M.W. Elves and D.H. Seabock), London, Institute of Orthopedics, pp. 207-215.
- Meachim, G. (1963). The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J. Bone Jt. Surg.* 45b, 150-161.
- Meachim, G. and Collins, D.H. (1962). Cell counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulfate $^{35}\text{SO}_4$ in vitro. *Ann. Rheum. Dis.* 21, 45-50.
- Meachim, G., Ghadially, F.N. and Collins, D.H. (1965). Regressive changes in the superficial layer of human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 24, 23-30.
- Mendenhall, W. (1964). Introduction to Statistics, Wadsworth Publ Co., Belmont, CA. 305 p.

- Meyer, K and Palmer, J.W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107, 629-634.
- Meyer, K. and Palmer, J.W. (1936). On glycoproteins. II. The polysaccharides of vitreous humor and of umbilical cord. *J. Biol. Chem.* 114, 689-703.
- Meyer, K., Smyth, E.M. and Gallardo, E. (1938). On the nature of the ocular fluids. 11. The hexosamine content. *Am. J. Ophth.* 21, 1083-1090.
- Mikuni-Takagaki, Y and Toole, B.P. (1981). Hyaluronate-protein complex of Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 256, 8463-8469.
- Mital, M.A. and Millington, P.F. (1971). Surface characteristics of articular cartilage. *Micom.*, 2, 236-249.
- Mitnick, H., Hoffstein, S. and Weissmann, G. (1978). Fate of antigen after intra-venous and intra-articular injection into rabbits. *Arth. Rheum.*, 21, 918-929.
- Montgomery, R. and Nag, S. (1963). Periodate oxidation of hyaluronic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 74, 300-302.
- Morris, E.R., Rees D.A. and Welsh, E.J. (1980). Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions, *J. Mol. Biol.* 138, 383-400.
- Mosher, D.F., Proctor, R.A. and Grossman, J.E. (1981). Fibronectin: role in inflammation. In Advances in Inflammation Research, Vol. 2 (ed. G. Weissman), Raven Press, New York. pp. 187-207.
- Moskowitz, R.W. (1972). Experimental models of degenerative joint disease. *Sem. Arth. Rheum.* 2, 95-116.
- Moskowitz, R.W., Davis, W., Sammarco, J., Marten, M., Baker, J., Mayor, M., Burstein, A.M., Frankel, V.H. (1973). Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arth. Rheum.* 16, 397-405.
- Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Goldberg, V.M., Muniz, O. and Pita, J.C. (1979). Cartilage proteoglycan alteration in an experimentally-induced model of rabbit osteoarthritis. *Arth. Rheum.* 22, 155-162.

- Muir, H. (1977). A molecular approach to the understanding of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 36, 199-208.
- Muir, H. (1978). Cartilage structure and metabolism and basic changes in degenerative joint diseases. *Aust. N.Z. J. Med.*, 8, 1-5.
- Muir, H. (1979). Biochemistry. In Adult Articular Cartilage (ed. M.A.R. Freeman). Pitman Medical, London, pp.145-214.
- Müller, W. (1924). Experimental Untersuchungen über die Wirkung langdauernder Immobilisierung auf die Gelenke. *Zeitsch. f. Orthop. Chir.* 44, 478-488.
- Muir, K.D. (1972). Lysosomal enzymes in synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum Dis.* 31, 265-271.
- Murata, K. and Horiuchi, Y. (1977). Molecular weight-dependent distribution of acidic glycosaminoglycans in human plasma. *Clin. Chim. Acta* 75, 59-69.
- Nageotte, J., and Guyon, L. (1930). Reticulin, *Am. J. Path* 6, 631-634.
- Nettelbladt, E., Sundblad, L. and Jonsson, E. (1963). Permeability of the synovial membrane to proteins. *Acta Rheum. Scand.*, 9, 28-32.
- Nicholson, G.L. (1974). The interaction of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39, 89-190.
- Öbrink, B. and Laurent, T.C. (1974). Further studies on the rotation of globular proteins in polymer solutions. *Eur. J. Biochem.* 41, 83-90.
- Odell, R.T. and Key, J.A. (1956). The production of anaphylactic arthritis with the use of Freund's adjuvants. *Surg Forum* 7, 596-600.
- Ogata, K., Whiteside, L.A., Lesker, P.A. and Simmons, D.J. (1977). The effect of varus stress on the moving rabbit knee joint. *Clin. Orthop.*, 129, 313-318.

- Ogston, A.G. and Stanier, J.E. (1950). On the state of hyaluronic acid in synovial fluid. *Biochem. J.* 46, 364-376.
- Ogston, A.G. and Stanier, J.E. (1951). The dimensions of the particle of hyaluronic acid complex in synovial fluid. *Biochem. J.*, 49, 585-590.
- Ogston, A.G. and Stanier, J.E. (1952). Further observations on the preparation and composition of the hyaluronic acid complex of ox synovial fluid. *Biochem. J.* 52, 149-156.
- Ogston, A.G. and Stanier, J.E. (1953). The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid : viscous, elastic and lubricant properties, *J. Physiol.*, 119, 244-252.
- Olsen, B. (1965). Electron microscope studies on collagen. IV. Structure of vitrosin fibrils and interactions properties of vitrosin molecules. *J. Ultrastructure Res.* 13, 172-191.
- Österlin, S.E. (1968a). The synthesis of hyaluronic acid in vitreous. III. In vivo metabolism in the owl monkey. *Exp. Eye Res.* 7, 524-533.
- Österlin, S.E. (1968b). Macromolecular composition and fine structure of the vitreous in the owl monkey. *Exp. Eye Res.* 7, 534-545.
- Österlin, S.E. (1969). The synthesis of hyaluronic acid in the vitreous. IV. Regeneration in the owl monkey. *Exp. Eye Res.* 8, 27-34.
- Österlin, S. (1977a). On the molecular biology of the vitreous in the aphakic eye. *Acta Ophthalmologica.* 55, 353-361.
- Österlin, S. (1977b). Vitreous changes after cataract extraction. Ch. 2 in Vitreous Surgery and Fundus Diagnosis and Treatment. (eds: Freeman, H.M., Hirose, T. and Schepens, C.L.) Appleton, Century, Crofts, N.Y., N.Y. pp.15-21.
- Österlin, S. (1978). Macromolecular composition of the vitreous in the aphakic owl monkey eye. *Exp. Eye Res.* 26, 77-84.
- Österlin, S.E. and Balazs, E.A. (1968). Macromolecular composition and fine structure of the vitreous in the owl monkey. *Exp. Eye Res.* 7, 534-545.

Österlin, S.E. and Jacobson, B. (1968). The synthesis of hyaluronic acid in vitreous. I. Soluble and particulate transferases in hyalocytes. *Exp. Eye Res.* 7, 497-510.

Palmoski, M.J. and Brandt, K.D. (1981). Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast. *Arth. Rheum.* 24, 1329-1337.

Pearlstein, E., Gold, L.I. and Garcia-Pardo, A. (1980). Fibronectin: a review of its structure and biological activity. *Mol. Cell. Biochem.* 29, 103-128.

Pearson, C.M. (1964). Experimental models in rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.* 7, 80-86.

Pearson, C.M. and Wood, F.D. (1964). Passive transfer of adjuvant arthritis by lymph node or spleen cells. *J. Exp. Med.* 120, 547-560.

Persson, L. (1971). On the synovia in horses. A clinical and experimental study. *Acta Vet. Scand. Supp.* 35, 29-43.

Peyron, J. Balazs, E.A. (1974). Preliminary clinical assessment of Na-hyaluronate injection into human arthritic joints. *Path. Biol.* 22, 731-736.

Phillips, M.W. (1980). Report given at the 26th Annual Convention of the Am. Assoc. Equine Pract.; Anaheim, CA.

Pond, M.J. and Nuki, G. (1973). Experimentally induced osteoarthritis in the dog. *Ann. Rheum. Dis.* 32, 387-388.

Poole, A.R. (1970). The relationship between toluidine blue staining and hexuronic acid content of cartilage matrix. *Histochem. J.* 2, 425-430.

Poole, A.R. and Coombs, R.R.A. (1977). Rheumatoid-like joint lesions in rabbits injected intravenously with bovine serum. *Int. Arch. All. Appl. Immun.* 54, 97-113.

Poole, A.R., Oldham, G. and Coombs, R.R.A. (1978). Early rheumatoid-like lesions in rabbits injected with foreign serum: Relationship to localization of immune complexes in the lining tissues of joints and cellular content of synovial fluid. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 57, 135-145.

Preston, B.N., Obrink, B, and Laurent, T.C. (1973). The rotational diffusion of albumin in solutions of connective-tissue polysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 33, 401-406.

Putnam, D.A., Lubaroff, D.M. and Waksman, B.H. (1969). marrow as source cells in reactions of cellular hypersensitivity. III. Adjuvant arthritis in the rat. *Arth. Rheum.* 12, 215-219.

Ragan, C. and Meyer, K. (1949). The hyaluronic acid of synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 28, 56-59.

Rapport, M.M., Weissmann, B., Linker, A. and Meyer, K. (1951). Isolation of a crystalline disaccharide, hyalobiuronic acid, from hyaluronic acid. *Nature (London)* 168, 996-997.

Rawson, A.J. and Torralba, T.P. (1967). Induction of proliferative synovitis in rabbits by intra-articular injection of immune complexes. *Arth. Rheum.* 10, 44-52.

Reid, T. Kenny, M.C. and Waring, G.O. (1982). Isolation and characterization of fibronectin from bovine aqueous humor. *Invest. Opth. Vis. Sci.* 22, 57-61.

Renkin, E.M. (1979). Relation of capillary morphology to transport of fluid and large molecules. *Acta. Physiol. Scand (Suppl).* 463, 81-91.

Reyher, C. (1874). On the cartilages and synovial membranes of the joints. *J. Anat. Physiol.* 8, 261-273.

Richter, A.W. (1974). Non-immunogenicity of purified hyaluronic acid preparations tested by passive cutaneous anaphylaxis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 47, 211-217.

Richter, A.W., Ryde, E.M. and Zetterstrom, E.O. (1979). Non-immunogenicity of a purified sodium hyaluronate preparation in man. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 59, 45-48.

Robert, A.M., Robert B. and Robert, L. (1970). Chemical and physical properties of structural glycoproteins. In Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Vol, 1. (ed. E.A. Balazs), Academic Press, London, pp. 237-242.

Ropes, M.W., Robertson, W., Rossmiesl, E., Peabody, R.B. and Bauer, W. (1947). Synovial fluid mucin. Acta. Med. Scand. Suppl. 196, 700-744.

Rodén, L. (1980). Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans., Ch. 7 in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (ed. W.J. Lennarz), Plenum Press, New York, pp. 267-371.

Rodnan, G.P. and MacLachlan, M.J. (1960). The absorption of serum albumin and gamma globulin from the knee joint of man and rabbit. Arth. Rheum. 3, 152-157.

Rose, R.J. (1979). The intra-articular use of sodium hyaluronate for the treatment of osteo-arthrosis in the horse. New Zealand Vet. J. 27, 5-8.

Roy, S. and Ghadially, J.N. (1967a). Ultrastructure of normal rat synovial membrane. Ann. Rheum. Dis. 26, 26-38.

Roy, S. and Ghadially, J.N. (1967b). Synthesis of hyaluronic acid by synovial cells. J. Path. Bacteriol., 93, 555-557.

Roy, S, Ghadially, F.N. and Crane, W.A.J. (1966). Synovial membrane in traumatic effusion. Ultrastructure and autoradiography with tritiated leucine. Ann. Rheum. Dis., 25, 259-271.

Ruoslahti, E. and Engvall, E. (1980). Complexing of fibronectin glycosaminoglycans and collagen. Biochim. Biophys. Acta 631, 350-358.

Ruoslahti, E., Hayman, E.G. and Engvall, E. (1979). Molecular interactions of fibronectin. J. Supramolec. Struct.

Rydell, N. (1970). Decreased granulation tissue reaction after installment of hyaluronic acid. Acta Orthop. Scand. 41, 307-311.

Rydell, N. (1972). The effect of intraarticular injection of hyaluronic acid in the knee joint. A double blind clinical trial (personal communication).

Rydell, N. and Balazs, E.A. (1971). Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation. Clin. Orthop. 80, 25-32.

Rydell, N.W. Balazs E.A. and Freeman, M.I., (1971). Effect of hyaluronic acid on wound healing. I. Experimental surgical studies on tendon and scleral wounds. Manuscript (Pers. Comm).

- Rydell, N.W., Butler, J. and Balazs, E.A. (1970). Hyaluronic acid in synovial fluid. *Acta. Vet. Scand.*, 11, pp. 139-155.
- Salter, R.B. and Field, P. (1960). The effects of continuous compression on living articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg.* 42-A, 31-49 and 76 and 90.
- Scaglietti, O. and Casuccia, C. (1936). Studio sperimentale degli effetti della immobilizzazione su articolazioni normali. *Chir. Degli Org. di Movimento* 21, 469-488.
- Schiller, S. and Dewey, K.F. (1956). Isolation of chondroitinsulfuric acid from normal human plasma. *Fed. Proc.* 15, 348.
- Schubert, M and Hamerman, D.A. (1968). A Primer on Connective Tissue Biochemistry. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Schumacher, H.R. (1975). Ultrastructure of the synovial membrane. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 5, 489-498.
- Schwarz, W. (1951a). Die Gelkörperfibrillen des menschlichen Glaskörpers. *Zeitschrift für Zellforschung.* 36, 284-292.
- Schwarz, W. (1951b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Glaskörperstrukturen im Rinderauge. *Zeitschrift für Zellforschung.* 36, 45-61.
- Schwartz, E.R. and Greenwald, R.A. (1979-80). Experimental models of osteoarthritis. *Bull. Rheum. Dis.*, 1030-1033.
- Schweer, G., Grunkorn, M.L. and Michalik, M. (1956). Studien über das Glucosamin des Glaskörpers IV. Mitteilung. Der Glucosamingehalt der intraocularen Flüssigkeiten beim Rind unter besonderer Berücksichtigung des Bildungsortes der Hyaluronsäure im Auge. *Albrecht v. Graefes Arch. für Ophth.* 158, 71-80.
- Schweer, G. and Karell, E. (1956). Studien über das Glucosamin des Glaskörpers III. Mitteilung. Über die räumliche Verteilung des Glucosamins im Rinderglaskörper. *Albrecht v. Graefes Arch. für Ophth.* 157, 422-428.

Scott, D.L., Wainwright, A.C., Walton, K.W. and Willamson, N. (1981). Significance of fibronectin in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 40, 142-153.

Scott, J.E. (1965). Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In Methods in Carbohydrate Chemistry, (eds. R.L. Whisler, M.L. Wolfrom and T.N. BeMiller). Vol. V, Academic Press, New York, p. 38-44.

Seastone, C.V. (1939). Virulence of group C hemolytic streptococci of animal origin. *J. Exp. Med.* 70, 361-378.

Seppälä, P. (1964). Synovial fluid in rheumatoid arthritis. Physicochemical and chemical properties of hyaluronic acid and proteins with reference to the effect of corticosteroids. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 16, Suppl. 79, 1-108.

Seppälä, P., Balazs, E.A. (1969). Hyaluronic acid in synovial fluid. III. Effect of maturation and aging on the chemical properties of bovine synovial fluid of different joints. *J. Geron.* 24, 309-314.

Shands, A.R. (1931). The regeneration of hyaline cartilage in joints. An experimental study. *Arch. Surg.* 22, 137-178.

Shier, W.T. Trotter, J. T. and Reading, C.L. (1974). Inflammation induced by concanavalin A and other lectins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146, 590-593.

Siewert, G. and Strominger, J. L. (1967). Bacitracin: An inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cells walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 767-776.

Sliwinsky, A.S. and Zvaifler, N.J. (1970). In vivo synthesis of IgG by rheumatoid synovium. *J. Lab. Clin. Med.* 76, 304-310.

Smiley, J. D., Sachs, C. and Ziff, M. (1968) In vitro synthesis of immunoglobulin by rheumatoid synovial membrane. *J. Clin. Invest* 47, 624-632.

Smith, C. and Hamerman, D. (1968). Partial inhibition by cycloheximide of hyaluronate synthesis in cell culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 988-991.

Snowden, J.M. and Swann, D.A. (1980). Vitreous Structure V. The morphology and thermal stability of vitreous collagen fibers and comparison to articular cartilage (Type II) Collagen. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 19, 610-618

Sokoloff, L. (1979). Pathology and Pathogenesis of Osteoarthritis Chapter 73 in Arthritis and Allied Conditions (ed. D. J. McCarty Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 1135-1153.

Sood, S.C.,(1971). A study of the effects of experimental immobilization on rabbit articular cartilage. *J. Anat* 108, 497-507.

Stafford, C.T., Niedermeier, W., Holley, H.L. and Pigman, W. (1964). Studies of the concentration and intrinsic viscosity of hyaluronic acid in synovial fluids of patients with rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 23, 152-157.

Steinberg, M.E. McCrae, C.R. Cohen, L.D. and Schumacher, H.R. (1973). Pathogenesis of antigen-induced arthritis. *Clin. Orthop.* 97, 248-260.

Stenman, S. and Vaheri, A. (1978). Distribution of a new major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissue. *J. Exp. Med.* 147, 1054-1064.

Stoolmiller, A.C. and Dorfman, A. (1969). The biosynthesis of hyaluronic acid by streptococcus. *J. Biol. Chem.* 244, 236-246.

Sundblad, L. (1953). Studies on the hyaluronic acid in synovial fluids. *Acta Soc. Med. Upsal.* 58, 113-238.

Sundblad, L. (1965). Glycosaminoglycans and glycoproteins in synovial fluid. In The Amino Sugars: The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars, Vol. IIA, (eds. E.A. Balazs and R.W. Jeanloz), New York, Academic Press, pp. 229-250.

Sundblad, L. and Balazs, E.A. (1969). Chemical and physical changes of glycosaminoglycans and glycoproteins caused by oxidation reduction systems and radiation. In The Amino Sugars: The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars, II-B. Metabolism and Interactions (eds. E.A. Balazs and R.W. Jeanloz), Academic Press, New York, pp. 229-250.

Sutter, E.R. and Majno, G. (1964). Ultrastructure of the joint capsule in the rat: presence of two kinds of capillaries. *Nature* 202, 920-921.

Swann, D.A. (1978). Macromolecules of synovial fluid. In The Joints and Synovial Fluid. Volume I. (ed. L. Sokoloff) Academic Press, New York., pp. 407-435.

- Swann, D.A. and Constable, I.J. (1972). Vitreous structure. II. Role of hyaluronate. Invest. Ophth. 11,164-168.
- Swann, D.A., Constable, I.J. and Harper, E. (1972). Vitreous structure III. Composition of bovine vitreous collagen. Invest. Ophth, II, 735-738.
- Swann, D.A. and Sotman, S.S. (1980). The chemical composition of bovine vitreous-humour collagen fibres. Biochem. J. 185,545-554.
- Swanstrom, O.G. (1978). Hyaluronate (hyaluronic acid) and its use. Proc. Am. Assoc. Equine. Pract. 24th Ann. Conv., pp. 345-348.
- Sweeney, D.B. and Balazs, E.A. (1964). Fate of collagen and hyaluronic acid gels in solutions injected into the vitreous of the owl monkey. Invest. Ophth. 3,473.
- Sweeney, D.B., Balazs, E.A., and Karlin, D.B. (1962). A Study of the Macromolecular Components of Subretinal Fluid. Abstr. Invest. Ophthalmol. 1, 427.
- Szent-Györgyi, A. (1914). Die histologische Darstellung des Glaskörpers. Zeitschrift für Wiss. Mikroskopie, 31, 23-35.
- Szent-Györgyi, A. (1917) Untersuchungen über den Bau des Glaskörpers des Menschen. Arch. für Mikr. Anat. 89, 324-387.
- Szirmai, J.A. (1966). Effect of steroid hormones on the glycosaminoglycans of target connective tissue. In, The Amino Sugars: The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars, II-B. Metabolism and Interactions (eds. E.A. Balazs and R.W. Jeanloz), Academic Press, New York, pp. 129-154.
- Szirmai, J.A. and Balazs, E.A. (1958). Studies on the structure of the vitreous body III. Cells in the cortical layer. A.M.A. Arch Ophth. 59,34-48.
- Taniguchi, N. Moriya, N. and Nanba, I. (1974). Isolation and preliminary characterization of glycosaminoglycans in human plasma. Clin. Chim. Acta. 50, 319-328.
- Telhag, H. and Lindberg, L. (1972). A method for inducing osteoarthritic changes in rabbits' knees. Clin. Orthop. Rel. Res. 86, 215-223.

Tengblad, A. (1980). Quantitative analysis of hyaluronate in nanogram amounts. *Biochem. J.* 185, 101-105.

Terranova, V.P., Rohrbach, D.H. and Martin, G.R. (1980). Role of laminin in the attachment of PAM of 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell*, 22, 719-726.

Thaxter, T.H., Mann, R.A. and Anderson, C.E. (1965). Degeneration of immobilized knee joints in rats. *J. Bone, Jt. Surg.* 47, 567-585.

Thompson, R.C. and Bassett, C.A. (1970). Histological observations on experimentally induced degeneration of articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg.* 52-A, 435-443.

Thoss, K., Raabe, G. and Müller, P. (1975). Lektinarthrititis -- ein neues Arthritismodell. 10. Jahrestagung der Gesellschaft für Klinische und Experimentelle Immunologie, Leipzig.

Thoss, K., Raabe, G. and Muller, P. (1976). Lektinarthrititis--ein neues Arthritismodell. *Allergie u. Immunol.* 22, 311-316.

Tischendorf, F. and Curri, S.B. (1958). Morphologische and histochemische Veränderungen im reticuloendothelialen System (RES) nach Verabreichung von Hyaluronsäure. *Naturwissenschaften* 19, 1-2.

Trias, A. (1961). Effect of persistent pressure on the articular cartilage. An experimental study. *J. Bone Jt. Surg.* 43-B, 376-386.

Troyer, H. (1974). Microspectrophotometric analysis of metachromatic staining intensities in cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 293.

Troyer, H. (1975). The effect of short-term immobilization on the rabbit knee joint cartilage. *Clin. Orthop.* 107, 249-257.

Varga, L. (1955). Studies on hyaluronic acid prepared from the vitreous body. *J. Biol. Chem.*, 217, 651-658.

- Varga, L. and Gergely, J. (1957). Double refraction of flow studies on hyaluronic acid prepared from the vitreous body. *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 1-5.
- Varga, L., Pietruszkiewicz, A. and Ryan, M. (1959). Sedimentation, diffusion, and double refraction of flow studies on cetyl pyridinium hyaluronate. *J. Polymer. Sci.*, 38, 319-327.
- Varma, R., Varma, R.S., Allen, W.S., and Wardi, A.H. (1974). On the carbohydrate-protein linkage group in vitreous humor hyaluronate. *Biochim. Biophys. Acta*, 263, 584-588.
- Videman, T., Michelson, J.E., Rauhamäki, R. and Langenskiöld, A. (1976). Changes in ³⁵S-sulfate uptake in different tissue in the knee and hip regions of rabbits during immobilization, remobilization and the development of osteoarthritis. *Acta Orthop. Scand* 47, 290-298.
- Vrabec, F. (1958). Studies on the corneal and trabecular endothelium. 1. Cement substance of the corneal endothelium. *Br. J. Ophthalmol* 42, 529-534.
- Vrabec, F. (1961). The endothelium of the anterior chamber angle of the eye. In The Structure of the Eye (ed. G. Smelser), Academic Press, New York, pp. 311-333.
- Vuento, M. and Vaheri, A. (1979). Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. *Biochem. J.* 183, 331-337.
- Waldmann, G., Henzgen, S. and Thoss, K. (1978). Lectin induced experimental arthritis in rabbits. *Exp. Pathol.* 16, 194-201.
- Waldmann, G., Thoss, K., Raabe, G. and Müller, P. (1975). Experimentelle Arthritis durch intraartikuläre Lektininjektion (Lektin-Arthritis). 26. Tagung der Gesellschaft für Pathologie der CSSR, Bratislava.
- Walker, P.S., Unsworth, A., Dowson, D., Sikorski, J. and Wright, V. (1970). Mode of aggregation of hyaluronic acid protein complex on the surface of articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 29, 591-602.
- Weiss, C., Balazs, E.A., St. Onge, R. and Denlinger, J.L. (1981). Clinical studies of the intraarticular injection of HealonR (sodium hyaluronate) in the treatment of osteoarthritis of human knees. In *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 11, (Talbot, J.H., ed.) Grune and Stratton, NY, Pp. 143-144.
- Weiss, C., Rosenberg, L. and Helfet, A. (1968). An ultra-structural study of normal young adult human articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg.* 50A, 663-674.

Weiss, R.E. and Reddi, A.H. (1980). Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 2074-2078.

Weissmann, B., Meyer, K., Sampson, P. and Linker, A. (1954). isolation of oligosaccharidies enzymatically produced from hyaluronic acid. J. Biol. Chem. 208, 417-429.

Weissmann, B., Rapport, M.M., Linker, A., and Meyer, K., (1953). Isolation of the aldobionic acid of umbilical cord hyaluronic acid, J. Biol. Chem. 205, 205-211.

Widder, W. (1962). Tierversuche über die Verweildauer verschiedener Glaskörperimplantate. Graefes Arch. fur Ophth. 164, 550-560.

Wiebkin, O.W., Hardingham, T.E. and Muir, H. (1975). The interaction of proteoglycans and hyaluronic acid and the effect of hyaluronic acid on proteoglycan synthesis by chondrocytes of adult cartilage. in Dynamics of Connective Tissue Macromolecules. (eds. P.M.C. Burleigh and A.R. Poole), North Holland, pp. 82-104.

Wiebkin, O.W. and Muir H. (1973) Inhibition of sulfate incorporation in isolated adult chondrocytes by hyaluronic acid. FEBS Letters 37, 42-46.

Wiebkin, O.W. and Muir H. (1977) Synthesis of proteoglycans by suspension and monolayer cultures of adult chondrocytes and denovo cartilage nodules. The effect of hyaluronic acid. J. Cell Sci. 27, 199-211

Wigren, A. (1975). Experimental studies in immobilized knee joints with reference to intra-articular fracture healing to the effect of hyaluronic acid. Upsala. J. Med., 231, 5-17.

Wigren, A. and Wik. O. (1974). The influence of hyaluronic acid on immobilized knees: An experimental study on adult rabbits. Upsala. J. Med. Sci., (Suppl) 16, 1-27.

Wigren, A. Wik, O. and Falk, J. (1975). Repeated intraarticular plantation of hyaluronic acid. Upsala J. Med. Sci. (Suppl 17), 3-20.

Wigren, A., Wik, O. and Falk, J. (1976). Intra-articular injection of high-molecular hyaluronic acid. An experimental study on normal adult rabbit knee joints. Acta Orthop., Scand., 47, 480-485.

Wolf, J. (1968). Inner surface of regions in the anterior chamber taking part in the regulation of the intraocular tension, including the demonstration of the covering viscous substance. Documenta Ophth, 25, 113-247.

Wood, G.C., Pryce-Jones, R.H., White, D.D. and Nuki, G. (1971). Chondromucoprotein degrading neutral protease activity in rheumatoid synovial fluid. Ann. Rheum. Dis. 30, 73-77.

Yamada, K.M. and Kennedy, D.W. (1979). Fibroblast cellular and plasma fibronectins are similar but not identical. J. Cell Biol. 80, 492-498.

Yamada, K.M., Kennedy, D.W., Kimata, K. and Pratt, R.M. (1980). Characterization of fibronectin interactions with glycosaminoglycans and identification of active proteolytic fragments. J. Biol. Chem. 225, 6055-6063.

Yue, B.Y.J.T., Baum, J.L. and Silbert, J.E. (1976). The synthesis of glycosaminoglycans by cultures of rabbit corneal endothelial and stromal cells. Biochem. J. 158, 567-573.

Yue, B.Y.J.T., Baum, J.L. and Silbert, J.E. (1978). Synthesis of glycosaminoglycans by cultures of normal human corneal endothelial and stromal cells. Invest. Ophth. Vis. Sci., 17, 523-7.

Yuki, H. and Fishman, W.H. (1963). Purification and characterization of leech hyaluronic acid endo- β -glucuronidase. J. Biol. Chem 238, 1877-1879.

