



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I

2001

ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT »



THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

Le 8 Juin 2001

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I

Discipline : Génie Biologique et Médical

présentée et soutenue publiquement

par

M. Bernard PELLAUMAIL

*Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
d'Acoustique Physique*

TITRE :

**CARACTERISATION ULTRASONORE (50 MHz)
DU CARTILAGE ROTULIEN DE RAT :
INFLUENCE DES CONSTITUANTS MATRICIELS
SUR LA PROPAGATION DE L'ONDE ULTRASONORE**

MEMBRES DU JURY

Juges

M.	Patrick NETTER	Professeur
Mme	Geneviève BERGER	Professeur
M.	Pierre GILLET	Professeur
Mme	Amena SAIED	Docteur

Rapporteurs

M.	Gérard GIMENEZ	Professeur
M.	Thomas BARDIN	Professeur

A mes parents

A mes frère et sœurs

A ma famille

A mes filleuls

A mes amis

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit de la collaboration entre le Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Articulaires UMR 7561 CNRS – Nancy I et le Laboratoire d’Imagerie Paramétrique UMR 7623 CNRS-Paris 6 dans le cadre du GDR CNRS 2237 « Imagerie et caractérisation tissulaires appliquées au domaine ostéoarticulaire » dirigé par André BRIGUET.

Je tiens tout d’abord à remercier les directeurs de ces deux unités, mes deux directeurs de thèse, les professeurs Geneviève BERGER et Patrick NETTER qui m’ont accueilli au sein de leurs Unités respectives, d’avoir mis à ma disposition tous mes moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse et d’en avoir assuré la direction.

Je remercie en particulier Amena SAÏED qui a suivi ce travail avec grand intérêt pour sa disponibilité et sa patience à toute épreuve à mon égard. Elle a su m’encadrer dans ce travail avec une grande compétence, une grande rigueur et un soutien permanent qui m’a permis de mener à bien ce travail.

Je remercie également Pascal LAUGIER pour sa disponibilité et ses avis judicieux tout particulièrement lors de la rédaction de cette thèse à un moment où il prenait ses nouvelles fonctions de directeur d’Unité du Laboratoire d’Imagerie Paramétrique UMR 7623.

Je tiens à remercier Messieurs Pierre GILLET et Damien LOEUILLE pour leurs connaissances dans le domaine du cartilage articulaire dans tous ses aspects divers et variés et pour leur aide dans l’interprétation des résultats.

Je remercie les professeurs Gérard GIMENEZ et Thomas BARDIN d’avoir accepté d’être rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier les personnes du Laboratoire de Nancy qui ont collaboré directement à ce travail de thèse tout particulièrement Astrid WATRIN pour l’étude biochimique et pour la partie expérimentale des différentes études présentées et Stéphanie ETIENNE pour l’étude histologique.

Je tiens à associer tous les membres du Laboratoire d’Imagerie Paramétrique que j’ai pu apprécier pendant ses longues années dont notamment :

- les étudiants avec qui j’ai été amené à travailler : Emmanuel CHERIN, Vincent DEWAILLY, Emmanuel BOSSY et Britta JAFFRE

- les autres thésards, anciens et nouveaux : Pascal GIAT, Pascal DROUIN, Valéry ROBERJOT, Emmanuel LAPLACE, Abdelazziz AMICHI, Amar AMARARENE, Christine CHAPPARD, Sana CHAFFAÏ, Estelle CAMUS, Edgar OUEDRAOGO, Céline FOURNIER, Arnaud PETETIN, Christophe JOLLY.

- mais aussi Michèle BOUDINET, Lori BRIDAL, Françoise LEFEBVRE, Frédéric PADILLA, Marylinn TALMANT, Delphine LE GUILLOU, Marcel GINDRE, Jean-Yves LE HOUEROU, Wladimir URBACH, Colette MATHERN et Martha GROSELLIER, Kendall WATERS, Wagner COEHLO.

Un grand merci à Lionel PIHERY qui a toujours su régler les nombreux problèmes informatiques que j’ai rencontré au cours de ces années.

Enfin, mes derniers remerciements vont tout spécialement à mes parents ainsi qu’à mes frères et sœurs, ma famille et tous mes amis qui ont su m’encourager tout le long de ce travail et tout particulièrement dans les moments difficiles.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**8**

- A. Articles publiés dans des revues internationales 8
- B. Abstracts publiés dans des revues internationales 8
- C. Communications non publiées 8

INTRODUCTION 9**CHAPITRE I : STRUCTURE ET TECHNIQUES D'EXPLORATION****DU CARTILAGE ARTICULAIRE 11****INTRODUCTION 12**

- A. **BIOLOGIE DU CARTILAGE 12**
 - 1. Rôle du cartilage articulaire 12
 - 2. Composition du cartilage articulaire 12
 - 3. Organisation du cartilage articulaire 18
- B. **MATURATION DU CARTILAGE 20**
- C. **PRINCIPALES PATHOLOGIES DU CARTILAGE CHEZ L'HOMME 21**
 - 1. L'arthrose 22
 - 2. Polyarthrite rhumatoïde 22
- D. **TECHNIQUES D'IMAGERIE DU CARTILAGE 23**
 - 1. La radiographie 24
 - 2. Le scanner 25
 - 3. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire 25
 - 4. L'échographie conventionnelle basse fréquence 28
 - 5. L'arthroscopie et la chondroscopie 28
 - 6. Autres techniques d'imagerie 30
- E. **MESURES DE PARAMETRES ACOUSTIQUES DU CARTILAGE ET ECHOGRAPHIE DE HAUTE-RESOLUTION 31**
 - 1. Caractérisation du cartilage 31
 - 2. Travaux effectués au Laboratoire d'Imagerie Paramétrique 34

CONCLUSION 36

CHAPITRE II : MÉTHODES QUANTITATIVES**DE CARACTÉRISATION TISSULAIRE 38****INTRODUCTION 39****A. MATERIEL D'ACQUISITION 39**

1. Banc d'acquisition 39
2. Transducteur 40
3. Résolution du système échographique 41

B. ETUDE DES PARAMETRES ACOUSTIQUES 42

1. Estimation de la réflexion et de la rétrodiffusion 42
2. Estimation de l'atténuation et de la célérité des ultrasons 47
3. Estimation de l'épaisseur du cartilage 50

CONCLUSION 51**CHAPITRE III : ETUDE DE L'INTERACTION****ULTRASONS/CARTILAGE DANS LE CADRE DE LA MATURATION 52****INTRODUCTION 53****A. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET MÉTHODES 53**

1. Animaux 53
2. Etude ultrasonore 53
3. Etudes histologique et biochimique 55
4. Tests statistiques 56

B. RÉSULTATS ACOUSTIQUES 56

1. Images échographiques 57
2. Résultats quantitatifs 58
3. Résultats histologiques et biochimiques 62

C. DISCUSSION 67**CONCLUSION 69**

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE

DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES DU CARTILAGE	70
INTRODUCTION	71
A. DEGRADATION DES PROTEOGLYCANES PAR LA HYALURONIDASE TESTICULAIRE OVINE	71
1. Protocole expérimental	71
2. Résultats	72
3. Discussion	83
B. DEGRADATION DES PROTEOGLYCANES ET DU COLLAGENE PAR LA PAPAINE	85
1. Protocole expérimental	85
2. Résultats	86
3. Discussion	90
CONCLUSION	90

CHAPITRE V : CARACTERISATION PAR LA CELERITE ET

L'ATTENUATION DES STADES MATURES ET IMMATURES	91
INTRODUCTION	92
A. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET MÉTHODES	92
1. Préparation des échantillons	92
2. Etude acoustique	93
3. Etudes histologique et biochimique	96
4. Statistiques	97
B. RESULTATS	97
1. Images paramétriques	97
2. Profils des paramètres en fonction de la profondeur	100
3. Estimation des moyennes des paramètres à partir des profils	102
C. DISCUSSION	105
CONCLUSION	109

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

110

BIBLIOGRAPHIE

113



PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS



Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

A. Articles publiés dans des revues internationales

- Chérin E., Saïed A., Pellaumail B., Loeuille D., Laugier P., Gillet P., Netter P., Berger G., Assessment of rat articular cartilage maturation using 50-MHz quantitative ultrasonography, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001; 9, 2. pp. 178-186
- Pellaumail B., Loeuille D., Watrin A., Netter P., Berger G. and Saïed A., Correlation of high frequency ultrasound backscatter with cartilage matrix constituents, 1998 IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings, vol. 2, pp. 1463-1466
- Pellaumail B., Dewailly V., Watrin A., Loeuille D., Netter P., Berger G. and Saïed A., Attenuation coefficient and speed of sound in immature and mature rat cartilage: a study in the 30 - 70 MHz frequency range, 1999 IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings, vol. 2, pp. 1361-1364
- Saïed A., Bossy E., Watrin A., Pellaumail B., Loeuille D., Laugier P., Netter P. and Berger G., Quantitative Assessment of Arthritic Cartilage using High-Frequency Ultrasound, 2000 IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings (sous presse)

B. Abstracts publiés dans des revues internationales

- Chérin E., Saïed A., Pellaumail B., Loeuille D., Laugier P., Netter P. and Berger G., High frequency echography quantitative analysis of patellar rat cartilage development. *Arthritis and Rheumatism*, 1997, 40, 9, S233
- Saïed A., Chérin E., Pellaumail B., Loeuille D., Netter P., Berger G., Assessment of articular cartilage development with high resolution echography. *European Journal of Ultrasound*, 1998, 7, 1, S35
- Pellaumail B., Guingamp N., Loeuille D., Netter P., Berger G., Saïed A., High Frequency echography (50MHz) of rat patellar cartilage maturation: correlation with histological and biochemical data. *Arthritis and Rheumatism*, 1998, 41, 9, S146

C. Communications non publiées

- Pellaumail B., Saïed A., Berger G., Caractérisation par ultrasons à 50 MHz du cartilage articulaire. Sixièmes Journées d'Acoustique Physique Sous-Marine et Ultrasonore, Blois 5-6 mai 1999.

INTRODUCTION



L'arthrose est une des pathologies de l'articulation la plus répandue chez l'homme. En 1997, on estimait que la proportion de personnes de plus de 70 ans qui souffrent d'arthrose du genou est près de 40 % et que près de 80 % des personnes souffrant d'arthrose ont une mobilité réduite et 25 % ne peuvent accomplir les tâches essentielles de la vie quotidienne.

La caractéristique principale de l'arthrose est la dégénérescence du cartilage. Les moyens actuels d'imagerie utilisés en clinique (rayons X, scanner, tomographie, IRM et échographie conventionnelle) ne permettent pas de dépister cette pathologie avant l'apparition des douleurs ou l'irréversibilité du processus. Lorsque les méthodes conventionnelles sont insuffisantes, le rhumatologue peut utiliser la chondroscopie ou l'arthroscopie, moyens invasifs qui ne fournissent qu'une information qualitative sur le cartilage (palpation et observation de l'état surface).

L'échographie de haute fréquence (50 MHz) possède les atouts nécessaires non seulement pour permettre ce dépistage précoce, mais également pour fournir une information quantitative et objective sur l'altération du cartilage grâce à une sensibilité aux propriétés biomécaniques et structurales du tissu cartilagineux et une résolution élevée due à la gamme de fréquence choisie. Le Laboratoire d'Imagerie Paramétrique a montré depuis quelques années la capacité de l'échographie de haute fréquence de détecter les changements intervenant dans le signal échographique lors de l'étude de modèles d'arthropathie chez le rat. L'échographie de haute fréquence permet de détecter les lésions chondrales précoces et locales induites par l'arthropathie. De plus, l'estimation de paramètres acoustiques (coefficients de réflexion et de rétrodiffusion) a permis de caractériser les modifications de l'état de surface et de la matrice interne du cartilage.

Compte tenu du potentiel des méthodes de caractérisation et d'imagerie ultrasonore de haute fréquence, il est important de comprendre l'origine des modifications du signal induites par la pathologie. C'est pourquoi, le but de la présente thèse est d'étudier l'interaction entre l'onde ultrasonore et le cartilage et de déterminer l'influence des constituants biochimiques sur la propagation des ultrasons. Les études sont réalisées chez le rat à la fréquence d'exploration de 50 MHz. Nous avons pour cela étudié le cartilage à différentes étapes de sa maturation et au cours de processus de dégradation enzymatique. Les données ultrasonores sont confrontées aux résultats histologiques et biochimiques. Les travaux d'exploration ultrasonore et de

traitement de signal se sont déroulés à Paris au Laboratoire d'Imagerie Paramétrique UMR 7623 CNRS-Paris VI et les travaux préparatoires (modèles de dégradation) et les études biochimiques et histologiques ont été réalisées à Nancy au Laboratoire de Physiopathologie et de Pharmacologie articulaires UMR 7561 CNRS-Nancy I.

Le premier chapitre est une revue générale de la structure du cartilage, des moyens d'investigation des techniques d'imagerie et des études réalisées antérieurement au Laboratoire d'Imagerie Paramétrique.

Dans le deuxième chapitre sont présentées les méthodes d'estimation des paramètres acoustiques utilisés dans les différents travaux d'études dans cette thèse.

Dans le troisième chapitre nous étudions la maturation en tant que processus naturel, reproductible et bien connu de modifications du tissu cartilagineux. Cette première étude a pour objet de déterminer les constituants biochimiques susceptibles d'influencer la propagation de l'onde ultrasonore dans le cartilage. Dans cette étude, le faisceau est perpendiculaire à la surface articulaire et la caractérisation tissulaire se résume à l'évaluation de la rétrodiffusion de la matrice interne et de la réflexion à la surface.

Afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses formulées en conclusion de l'étude sur la maturation, nous étudions dans le quatrième chapitre la dégradation sélective des constituants matriciels du cartilage.

Dans le dernier chapitre, l'estimation de l'atténuation et de la célérité des ultrasons permet d'approfondir la compréhension de l'interaction entre l'onde ultrasonore et le cartilage et de préciser le rôle des constituants biochimiques dans la propagation des ultrasons. Afin de mesurer correctement les paramètres acoustiques, des sections de rotule ont été explorées avec un faisceau ultrasonore perpendiculairement au plan sagittal de la rotule.

L'ensemble des travaux s'est effectué dans le cadre du GDR 1210 "Cartilage-Os-tendon: méthodes innovantes d'imagerie et de caractérisation" (1996-99) et du GDR 2237 "Imagerie et caractérisation tissulaire appliquées au domaine ostéoarticulaire" (directeur André Briguet) (à partir de 01/2000).

CHAPITRE I : STRUCTURE ET TECHNIQUES D'EXPLORATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE

INTRODUCTION

Dans ce chapitre, est exposé en premier lieu la composition et l'organisation du cartilage articulaire. Suit une description des modifications du tissu engendrées par la maturation et par les pathologies articulaires comme l'arthrose et l'arthrite rhumatoïdale. Nous verrons ensuite les différentes techniques d'imagerie médicale utilisées pour l'exploration du cartilage articulaire et l'évaluation des pathologies du cartilage. Dans cette partie, les techniques utilisées en routine clinique sont distinguées autant que possible des techniques développées et employées en recherche. En fin de chapitre sont présentées les différentes études portant sur l'exploration ultrasonore à hautes fréquences et la caractérisation du cartilage. Cette dernière partie permettra de faire le bilan des travaux effectués au sein du laboratoire d'Imagerie Paramétrique.

A. BIOLOGIE DU CARTILAGE

1. Rôle du cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif très spécialisé, extrêmement rigide mais légèrement élastique. Il joue un rôle d'amortisseur des pressions exercées par une partie de l'articulation sur une autre. Il est un joint élastique qui répartit les contraintes et assure les contacts et les frottements entre les pièces osseuses de l'articulation. Sa surface lisse et lubrifiée par le liquide synovial atténue les frictions dues au jeu de la jointure [Simon, 1977].

2. Composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire, dont la teneur en eau est de l'ordre de 75 % [Altman, 1987], est constitué d'un petit nombre de cellules cartilagineuses, les chondrocytes et d'une matrice extracellulaire abondante.

Les chondrocytes, seul contingent cellulaire du cartilage, assurent la synthèse (anabolisme) des constituants de la matrice extracellulaire, enchevêtrement complexe de macromolécules extracellulaires interdépendantes. La matrice extracellulaire, qui permet le rôle d'amortissement du cartilage, contient principalement deux macromolécules, le collagène et le protéoglycane (PG).

a. Les chondrocytes

Les chondrocytes occupent entre 0,4 et 2 % du volume du cartilage [Stockwell, 1979], représentent de 1 à 10 % de la masse du cartilage [Simon, 1977]. Ils ont une densité de l'ordre de 14500 par mm^3 . Leur principale fonction est la synthèse des procollagènes, des protéoglycanes et de protéines non collagéniques. Etant le seul contingent cellulaire du cartilage, les chondrocytes produisent des enzymes et des inhibiteurs susceptibles de dégrader la matrice extracellulaire.

Il existe plusieurs types de chondrocytes. Mazières [Mazieres, 1985] en distingue quatre principaux répartis dans les différentes couches du cartilage.

- les cellules actives : (10 % des chondrocytes). Elles assurent la synthèse des PG et du collagène. Elles sont réparties principalement dans le cartilage non calcifié et tout particulièrement dans la couche radiale.
- les cellules de surcharge ou de réserve : (80 % des chondrocytes). Elles sont inactives et surchargées en glycogène. Elles peuvent évoluer soit vers la nécrose soit le plus souvent vers une forme active. Elles sont absentes de la couche superficielle.
- les cellules dégénérées : (10 % des chondrocytes). Elles se situent surtout en surface et en profondeur.
- les cellules nécrosées : cellules plus ou moins réduites à des débris cellulaires.

La densité cellulaire varie en fonction de la profondeur. Ce phénomène est peut-être lié à des facteurs nutritionnels. En effet, comme le cartilage articulaire n'est pas vascularisé, le glucose et l'oxygène sont apportés de la surface à la profondeur par diffusion de ces éléments dans la matrice. Ces apports sont plus efficaces près de la surface, en contact de la synoviale et près de l'os sous-chondral en raison de la perméabilité du cartilage calcifié [Vignon, 1987] que dans la couche intermédiaire.

b. Le collagène

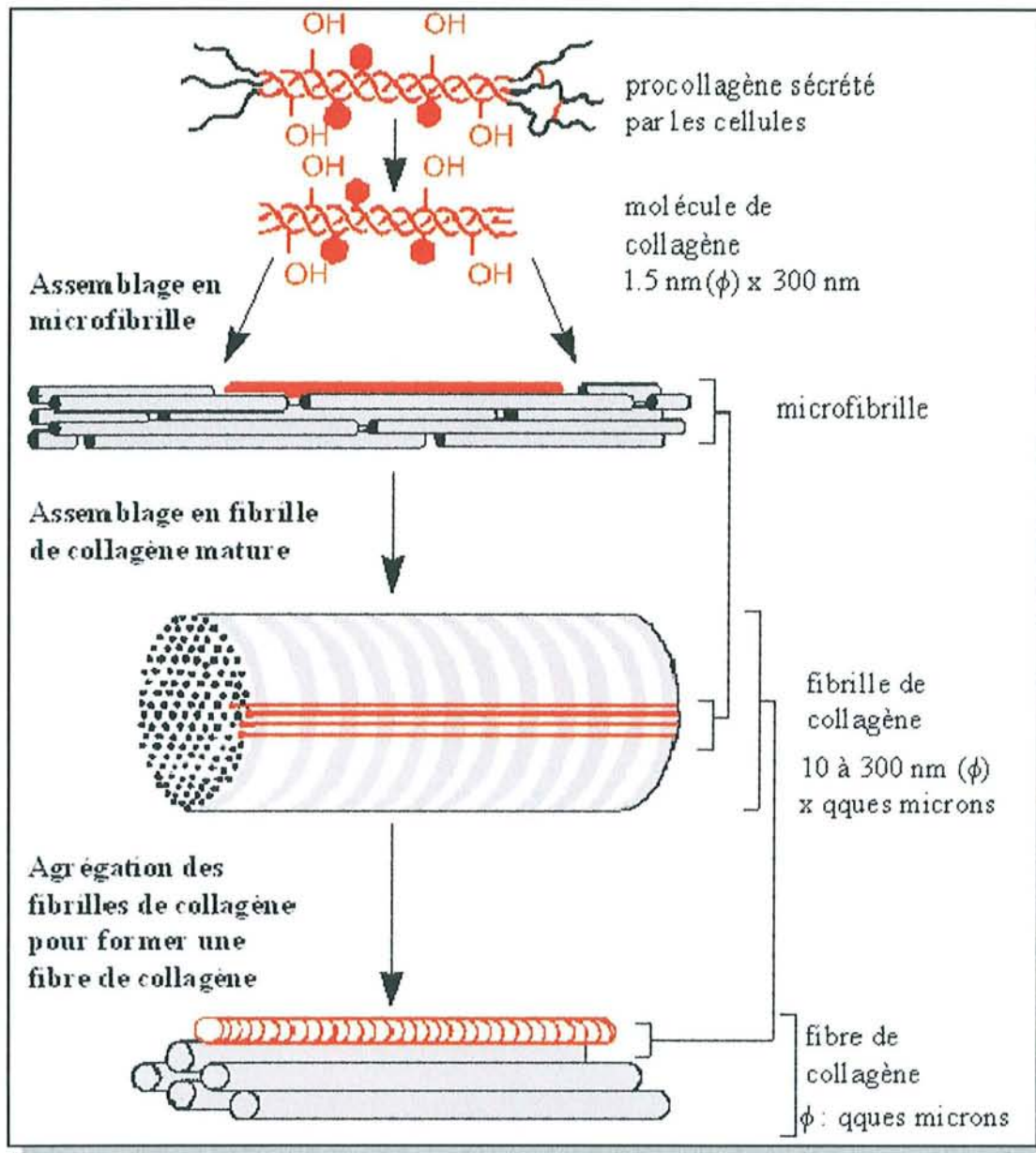


Figure 1 : Représentation schématique des divers événements extracellulaires impliqués dans la formation d'une fibre de collagène.

Le collagène est une protéine fibreuse dont la principale caractéristique est sa structure rigide hélicoïdale à trois brins et représente entre 48 % et 62 % du poids sec du cartilage [Mcdevitt, 1973; Simon, 1977; Mankin, 1992]. Trois chaînes polypeptidiques de collagène appelées chaînes α sont enroulées les unes autour des autres en une hélice régulière. Sept formes différentes de chaînes α dont la combinaison détermine le type de collagène sont connues. Les différentes combinaisons de chaînes α permettent théoriquement d'assembler une centaine de types de collagène. Seuls dix-sept types ont été décrits. Le type principal du cartilage est le

type II (90 % du collagène) [Miller, 1969]. Chez l'adulte, les autres collagènes dits spécifiques du cartilage rencontrés sont les types IX, X et XI [Mayne, 1989]. On peut cependant trouver d'autres types dits non spécifiques comme les types I, V, VI et VIII dans le tissu cartilagineux [Petit, 1989]. Dans la matrice cartilagineuse, les collagènes de types II, IX et XI sont associés de façon particulière [Chevrier, 1993]. Les molécules de collagène de type II s'assemblent principalement en polymères ordonnés appelés fibrilles de collagène, qui se présentent sous la forme de structures câblées longues de plusieurs microns et larges de 10 à 300 nm de diamètre. Il se forme entre les molécules de collagène des ponts covalents transversaux appelés *cross-link* qui procurent à la fibrille une résistance importante. Les fibrilles de collagène sont souvent groupées en faisceaux plus importants, les fibres de collagène qui mesurent plusieurs microns de diamètre (Figure 1). Ces dernières sont renforcées par du collagène de type XI au centre des faisceaux. A la périphérie des fibres se trouve le collagène de type IX qui détermine le diamètre des faisceaux. De plus, la liaison entre le réseau des protéoglycanes et la trame de collagène se fait par l'intermédiaire du collagène IX et de glycoprotéines. Les fibres s'organisent en réseau tridimensionnel dans le cartilage pour former la charpente du tissu cartilagineux. Leur structure confère au tissu une résistance aux forces d'étirement. Le réseau collagénique se présente sous la forme d'arcades appelées arcades de Benninghoff. Ces structures sont ancrées dans l'os sous-chondral perpendiculairement à l'interface os/cartilage. Elles se courbent au fur et à mesure qu'elles se rapprochent de la surface pour finir parallèles à celle-ci (Figure 2).

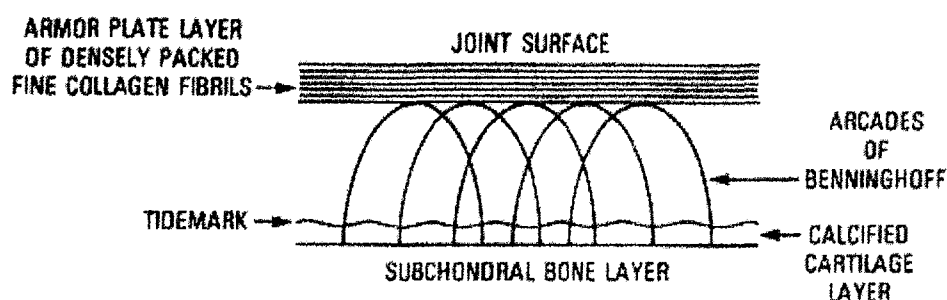


Figure 2 : Représentation schématique du réseau collagénique au sein du cartilage

c. Les protéoglycanes

Le protéoglycane est une macromolécule constituée d'une protéine porteuse appelée *core protein* liée de façon covalente à au moins une chaîne de glycosaminoglycanes (GAG) (Figure 3). Les protéoglycanes représentent entre 10 % et 23 % du poids sec du cartilage

[Mcdevitt, 1973; Mankin, 1992]. On distingue sept types de GAG : le hyaluronane ou acide hyaluronique, les chondroïtines 4 et 6-sulfate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate, l'héparine et le kératane sulfate. La diversité structurale des PG permet la constitution de sites protéiques interagissant spécifiquement avec d'autres composants matriciels ou cellulaires. Cette très grande capacité interactive permet aux PG de participer à l'assemblage de la matrice tout en lui conférant de nombreuses capacités rhéologiques, comme l'hydratation ou la résistance aux forces compressives. En fait, grâce aux GAG, les PG peuvent accumuler jusqu'à 50 fois leur poids en eau, cette hydratation étant limitée par le volume du réseau collagénique. Cette propriété hydro-attractive leur permet de résister aux forces de compression. Dans le cartilage articulaire, les PG les plus abondants sont des PG formant des agrégats. Il s'agit du versicane et surtout de l'agrécane. Ce dernier a la particularité de lier un grand nombre de chaînes de chondroïtine sulfate ($n=100$) et de kératane sulfate ($n=50$) qui représente 90 % du poids de la molécule. L'agrécane constitue une pression osmotique importante qui maintient un taux d'hydratation important dans le cartilage.

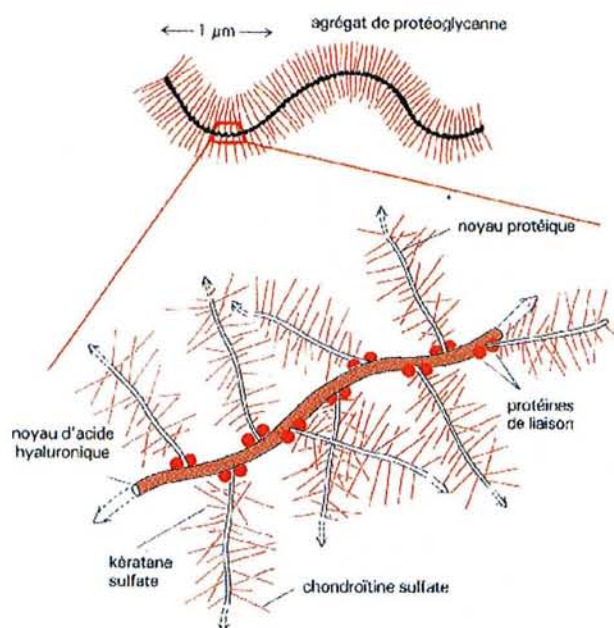


Figure 3 : Représentation schématique d'un agrégat de protéoglycane

A côté des agrégats importants, des petits protéoglycanes sont formés d'un faible nombre de chaînes, comme la décorine (1 chaîne), le biglycane (2 chaînes) et la fibromoduline. Ils ont la particularité d'être riche en leucine. Du fait de leur organisation poreuse et hydratée, les GAG permettent la diffusion rapide des molécules hydrosolubles et le déplacement des cellules.

Bien qu'ils remplissent l'espace extracellulaire, les GAG ne représentent que 10 % de la quantité des protéines fibreuses comme le collagène. L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane qui ne se fixe pas sur une protéine porteuse à la différence des autres GAG. L'augmentation locale de la production d'acide hyaluronique attire l'eau et provoque un oedème de la matrice.

d. Autres constituants

En dehors du collagène et des protéoglycanes, le cartilage renferme un certain nombre de protéines appelées glycoprotéines qui ne sont ni collagéniques ni protéoglycaniques. Les fonctions de ces différentes molécules ne sont pas toutes déterminées. Certaines jouent le rôle de liens entre les différents constituants de la matrice ou entre les chondrocytes et la matrice. D'autres servent de stimulant de synthèse d'ADN par les cellules.

L'eau (75 % du cartilage) intervient à plusieurs niveaux. Comme le cartilage est un tissu avasculaire, elle sert de milieu de propagation pour les nutriments qui diffusent au sein de la matrice jusqu'aux chondrocytes. Grâce aux constituants très hydrophiles de la matrice, elle participe à la fonction d'amortissement et de répartition des forces de compression auxquelles est soumis le cartilage. Elle joue un rôle dans le processus de dilatation de la matrice qui permet aux cellules de migrer lors de la croissance.

3. Organisation du cartilage articulaire

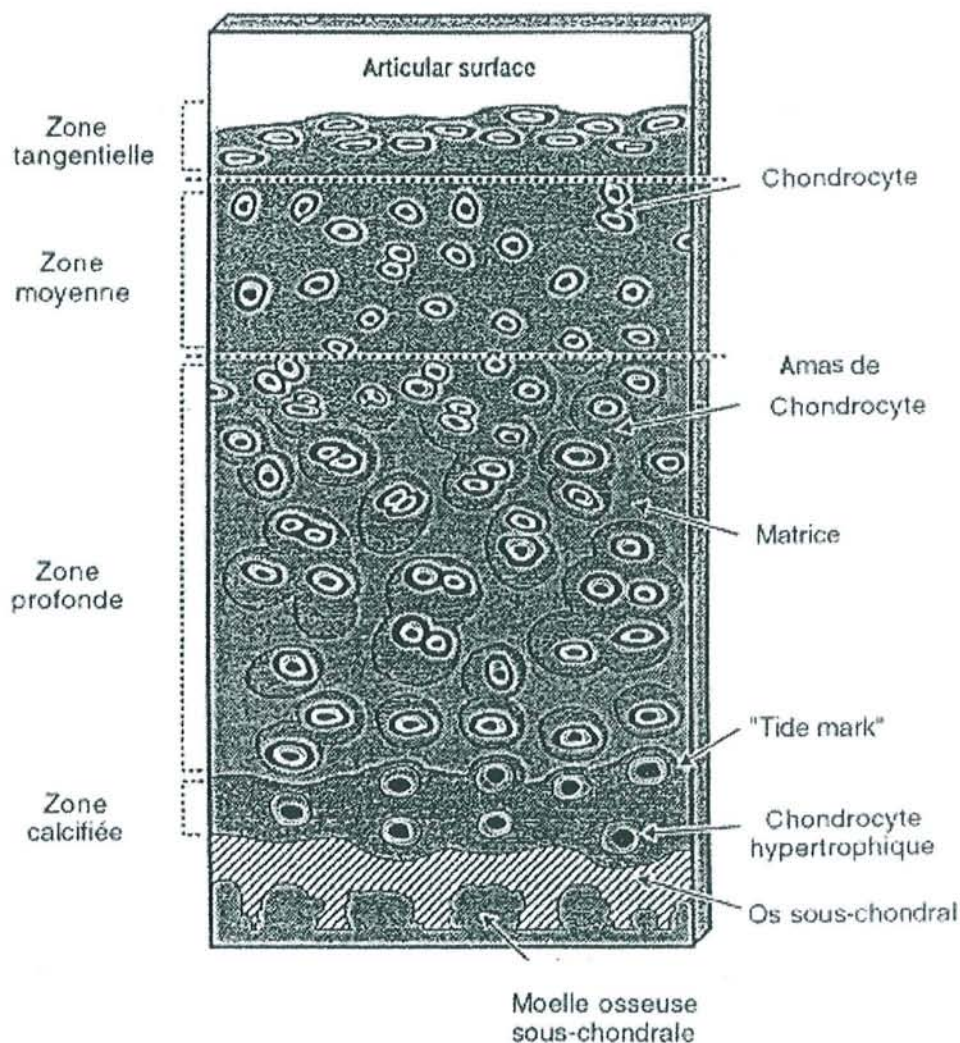


Figure 4 : Organisation générale du cartilage (d'après Poole)

Le cartilage présente globalement une organisation en couche selon l'axe de profondeur défini de la surface articulaire à l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral. Elle est le reflet des forces de tension, de compression et de cisaillement auxquelles est soumis le cartilage.

Depuis 1949, il est usuel de distinguer quatre couches selon l'axe de profondeur en fonction de la morphologie des cellules, de la concentration de la matrice en PG et en collagène et de l'orientation des fibres de collagène [Hunziker, 1982] (Figure 4). Les épaisseurs des différentes couches du cartilage indiquées en pourcentage ont été estimées pour le cartilage

des condyles fémoraux chez l'Homme. En général, l'épaisseur du cartilage, l'organisation de celui-ci et les épaisseurs des différentes couches définies dépendent de plusieurs facteurs :

- l'âge
- l'espèce
- la nature et la localisation de l'articulation
- la topographie intra-articulaire

- La couche superficielle ou tangentielle : Elle représente 2 à 3 % de l'épaisseur du cartilage. Les cellules, de petites tailles (10 à 20 microns de diamètre) présentent une forme ellipsoïdale dont le grand axe est parallèle à la surface. Elles sont deux à trois fois plus nombreuses que dans les autres couches et apparaissent isolées. Les fibres de collagène sont fines et parallèles à la surface articulaire. Le taux de collagène est plus élevé et celui des PG est plus faible que dans les autres couches. Comme la somme des concentrations de chacun des deux constituants reste constante sur toute l'épaisseur du cartilage, les taux de collagène et de PG évoluent en sens opposé selon la profondeur. En fait, pendant que la concentration en collagène diminue, celle des PG augmente en fonction de la profondeur [Muir, 1970; Venn, 1978]. Cette couche possède la plus faible concentration en agrécane, protéoglycane principale et le plus fort contenu en décorine, petit protéoglycane par rapport aux autres couches. Le contenu en eau est de 80 %.

- La couche transitionnelle ou aléatoire : Elle occupe 5 % de l'épaisseur. Les chondrocytes sont plus gros et de forme plus arrondie que dans la couche superficielle. L'orientation des fibres de collagène est dite aléatoire non dans le sens que chaque fibre peut prendre n'importe quelle direction, mais dans le sens que le nombre de fibres en fonction de l'orientation est constant. En fait, les fibres de collagène forment les arcades de Benninghoff. Le contenu en eau se situe entre 70 % et 80 %.

- La couche profonde ou radiale : Elle représente la majeure partie du cartilage puisqu'elle en constitue 92 %. Le mot désigne l'orientation des fibres de collagène qui est perpendiculaire à la surface. Elles sont par ailleurs plus épaisses que dans les autres couches. Les chondrocytes sont plus volumineux et groupés en amas de 2 à 6 cellules perpendiculaires à la surface avec une densité plus faible. Le contenu en eau est de l'ordre de 70 %.

Ces trois premières couches constituent la partie du cartilage articulaire appelée cartilage hyalin.

- La couche calcifiée : Occupant environ 2 % du volume matriciel du cartilage, elle correspond au cartilage minéralisé et fait le lien entre le cartilage et l'os sous-chondral. Il contient le front de minéralisation et constitue la zone d'ancrage du cartilage dans l'os parce qu'elle possède des propriétés mécaniques intermédiaires entre celles de l'os et celles du cartilage. Cette couche résulte d'un mécanisme semblable à celui qui intervient dans le cartilage de croissance lors de l'ossification endochondrale. A la différence du cartilage de croissance qui est résorbé et remplacé par l'os mature, la zone tampon entre l'os et le cartilage calcifié est conservée pour le cartilage articulaire. Les chondrocytes sont hypertrophiques et synthétisent un collagène particulier, le collagène de type X. La jonction entre les zones calcifiée et non calcifiée est appelée *tidemark* qui est bien visible en histologie.

B. MATURATION DU CARTILAGE

Au cours de la maturation, le cartilage articulaire est le siège d'importantes modifications tant dans la composition (en eau, protéoglycanes et collagène) que dans la structure (des protéoglycanes et du réseau collagénique) ou dans la réponse biologique des chondrocytes aux stimuli biomécaniques.

La majorité des travaux sur la maturation a été menée sur le cartilage de lapin. La plus complète des études chez le lapin est celle de Bland et Ashhurst [Bland, 1996] qui traite de l'évolution du cartilage du genou de lapin du 17^{ème} jour intra-utérin jusqu'à l'âge de deux ans. Dans cette étude, lors de la première semaine, le cartilage croît de façon considérable. Les cellules de la couche superficielle s'aplatissent parallèlement à la surface et sont plus proches les unes des autres que dans les autres couches. La surface articulaire contient du collagène de type I et non de type II. Par contre en profondeur, les chondrocytes produisent du collagène de type II et le type I n'y est pas détecté. L'ossification de l'épiphyse, débutée dès la naissance, est terminée six semaines après la naissance. On peut distinguer, à cette période, différentes couches parallèles à la surface dans le cartilage. Dans la couche sous la surface, les cellules sont aplaties parallèlement à la surface. Au-dessous se trouve une couche fine possédant des cellules de forme ronde. Dans une troisième couche, les chondrocytes commencent à former des colonnes perpendiculaires de 4 à 6 cellules. L'épaisseur du cartilage à la sixième semaine est semblable à celle de la première semaine. La distribution des types de collagène change au

cours de la période allant de la première à la sixième semaine. Au début de cette période, la matrice cartilagineuse contient très peu de collagène de type I sauf dans la couche superficielle. Après les six premières semaines, le collagène de type II est présent dans toutes les couches du cartilage, y compris dans la couche superficielle. La tidemark, limite entre les cartilages hyalin et calcifié, est visible pour la première fois entre les 12^{ème} et 14^{ème} semaines. Durant cette même période, la densité cellulaire diminue et la stratification est mieux définie. Deux autres études sur le lapin complètent cette description de la maturation. Dans le travail de Castano Oreja *et al.* [Castano Oreja, 1995] sur l'évolution du cartilage entre les sixième et huitième semaines postnatales, il est rapporté que l'épaisseur du cartilage et la densité cellulaire diminuent en fonction de l'âge. Par ailleurs, la diminution de la densité cellulaire est plus importante en surface qu'en profondeur et les délimitations des différentes couches histologiques se précisent avec l'âge. Zirn *et al.* rapportent qu'après la naissance la taille hydrodynamique des protéoglycanes diminue entre la 12^{ème} et la 22^{ème} semaine chez le lapin [Zirn, 1984].

Chez l'Homme, deux études plus générales sur le cartilage décrivent la maturation. Tout d'abord, Hunziker fait une description des différences entre les stades immature et mature chez l'homme [Hunziker, 1982]. Le stade mature présente un haut degré d'anisotropie avec des couches clairement définies. Le stade immature est caractérisé par un tissu cartilagineux plus épais et moins stratifié avec des cellules distribuées de façon plus aléatoire et plus isotrope. Cependant, les chondrocytes augmentent de taille avec la profondeur. La maturation est réalisée par un processus plutôt d'addition de tissu que de transformation de tissu. C'est cette addition qui permet l'augmentation d'anisotropie du tissu coïncidant avec l'augmentation de l'aptitude biomécanique du cartilage à remplir son rôle d'amortisseur. Cependant, cette aptitude est complètement acquise par un remodelage du tissu. McDevitt a étudié la biochimie du cartilage articulaire [Mcdevitt, 1973]. Il indique que durant la maturation, le contenu en collagène augmente progressivement pendant que les contenus en eau et en protéoglycane diminuent. Par ailleurs, le réseau collagénique s'organise au cours de la maturation. Il observe les mêmes évolutions chez d'autres espèces.

C. PRINCIPALES PATHOLOGIES DU CARTILAGE CHEZ L'HOMME

Les principales pathologies qui entraînent la dégradation du cartilage sont l'arthrose et l'arthrite. L'arthrose est une maladie dégénérative alors que l'arthrite est une maladie inflammatoire.

1. L'arthrose

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Lors de l'arthrose, la partie de l'articulation la plus touchée est le cartilage qui se dégrade au fur et à mesure de l'évolution de la pathologie. Par ailleurs, l'os sous-chondral est remanié et il existe volontiers une hyperplasie, voire une inflammation synoviale non négligeable. On peut distinguer deux catégories de pathologies arthrosiques : les arthroses primitives et secondaires. Les premières, qu'elles soient locales ou généralisées, ne sont pas tributaires d'autres affections. En revanche, les arthroses secondaires sont provoquées par d'autres étiologies, telles que des anomalies du tissu conjonctif, des arthropathies microcristallines, des vices architecturaux (dysplasie) et certaines maladies inflammatoires, métaboliques ou endocriniennes.

Les descriptions classiques du cartilage arthrosique font état de fibrillations en surface du tissu qui correspondent à des fissurations, parfois à des vacuoles et voire jusqu'à des érosions profondes [Hough, 1989b]. A un stade précoce de la maladie, on assiste à une prolifération de chondrocytes, à l'extension des lacunes, cavités dans la matrice extracellulaire où se trouvent les cellules et à la formation de groupements cellulaires appelés « clusters ». En parallèle de leur prolifération, les cellules voient leur activité de synthèse des constituants matriciels augmenter de façon semblable à une tentative de réparation. Suite à un changement de phénotype, les chondrocytes synthétisent plutôt du collagène de type I au lieu de type II et également de type X. Les fibres de collagène de type I sont généralement plus épaisses que celles de type II. Par ailleurs se crée un déséquilibre entre inhibiteurs des métalloprotéases et enzymes des métalloprotéases, en faveur de ces dernières. Ce qui entraîne une dégradation du protéoglycane principal, l'agrécan qui se répand en dehors de la matrice affaiblissant le cartilage. La modification de la composition de la matrice extracellulaire entraîne un changement de l'élasticité et de la résistance aux forces subies par le cartilage. Il en résulte une altération locale du cartilage et une diminution de son épaisseur qui conduit à terme à la dégénérescence totale du cartilage.

2. Polyarthrite rhumatoïde

Comme dans le cas de l'arthrose, la destruction du cartilage hyalin est la conséquence de l'arthrite. D'autres parties de l'articulation sont touchées comme les structures périarticulaires : érosion de l'os sous-chondral, hyperplasie de la membrane synoviale appelée

pannus synovial et altérations capsulo-ligamentaires. Il existe deux sortes de pathologies arthritiques quant à leur mode de fonctionnement : les arthrites aiguës et chroniques. Les premières sont provoquées par une inflammation ponctuelle dans le temps, alors que les deuxièmes sont soumises à des inflammations répétées périodiquement. Il s'avère qu'une arthrite chronique provoque en générale des lésions plus profondes qu'une arthrite aiguë à cause de la répétition de l'affection. Comme dans le cas des pathologies arthrosiques, il existe des arthrites primaires et secondaires définies selon les mêmes critères.

Dans le cas de l'arthrite, il se forme un tissu granuleux, recouvrant le cartilage articulaire, appelé *pannus* et dont l'origine serait due à une inflammation de la synoviale en contact de la surface du cartilage [Hough, 1989a]. Ce tissu provoque la dégradation du tissu cartilagineux. Le cartilage passe d'une phase cellulaire dominée par des nodules de cellules synoviales et proliférantes à une phase de fibrose. Les derniers changements dans l'articulation montrent un tissu conjonctif, dense et fibreux remplaçant le cartilage hyalin et pénétrant dans l'os sous-chondral.

D. TECHNIQUES D'IMAGERIE DU CARTILAGE

La détection des lésions précoces du cartilage induites par différentes pathologies articulaires se révèle un enjeu majeur de santé publique. La difficulté est l'élaboration de cet outil permettant le diagnostic précoce des lésions. Dans les différentes techniques d'imagerie médicale, il est nécessaire de distinguer celles utilisées en clinique et celles utilisées en recherche. En clinique, le recours à la radiographie, voire à l'IRM, permet le plus souvent un diagnostic pressenti d'arthrose, alors que les lésions du cartilage sont déjà constituées. D'autres techniques ou modalités d'acquisition permettent en revanche d'espérer un dépistage plus précoce.

1. La radiographie



Figure 5 : Image de radiographie d'un genou humain. Le tissu cartilagineux est difficile à distinguer des parties osseuses à cause du faible contraste de l'image.

Le principe de la radiographie est de réaliser des images d'atténuation d'un faisceau de rayons X à travers un tissu biologique. La valeur de ce paramètre varie énormément selon les tissus explorés, notamment entre l'os et les tissus mous. La résolution en imagerie conventionnelle est de l'ordre de 100 μm [Martel, 1991]. L'individualisation du tissu cartilagineux étant difficile, l'évaluation du cartilage se fait de façon indirecte en mesurant l'interligne articulaire appelé en anglais *joint space width* (JSW) [Buckland-Wright, 1999; Buckland-Wright, 2000] (Figure 5). Le pincement de cet interligne est le signe radiographique qui traduit une perte cartilagineuse dans des conditions standardisées d'incidence et de positionnement du patient. Une difficulté de cette technique est liée à la faible reproductibilité de la mesure de ce pincement. Un certain nombre de biais peut influencer la mesure, tels que l'orientation du faisceau des rayons X, la portance de la zone de mesure, le fléchissement du genou, la rotation du pied, le facteur de grossissement et les repères radio-anatomiques [Boegard, 1999; Hartford, 2001]. Parallèlement, la délimitation de l'os est rendue difficile par le fait que l'image est la projection du volume de tissu exploré sur un plan. C'est pourquoi la radiographie est une technique qui a besoin d'une procédure très précise sur le positionnement du patient et sur les caractéristiques du système d'acquisition pour avoir des mesures reproductibles [Ravaud, 1997]. La radiographie est la technique d'imagerie médicale la plus classique dans la détection de l'arthrose. Elle se révèle peu onéreuse, non-invasive et d'utilisation simple. Néanmoins, elle fournit une image qui est une projection 2-D d'un volume irradié avec un faible contraste tissulaire malgré une bonne résolution. Par ailleurs, elle ne permet pas l'évaluation directe de l'état du cartilage et soumet les patients à des

rayonnements qui ne sont pas sans danger, bien que les intensités employées soient assez faibles.

2. Le scanner

Cette technique permet d'obtenir des acquisitions de forte résolution en densité et en détail avec un accès à la troisième dimension grâce à l'acquisition de coupes axiales. Le scanner permet de s'affranchir des problèmes cruciaux de positionnement du patient rencontrés dans la radiographie. Pour renforcer la distinction des différents tissus explorés, on injecte dans le tissu étudié un agent de contraste (iode) [Vande Berg, 2000]. Malgré cette injection, l'évaluation directe de l'état du cartilage reste difficile. Une étude a tout de même montré que l'on peut évaluer avec une précision équivalente à celle de l'imagerie à résonance magnétique nucléaire le volume et l'épaisseur du cartilage articulaire [Eckstein, 1998]. Par ailleurs, une autre étude sur l'arthrose a montré que l'arthroscanner permet de classer les lésions selon la nomenclature définie en chondroscopie par Beguin et Locker avec une spécificité de 100 % et une sensibilité variant de 22 à 100 % [Gagliardi, 1994]. L'arthroscanner se révèle donc être une technique invasive permettant une mesure locale de l'atténuation des rayons X et une information 3-D sur l'articulation en s'affranchissant des problèmes de positionnement.

3. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire

Comparativement aux techniques utilisant les rayons X (radiographie et scanner), l'IRM a l'avantage d'individualiser le cartilage précisément de façon non traumatique et dans les trois plans de l'espace. L'imagerie IRM du cartilage repose sur le signal des protons contenu dans le tissu cartilagineux. En séquence pondérée T_1 (spin écho et écho de gradient), le cartilage apparaît globalement homogène de sa surface vers l'os sous-chondral avec une couche hypointense correspondant à la zone calcifiée du cartilage et à l'os sous-chondral (Figure 6). En séquence pondérée T_2 (fast spin écho), le cartilage apparaît en isosignal avec une fine couche superficielle en hyposignal et une couche profonde d'autant plus faible que la pondération T_2 est marquée [Loeuille, 1998] (Figure 7). Dans certaines conditions, on peut apercevoir plusieurs couches au sein du cartilage. Mais leur aspect et leur nombre dépendent des séquences utilisées. Certains phénomènes physiques, comme l'artefact de troncature ou l'effet de l'angle magique, peuvent renforcer l'aspect plurilaminaire du cartilage [Erickson, 1997; Franck, 1997]. Par ailleurs, on remarque que les couches délimitées en IRM ne correspondent pas forcément aux couches définies en histologie. Elles traduisent cependant

des modifications biochimiques et structurales locales du cartilage [Loeuille, 1997]. Les études réalisées avec des séquences pondérées en T_1 et T_2 (en spin écho), montrent une sensibilité faible de l'IRM pour les lésions cartilagineuses débutantes lorsqu'elles sont confrontées aux données arthroscopiques [Recht, 1994].

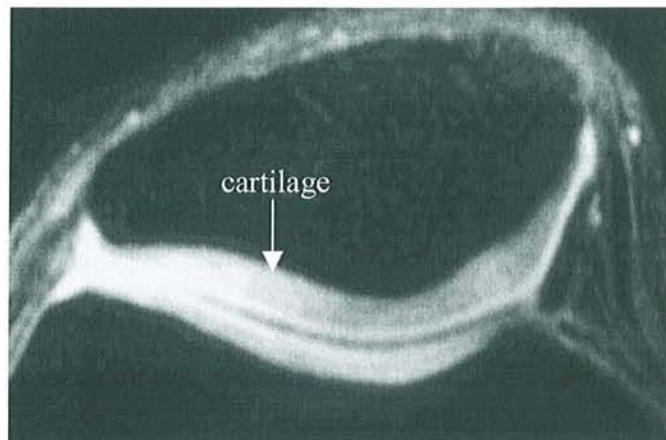


Figure 6 : Image IRM d'un genou en séquence pondérée T1 montrant un tissu cartilagineux très contrasté par rapport aux parties osseuses.

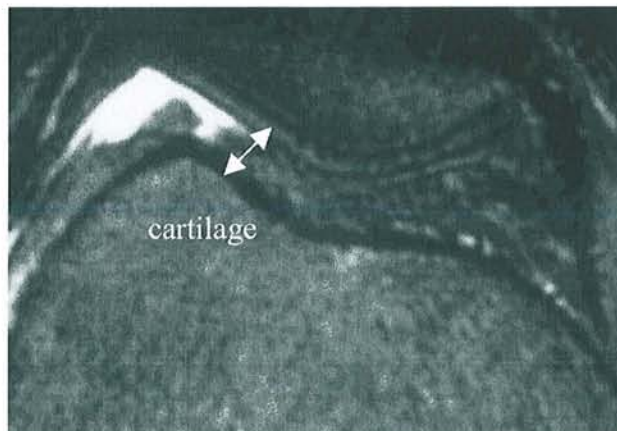


Figure 7 : Image IRM d'un genou en séquence pondérée T2 montrant un tissu cartilagineux avec un aspect plurilaminaire indiqué par la flèche blanche

Les séquences en 3D SPGR (*spoiled gradient echo*) ou en saturation de la graisse (FLASH) et les séquences FSE T2 (*fast spin echo*) sous-estiment in vivo les lésions de bas grade (grade 1 : œdème et grade 2 : fissure) et évaluent correctement les lésions de grade plus sévères (grade 3 : fissuration jusqu'à l'os sous chondral et grade 4 : mise à nu de l'os sous chondral) [Recht, 1996]. Par ailleurs, il a été montré que les mesures d'épaisseur effectuées sur les images pondérées T1 sont corrélées aux mesures faites en histologie et la différence de mesure résiduelle est due à la faible résolution des images IRM [Kladny, 1996]. L'étude volumique

est réalisée avec des séquences 3-D echo gradient pondérées T1 qui présentent un bon contraste tissulaire et une bonne résolution spatiale [Graichen, 2000]. L'étude volumique s'avère être un outil supplémentaire pour une évaluation longitudinale du cartilage ou pour déterminer les variations de volume des lésions chondrales en zones portantes au cours de l'arthrose. Certains auteurs ont montré une diminution plus importante du volume du cartilage tibial et condylien interne chez des patients souffrant de gonarthrose.

A l'heure actuelle, les appareils utilisés en clinique ne peuvent que détecter la dégradation du cartilage à partir de l'apparition de fibrillations ou de fissurations en surface du cartilage et notamment le pincement de l'interligne, les ulcérations du cartilage et la mise à nu de l'os sous-chondral, quelque soit la séquence utilisée. Le principal axe de recherche est l'amélioration de la résolution des images pour pouvoir détecter le ramollissement initial du cartilage œdémateux (chondromalacie). Ultérieurement, ces techniques devraient permettre d'explorer non invasivement l'action de médicaments à visée chondroprotectrices. Trois méthodes quantitatives semblent être très prometteuses pour caractériser biochimiquement et structurellement le tissu cartilagineux : il s'agit des techniques de cartographies simples (T1, densité protonique et surtout T2) (Figure 8) ou associées à l'utilisation d'agents de contraste et de l'imagerie sodium [Borthakur, 1999; Borthakur, 2000]. Cette dernière est cependant limitée à des imageurs purement expérimentaux.

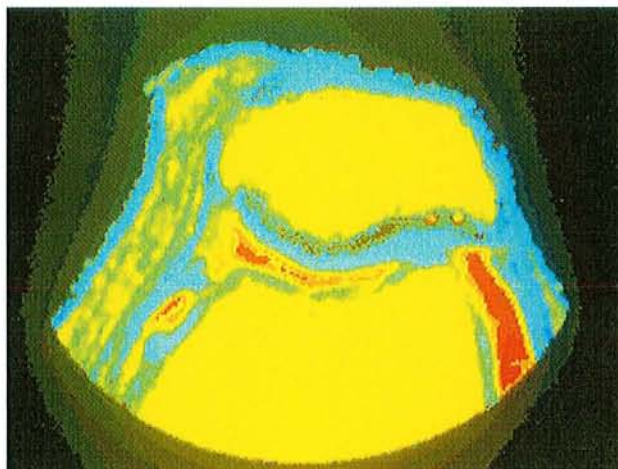


Figure 8 : cartographie T2 d'un genou humain en coupe axiale

L'utilisation d'agents de contraste (manganèse, gadolinium) [Sciulli, 1999], injectés par voie intraveineuse ou intra-articulaire, constitue une deuxième voie d'approche quantitative. Cette diffusion des agents de contraste peut être appréciée quantitativement par cartographie T1 du

tissu cartilagineux et permet de suivre la déplétion en protéoglycanes du fait de l'affinité des PG pour l'agent de contraste.

4. L'échographie conventionnelle basse fréquence

Actuellement, l'épaule, la hanche [De Pellegrin, 2000] et le genou sont les principales articulations dont la visualisation et l'exploration sont pratiquées en routine clinique surtout pour l'étude des structures abarticulaires (tendons). La gamme de fréquence est située entre 5 et 10 MHz. La résolution axiale obtenue à ces fréquences est de l'ordre de 0,2 mm. Le cartilage hyalin a été étudié uniquement au genou [Dichfield, 2000; Disler, 2000; Grobbelaar, 2000; Tomlinson, 2000]. Il apparaît comme une bande hypoéchogène encadrée par deux interfaces très échogènes qui correspondent aux interfaces respectives entre le liquide synovial et le cartilage et entre le cartilage et l'os sous-chondral. Cependant, son étude est limitée à certaines régions accessibles, notamment la partie postérieure des condyles au sein de la gouttière intercondylienne en position de flexion. Le cartilage arthrosique est détecté selon différents critères :

- diminution de la netteté de l'interface entre le liquide synoviale et le cartilage indiquant la présence de fibrillations à la surface du cartilage.
- augmentation de l'échogénicité de l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral, due à des modifications du cartilage et de l'os sous-chondral.
- amincissement de la bande située entre les interfaces hyperéchogènes indiquant une diminution de l'épaisseur du cartilage qui peut aller jusqu'à la disparition totale du tissu cartilagineux et la mise à nu de l'os sous-chondral.

L'échographie conventionnelle se révèle être une technique peu coûteuse lorsqu'elle est pratiquée de façon non invasive. Par ailleurs, elle est non irradiante. La mesure de l'épaisseur du cartilage est possible. Il est nécessaire d'augmenter la fréquence ultrasonore pour améliorer la résolution des images et pour permettre la détection et la quantification des changements locaux du cartilage induits par les pathologies articulaires. Néanmoins, la zone d'exploration en profondeur est limitée par l'atténuation des ultrasons dans le cartilage.

5. L'arthroscopie et la chondroscopie

L'arthroscopie est une technique invasive utilisée en dernier recours par rapport aux méthodes non invasives à cause du geste chirurgical qu'elle implique. Elle consiste à l'introduction au sein de l'articulation d'une optique à vision directe ou d'un palpeur manuel.

L'optique, reliée à un appareil photographique ou vidéo permet au praticien d'observer directement les surfaces articulaires, notamment celles des différents cartilages de l'articulation. Le palpeur, en contact de la surface, donne une information qualitative et subjective sur la rigidité du cartilage. En revanche, le praticien ne peut pas obtenir des informations sur la structure interne du cartilage.

Les résultats, principalement observés par la suite, sont obtenus par cette technique dans le cas de l'arthrose, celle-ci étant la pathologie la plus étudiée lors d'arthroscopie. En tenant compte des observations visuelles et des informations tactiles grâce au palpeur, les praticiens ont pu classer les lésions dégénératives du cartilage en quatre stades (Figure 9). Cette classification proposée par Beguin et Locker ne tient compte ni de la taille ni de la localisation des lésions [Ayrat, 1996].

- Stade 0 : le cartilage est normal et présente un aspect blanc, brillant et luisant à l'image et ferme et élastique à la palpation.
- Stade I : un ramollissement du cartilage est détecté à la palpation (chondromalacie).
- Stade II : des filaments, des fissurations, des érosions et éventuellement des « clapets » sont observés visuellement en surface du cartilage.
- Stade III : A l'image apparaissent des fissurations en « gueule de requin » et le cartilage a l'aspect en « chair de crabe ». Dans les fissurations, le praticien sent un contact avec l'os sous-chondral.
- Stade IV : Il n'a plus de cartilage et l'os sous-chondral est mis à nu



Figure 9 : Images d'arthroscopie de la surface articulaire présentant l'état de la surface articulaire à différents stades :

stade I : état œdémateux et ramollissement (A)

stade II : état irrégulier (B)

stade IV : mise à nu de l'os sous-chondral (C)

En parallèle de l'arthroscopie, la chondroscopie (arthroscopie médicale ou *office arthroscopy*) est une technique utilisant des instruments de petit diamètre autorisant une exploration endo-articulaire sous anesthésie locale [Ayrar, 1993; Ayrar, 1995]. Au lieu de la simple description des surfaces articulaires, elle a pour but le suivi et la quantification des lésions cartilagineuses dans le cadre de l'étude de nouveaux traitements chondroprotecteurs et permet de réaliser des biopsies synoviales et des régularisations méniscales. En revanche, les gestes chirurgicaux plus lourds (synovectomie, plastie du ligament croisé antérieur) ne peuvent être réalisés en chondroscopie.

En conclusion, il est difficile d'envisager l'arthroscopie comme moyen de routine clinique à cause de son caractère invasif. Elle représente actuellement la technique de référence (*gold standard*) pour l'évaluation des lésions du cartilage.

6. Autres techniques d'imagerie

Les techniques d'imagerie que nous allons voir maintenant, sont utilisées principalement dans le domaine de la recherche et pratiquement pas en routine clinique.

a. La scintigraphie

La scintigraphie est une technique radio-isotopique qui permet de suivre après injection locale ou parentérale le devenir d'un radio traceur dans le site articulaire, dans le cas présent. Il est possible de construire une cartographie du rayonnement radioactif de l'isotope injecté sur des régions anatomiques précises. L'image représente une projection 2-D d'un volume irradié et le paramètre codé en niveaux de gris est le nombre de décroissances radioactives provenant d'un volume élémentaire. Dans une étude réalisée sur le cartilage articulaire du genou, du sélénium 75 a été injecté par voie intra-articulaire dans le genou chez des lapins [Yu, 1999]. 15 minutes après l'injection, la scintigraphie montre que l'élément radioactif se situe surtout dans le cartilage et que sa concentration locale est proportionnelle à la celle des chondroïtines sulfates, donc des protéoglycanes. Une autre étude de scintigraphie, avec un cation qui est une serine protéinase (antileucoprotéinase) marquée à l'Iode 123, est réalisée dans un modèle de monoarthrite induite chez le rat [Meyer, 2000]. Il a été montré que la diminution de la quantité d'antileucoprotéinase, qui est une structure cationique injectée comme radio traceur dans les deux genoux, reflète la déplétion locale des PG du fait de l'affinité des PG pour le traceur. Cette technique a permis de montrer des déplétions en PG sur

le genou arthritique ainsi que sur le genou controlatéral. Comme l'un des premiers changements significatifs de l'arthrose est la déplétion en PG du cartilage, la scintigraphie pourrait être un moyen de détection des pathologies impliquant une déplétion en PG aux stades précoces (43).

b. La tomographie à cohérence optique

La tomographie à cohérence optique (OCT) est une technique basée sur la rétrodiffusion de la lumière infrarouge de façon analogue à l'échographie ultrasonore. La résolution axiale est de l'ordre de 5 à 15 μm , mais la pénétration de la lumière est au mieux de 4 mm actuellement [Herrmann, 1999]. Une étude a été réalisée chez l'homme en différents sites (genou, hanche, cheville, métatarse, phalange, coude, vertèbre et clavicule). L'OCT est capable de montrer les modifications très fines de la structure induites par l'arthrose. Il existe une très bonne concordance entre les images d'OCT et d'histologie. La mesure d'épaisseur en OCT montre une différence de 7 à 9 % par rapport aux mesures histologiques, car le tissu subit des distorsions lors de la préparation histologique. Une image d'OCT est sensible à la polarisation de la lumière qui peut être modifiée par l'organisation des fibres de collagène. Comme une des modifications structurales induites par l'arthrose est la désorganisation du réseau collagénique, la quantification du degré de polarisation de la lumière peut être un moyen de dépistage de l'arthrose du cartilage. Par ailleurs, l'eau absorbe la longueur d'onde 1500 nm dans le domaine de fréquence de l'OCT. Cette technique peut donc mesurer le contenu en eau du cartilage.

E. MESURES DE PARAMETRES ACOUSTIQUES DU CARTILAGE ET ECHOGRAPHIE DE HAUTE-RESOLUTION

1. Caractérisation du cartilage

Les différents travaux d'exploration par ultrasons sont présentés par ordre croissant des fréquences utilisées. Chiang E. H. *et al.* présentent une intéressante étude *in vitro* de caractérisation de la surface articulaire à 5 MHz chez l'homme sur des cartilages normaux et arthrosiques des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux [Chiang, 1997]. L'intérêt de cette étude est de présenter une méthode qui peut être envisagée comme moyen de détection de l'arthrose chez l'Homme. Elle est basée sur l'évaluation de la rugosité de la surface articulaire par la mesure du coefficient de réflexion de cette même surface. Dans cette étude, il est montré que suivant le degré de rugosité, ce paramètre acoustique est plus ou moins

indépendant de l'angle d'incidence du tir ultrasonore dans un domaine angulaire qui augmente avec le degré de rugosité. Cette méthode pourrait être appliquée *in vivo* pour l'évaluation de fibrillation de la surface articulaire induite par l'arthrose par une sonde endo-articulaire. Les tailles des défauts qui sont de l'ordre de 20 μm à 150 μm requièrent une fréquence d'exploration assez basse de l'ordre de 5 MHz.

L'étude de Töyräs J *et al.* porte sur la caractérisation à 22 MHz chez le bœuf, de dégradations enzymatiques du cartilage articulaire *in vitro* [Töyräs, 1999]. 60 échantillons ont été étudiés pour cette étude. L'épaisseur du cartilage a été mesurée par une sonde de pression en forme d'aiguille et les deux paramètres acoustiques, la célérité et l'atténuation, ont été évalués dans le sens de la profondeur. Grâce à l'utilisation de la collagénase, enzyme dégradant spécifiquement le collagène, le coefficient de réflexion à la surface articulaire diminue de façon significative (- 96,4 %, $p < 0,01$). Cette diminution s'explique par une fibrillation des fibres de collagène. De plus, ils observent une légère diminution de la célérité des ultrasons (- 6,2 %, $p < 0,01$). Dans une moindre mesure, la dégradation par la chondroïtinase ABC, enzyme spécifique des PG provoque une légère augmentation de l'échogénicité de l'intérieur du cartilage (+ 18,1 %, $p < 0,05$) et une diminution de la célérité (- 13,4 %, $p < 0,01$) après 44 heures d'incubation. Pour les deux dégradations, aucune variation n'est observée pour l'atténuation. Par ailleurs, sur les lignes échographiques apparaît un écho entre les signaux de la surface articulaire et de l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral qui correspond au front de pénétration de la chondroïtinase au sein du cartilage. Aucun changement significatif n'a été relevé en ce qui concerne l'atténuation.

Myers S. I. *et al.*, ont présenté une étude portant sur l'exploration *in vitro* à 25 MHz de cartilages humains normaux (27 échantillons) et arthrosiques (40 échantillons) de pièces anatomiques (nécropsies) [Myers, 1995]. Le cartilage normal présente le même aspect que celui décrit à plus basse fréquence, une bande hypoéchogène (la matrice interne du cartilage) encadrée par deux interfaces échogènes (la surface articulaire et la limite entre le cartilage et l'os). La surface articulaire est plus échogène pour le cartilage arthrosique. L'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral apparaît plus large et plus irrégulière dans le cartilage arthrosique. L'augmentation de l'échogénicité de la matrice est due à la fibrillation du cartilage et l'épaisseur de la première interface est proportionnelle à la profondeur des irrégularités de surface évaluées en histologie ($r = 0,78$). Les épaisseurs du cartilage mesurées en échographie sont corrélées fortement à celles mesurées en histologie ($r = 0,87$). La célérité des ultrasons est plus élevée dans le cartilage normal ($1658 \pm 185 \text{ m.s}^{-1}$) que dans le cartilage

arthrosique ($1581 \pm 148 \text{ m.s}^{-1}$). Aucune relation n'a été observée entre la célérité des ultrasons et le contenu en eau d'une part et les concentrations en acide hyaluronique et en hydroxyproline d'autre part qui reflètent respectivement les contenus en PG et en collagène.

Les travaux de Senzig D. A. *et al.* ont porté sur la mesure de l'atténuation dans le cartilage fémoral chez le bœuf dans la bande de fréquence 10 - 40 MHz dans cinq échantillons [Senzig, 1992]. Le coefficient d'atténuation mesuré est la moyenne intégrale de l'atténuation dans la bande 10-40 MHz. Les valeurs de ce coefficient varient entre 28 et 65 dB/cm. Au sein d'un même échantillon, l'atténuation mesurée localement varie entre 6 % et 60 % de la valeur moyenne de l'échantillon. Ces résultats indiquent que l'atténuation dépend de la localisation de la mesure, notamment si elle est située dans une partie portante de l'articulation étudiée.

Kim H. K. W. *et al.* ont étudié à 50 MHz chez le porc les changements opérés au sein du cartilage articulaire, au cours de la maturation, par l'étude qualitative des images échographiques et la mesure de l'épaisseur du cartilage [Kim, 1995]. L'étude a porté sur 12 échantillons de la sixième semaine à la vingtième semaine postnatales. Chaque partie du genou est explorée par le transducteur selon les plans sagittal et transverse. Sur les images échographiques, il a été observé, entre les deux interfaces très échogènes (la surface articulaire et la limite entre le cartilage et l'os sous-chondral), un aspect trilaminaire du cartilage. Ce dernier consiste en une succession de trois bandes qui sont respectivement hypoéchogène, hyperéchogène et anéchogène, de la surface articulaire à l'os sous-chondral. Cet aspect concerne uniquement les porcs âgés de vingt semaines. Les épaisseurs relatives des couches sont respectivement de 40 - 50 %, 40 - 45 % et 5 - 20 % de celle du cartilage. Ce phénomène est observé généralement pour les plateaux tibiaux, la rotule et les condyles fémoraux, à l'exception des parties portantes de ces derniers où le cartilage est homogène et anéchogène. Les épaisseurs relatives des trois couches varient selon la position du cartilage articulaire au sein de l'articulation. Chez les porcs âgés de 6 semaines et de 10 semaines, le cartilage ne présente pas d'aspect trilaminaire. Kim n'a pas trouvé de corrélation exacte entre l'aspect trilaminaire décrit ci-dessus et les différentes couches histologiques du cartilage articulaire. Mais il note cependant que l'organisation du cartilage observée sur les coupes histologiques colorées à la safranine O (coloration spécifique des PG) semble correspondre à l'aspect en trois couches décrit en échographie.

La dernière étude notable sur le cartilage à haute fréquence est celle de Agemura D. H. *et al.* sur la mesure de la célérité et de l'atténuation chez le bœuf adulte à 100 MHz [Agemura, 1990]. Plusieurs cas de dégradations par attaques d'enzymes spécifiques ont été comparés au

cas normal. Pour chaque série, seuls deux échantillons ont été étudiés. Les enzymes ont été choisies pour trois buts différents : enlever les constituants matriciels non collagéniques du cartilage (chondroïtinase ABC, trypsine, elastase), dégrader spécifiquement les chondroïtines sulfates, glycosaminoglycanes composant les protéoglycanes et rompre les *cross-link*, molécules reliant les fibres de collagène entre elles. Une augmentation de l'atténuation est observée lorsque les *cross-link* sont rompus. En effet, les valeurs d'atténuation se situent entre 88 ± 9 dB/mm et 147 ± 15 dB/mm pour les cartilages normaux et entre 143 ± 14 dB/mm et 185 ± 14 dB/mm pour les cartilages dont les *cross-link* sont rompus. La célérité des ultrasons est influencée par l'orientation des fibres de collagène par rapport au faisceau ultrasonore. En effet, les valeurs de célérité se situent entre 1635 ± 27 m/s et 1671 ± 61 m/s lorsque la zone explorée contient des fibres aussi bien parallèles que perpendiculaires au faisceau. En revanche, pour une orientation strictement perpendiculaire au faisceau, les valeurs de célérité se situent entre 1660 ± 44 m/s et 1720 ± 99 m/s. Par ailleurs, la dégradation des chondroïtines sulfates semble apparemment avoir une influence sur les propriétés acoustiques du tissu, mais le petit nombre d'échantillons ne permet pas de conclure.

2. Travaux effectués au Laboratoire d'Imagerie Paramétrique

Ces études ont été mises en œuvre pour évaluer la capacité de l'échographie de haute fréquence de détecter les lésions précoces et locales de l'arthrose. Les études présentées ont pour objet l'exploration en 3D par échographie de haute fréquence (50 MHz) *in vitro* du cartilage rotulien de rat.

Le sujet de la première étude est un modèle d'arthrose induite chimiquement par l'injection d'une dose de 3 mg de mono-iodo-acétate (MIA) dans l'articulation du genou [Saïed, 1997]. Les changements observés sur les images échographiques par rapport à celles de la rotule controlatérale pour les deux premières semaines après l'injection sont un léger amincissement du cartilage, une baisse de l'échogénicité de la surface articulaire qui devient plus irrégulière, une augmentation de l'échogénicité de 30 % de la matrice interne du cartilage et l'apparition de structures échogènes dans l'os sous-chondral (Figure 10). Pour les quatrième et huitième semaines après injection, le cartilage est tellement dégradé que les mesures d'épaisseur et d'échogénicité pour les cartilages arthrosiques ne peuvent être comparées à celles de cartilages témoins. Par ailleurs, pour les deux dernières semaines, l'os sous-chondral est tellement remanié que l'estimation de l'épaisseur du cartilage devient difficile. Au cours du temps, l'échogénicité diminue aussi bien en surface qu'à l'intérieur du cartilage. L'histologie montre

une déplétion et une désorganisation des chondrocytes, une déplétion et la prolifération d'un tissu conjonctif et fibreux dans l'os sous-chondral.

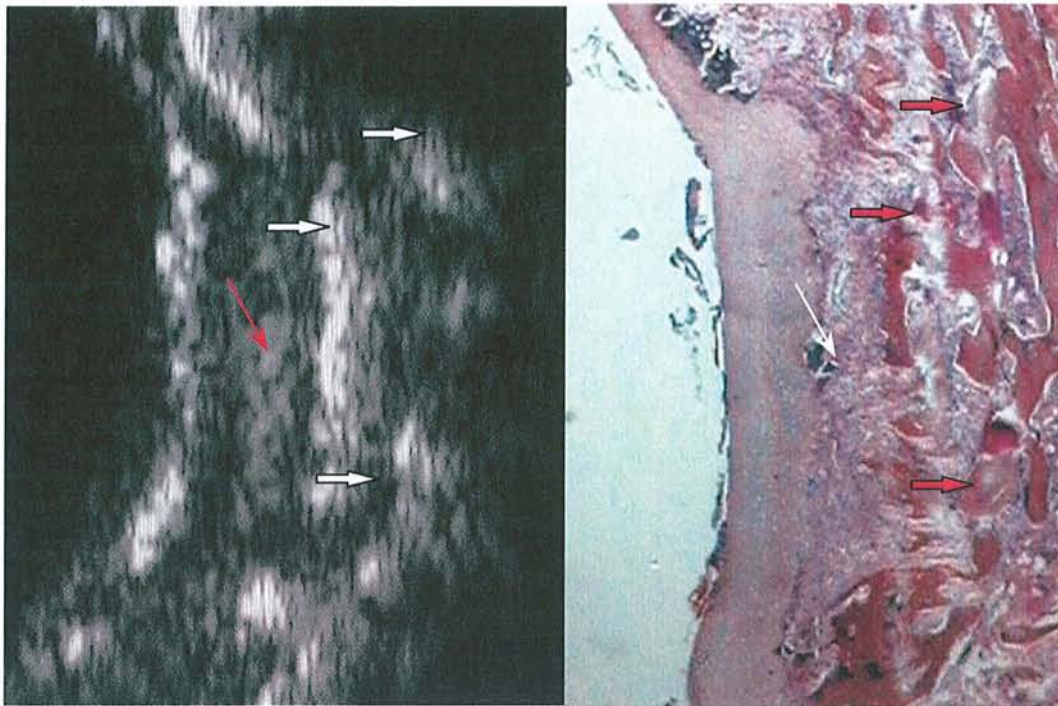


Figure 10 : Corrélation entre l'échographie (à gauche) et l'histologie (à droite)

Dans une seconde étude sur ce modèle d'arthrose chez le rat, la dose de MIA a été diminuée de 3 mg à 0,1 mg pour provoquer des lésions moins sévères du cartilage et évaluer la sensibilité des ultrasons à détecter des modifications structurales moins prononcées [Cherin, 1998]. Pour la première semaine après injection, l'épaisseur du cartilage arthrosique est légèrement plus faible que celle du cartilage normal. Dans les semaines suivantes, la tendance s'inverse et l'écart entre les épaisseurs des cartilages arthrosiques et témoins est de l'ordre de 20 % en quatrième semaine. Cet œdème est sans doute dû à la réparation du tissu. Le coefficient de réflexion (CIR) qui reflète la structure de la surface articulaire, est plus faible pour le cartilage arthrosique par rapport au cartilage témoin dès la première semaine et l'écart augmente avec du temps. Le coefficient de rétrodiffusion (CIRD) qui reflète la structure de l'intérieur du cartilage, est plus élevé pour le cartilage arthrosique par rapport au cartilage témoin dès la première semaine et l'écart diminue avec le temps. En dernière semaine, le CIRD du cartilage normal est plus élevé que celui du cartilage pathologique. Les variations de ce paramètre reflètent des changements de densité des diffuseurs et donc du contenu des constituants et de l'organisation de la matrice dans la couche intermédiaire du cartilage. Les

deux paramètres mesurés peuvent fournir des informations sur les modifications locales de structure du cartilage induites par des pathologies articulaires comme l'arthrose.

Une troisième étude a consisté à mettre au point une méthode de détection en 3D des contours du cartilage (surface articulaire et interface entre le cartilage et l'os sous-chondral) [Lefebvre, 1998]. A partir de ces contours, on peut déterminer en chaque point du balayage l'épaisseur du cartilage (Figure 11). Sur 162 rotules dont 67 arthrosiques, la méthode a déterminé correctement la surface dans 99 % des cas et l'interface entre le cartilage et l'os dans 86 % des cas. Les valeurs moyennes de l'épaisseur du cartilage estimée de façon automatique sont corrélées fortement avec les valeurs moyennes de l'épaisseur estimée manuellement ($r = 0,92$). Cette méthode permet de suivre les modifications des interfaces du cartilage au cours du développement de pathologies comme l'arthrose et au cours de la maturation.

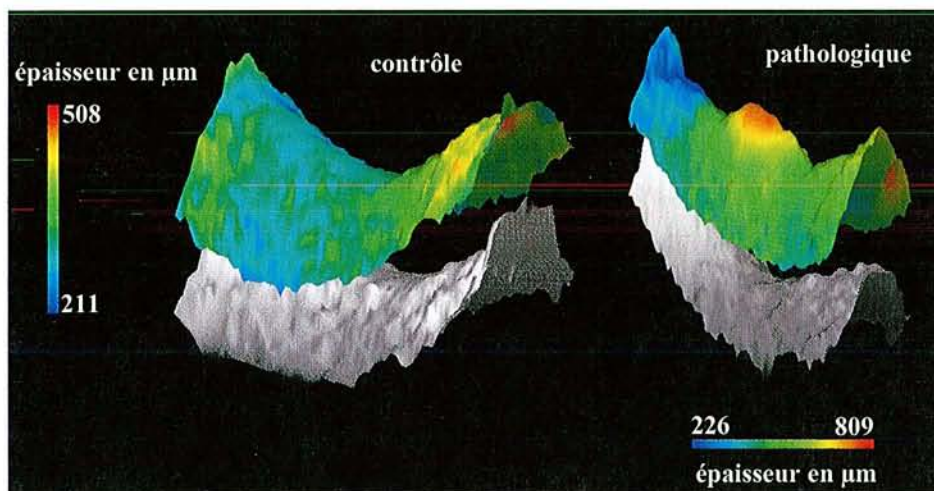


Figure 11 : Reconstructions 3-D des interfaces de cartilage témoin et arthrosique. Les nappes colorée et grise représentent respectivement la surface articulaire et l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral. L'épaisseur du cartilage calculée en chaque point du balayage est codée en niveau de couleur dont les deux échelles en μm indiquent le paramétrage.

CONCLUSION

Le tissu cartilagineux se révèle être un tissu complexe, anisotrope et composé de trois constituants principaux, les chondrocytes, le collagène (de types II, IX, X et XI) et les protéoglycanes. C'est l'association de ces deux derniers constituants qui permet au cartilage d'assurer son rôle d'amortisseur. Les pathologies articulaires modifient l'équilibre entre ces

deux macromolécules, empêchant ainsi le cartilage de remplir correctement son rôle d'amortisseur et entraînent à terme sa dégénérescence. C'est pourquoi les techniques d'évaluation des pathologies articulaires et de détection de leurs lésions précoces se révèlent cruciales pour éviter cette dégénérescence.

Actuellement, les techniques d'imagerie utilisées en clinique comme la radiographie, le scanner, l'IRM et l'échographie basse-fréquence, ne permettent pas de détecter les manifestations dégénératives du cartilage avant l'apparition des douleurs qui se produisent à un stade souvent tardif de la maladie. Les études réalisées au sein de notre laboratoire et celles menées par d'autres groupes sur l'exploration du cartilage par l'échographie qualitative et quantitative de haute fréquence ont montré la sensibilité des ultrasons aux modifications induites par les pathologies articulaires. La plupart de ces études montrent que l'image échographique et les paramètres acoustiques permettent de différencier les tissus pathologiques des tissus sains. Néanmoins, elles n'ont pas permis d'identifier clairement la part des constituants biochimiques et leurs caractéristiques dans les modifications du signal ultrasonore. Exceptés, celles de deux groupes qui ne rapportent néanmoins aucune étude quantitative histologique et biochimique : Agemura et al. qui montrent (sur 2 échantillons par cas) l'influence de l'orientation des fibres de collagène sur la célérité et des ruptures des ponts covalents (*cross-link*) sur l'atténuation [Agemura, 1990] et Töyräs et al. qui décrivent seulement l'influence de la variation des contenus du collagène et des PG sur la propagation de l'onde ultrasonore dans le cartilage[Töyräs, 1999].

L'identification du rôle des constituants du cartilage dans les modifications du signal ultrasonore induites par les pathologies articulaires étant importante aussi bien pour un diagnostic que pour le suivi de l'effet des thérapeutiques, l'objectif des travaux présentés dans les chapitres suivants est de comprendre l'interaction entre l'onde ultrasonore et le cartilage et de déterminer l'influence des constituants biochimiques dans la propagation de l'onde ultrasonore. La méthode employée consiste à étudier à 50 MHz le cartilage de rat à différents stades de sa maturation et dans des processus de dégradation enzymatique. Les données ultrasonores sont confrontés aux résultats biochimiques et histologiques afin d'établir des liens entre les paramètres acoustiques étudiés et les caractéristiques des constituants biochimiques.

CHAPITRE II : METHODES QUANTITATIVES DE CARACTERISATION TISSULAIRE

INTRODUCTION

Dans un premier temps est présenté le matériel utilisé pour l'acquisition des données ultrasonores et l'exploration échographique. Nous verrons ensuite les différentes méthodes de calcul des coefficients de réflexion, de rétrodiffusion et d'atténuation ainsi que celle de la célérité des ultrasons. En fin de chapitre est présentée la méthode de mesure d'épaisseur du cartilage à partir d'images échographiques, bien que ce dernier index quantitatif ne soit pas à proprement parler un paramètre acoustique, car il n'est pas établi à partir d'un traitement du signal.

A. MATERIEL D'ACQUISITION

1. Banc d'acquisition

Le banc d'acquisition utilisé lors des expériences comprend un transducteur, un générateur d'impulsions, un oscilloscope numérique, un ensemble moteur et un ordinateur PC. La partie moteur est posée sur une table anti-vibration. Le générateur (5900 PR de Sofranel) de 200 MHz de bande passante émet une impulsion électrique de courte durée qui excite le transducteur. Le signal de réception est observé à l'oscilloscope (Lecroy Co, New York, USA, modèle 9450A) où il est échantillonné à 400 MHz et numérisé sur 8 bits. Enfin il est sauvegardé dans la mémoire de l'ordinateur avec les conditions d'acquisition. C'est à partir de cet ordinateur qu'un logiciel d'acquisition gère aussi bien les commandes de déplacement des moteurs que l'enregistrement des lignes échographiques. Le système des moteurs développé par la société Microcontrole peut déplacer la sonde ultrasonore selon les trois dimensions de l'espace avec une précision de 0,1 μm et de 1 μm respectivement pour les deux axes de déplacement horizontaux et l'axe vertical. Un quatrième moteur permet une rotation de l'axe du transducteur dans un plan vertical avec une précision de 0,01°.

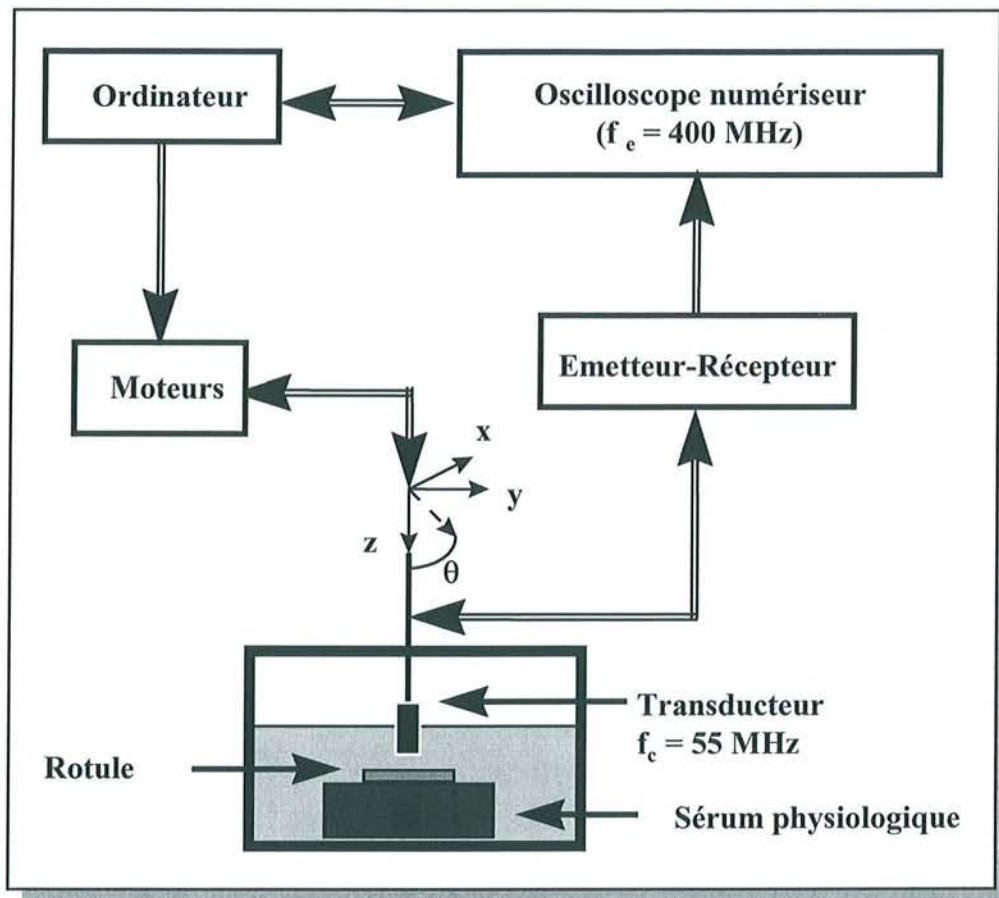


Figure 1 : Représentation schématique du banc d'acquisition ultrasonore

2. Transducteur

Le transducteur utilisé est un piézoélectrique polymère (PVDF) de la société Toray (Japon). Le diamètre actif a et le rayon de courbure rc sont respectivement de 3 mm et de 7,5 mm. Le transducteur est taillé pour résonner selon un spectre centré sur 125 MHz. A cause de l'atténuation de l'onde dans l'eau, le signal réfléchi par une plaque d'acier située à la distance focale du transducteur F (7,5 mm) présente un spectre centré sur 55 MHz. La valeur de l'atténuation ultrasonore mesurée dans l'eau est de $2,19 \times 10^{-4} \text{ dB/mm.MHz}^2$ dans la bande de fréquence 8-67 MHz [Taylor, 1972]. Si on étend cette loi jusqu'à 125 MHz, l'amplitude du signal diminue de 51 dB pour la fréquence de construction et de 9 dB pour la fréquence centrale f_c du spectre réfléchi par la plaque d'acier (55 MHz).

3. Résolution du système échographique

a. Résolution axiale

La résolution axiale qui est la capacité de distinguer deux structures réfléchissantes situées le long de l'axe de propagation, est essentiellement définie par la durée de la réponse impulsionnelle du capteur. Celle-ci est mesurée en pratique dans la limite des - 20 dB de l'intensité maximale. La durée de cette impulsion mesurée à - 20 dB est inférieure à 60 ns qui correspond à une résolution de 45 μm pour une célérité des ultrasons dans l'eau de 1500 m.s^{-1} .

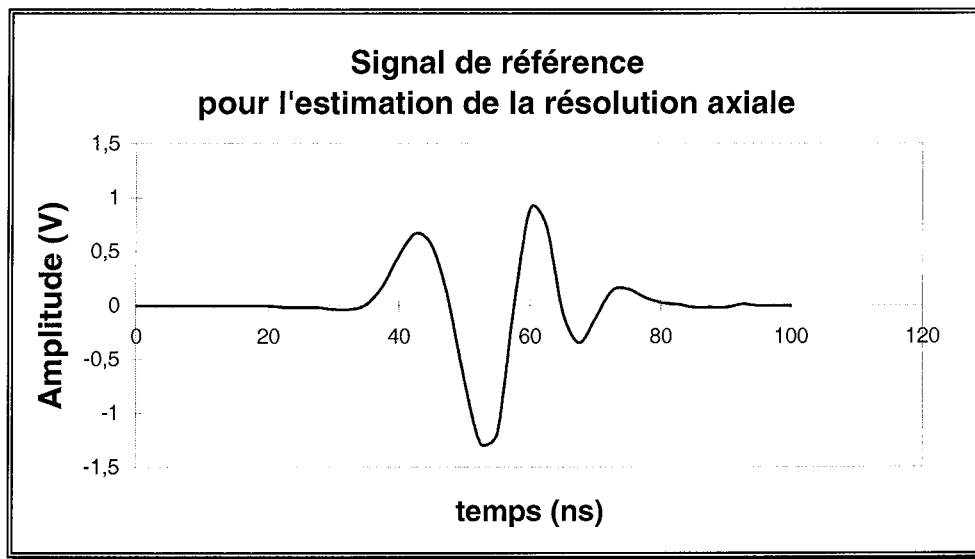


Figure 2 : Résolution axiale à la focale (l'amplitude est unités arbitraires)

b. Résolution latérale

Pour la résolution latérale qui est la capacité de distinguer deux structures réfléchissantes situées dans le plan perpendiculaire à l'axe de propagation, la distribution de la pression acoustique dans le plan focal d'un transducteur focalisé peut être définie de façon analytique à l'aide de fonctions de Bessel en mode monochromatique [Raum, 1997]. La résolution latérale peut être alors définie comme le diamètre du faisceau ultrasonore où l'intensité du champ acoustique demeure dans la limite de - 6 dB de l'intensité maximale. Ce diamètre est donné par l'expression suivante :

$$R_{latérale} = 1,028 \times \lambda \times \left(\frac{F}{a} \right) \quad (1)$$

où λ est la longueur d'onde de l'onde monochromatique. Pour les travaux présentés dans les chapitres suivants est utilisé le mode impulsionnel où le spectre du signal d'émission comporte une certaine largeur de bande au lieu d'une seule raie. Certains auteurs estiment que l'expression de la résolution latérale en mode monochromatique peut s'appliquer au mode impulsionnel à condition de remplacer λ par $\bar{\lambda}$, la longueur d'onde correspondant à la fréquence centrale du spectre [Hunt, 1983]. Dans le cadre de cette loi, la résolution latérale est de 70 μm pour une célérité des ultrasons dans l'eau de 1500 m.s^{-1} .

En pratique, la résolution latérale peut être estimée en mesurant le maximum de l'énergie des signaux réfléchis par un fil placé à la focale du transducteur. Avec des fils de diamètre de 15 μm et de 50 μm , on obtient respectivement des valeurs de 65 μm et de 69 μm , proches de la valeur théorique.

c. Profondeur de champ

Pour la caractérisation d'un transducteur est évaluée aussi la profondeur de champ qui correspond à la zone où les caractéristiques du champ acoustique restent proches de celles du champ situé au point focal. A cette fin est estimée la distribution de la pression acoustique le long de l'axe qui admet une solution analytique pour un transducteur focalisé en mode monochromatique. La profondeur de champ correspond dans ce cas à la zone de l'axe dans laquelle l'intensité du champ acoustique demeure dans la limite de - 6 dB en dessous de l'intensité maximale. La longueur de cette zone est donnée par l'expression suivante :

$$PC = 7,08 \times \lambda \times \left(\frac{F}{a} \right)^2 \quad (2)$$

Comme pour la résolution latérale, l'expression valable pour le mode monochromatique peut s'appliquer au mode impulsionnel en remplaçant λ par $\bar{\lambda}$. Dans le cadre de cette loi, la profondeur de champ est de 1200 μm pour une célérité des ultrasons dans l'eau de 1500 m/s .

B. ETUDE DES PARAMETRES ACOUSTIQUES

1. Estimation de la réflexion et de la rétrodiffusion

a. Estimation de la réflexion

Les coefficients de la réflexion et de la rétrodiffusion apparente sont calculés dans le cadre de l'acoustique linéaire qui suppose des variations faibles localement des grandeurs physiques dans l'espace considéré.

L'écho réfléchi en direction du transducteur par l'interface entre le sérum physiologique et le cartilage dont la distance est située à la distance z du transducteur, est de type spéculaire, car la taille de cette structure réfléchissante est bien supérieure à la longueur d'onde des ultrasons. Le spectre d'énergie du signal peut être modélisé par l'équation suivante :

$$S_c(z, f) = E(f) \times G(f) \times A_0(z, f) \times H_s^2(z, f) \times R_c(f) \quad (3)$$

où $E(f)$ est la fonction d'émission (qui comprend l'excitation électrique et la transduction électroacoustique), $G(f)$ est la fonction de réception (incluant la transduction acousto-électrique et la fonction d'appareil en réception), $A_0(z, f)$ est la fonction d'atténuation de l'onde ultrasonore dans le sérum physiologique jusqu'à la profondeur z (aller-retour), $H_s^2(z, f)$ est la fonction de diffraction (aller-retour) et $R_c(f)$ est le coefficient de réflexion à la surface du tissu.

Les hypothèses permettant d'établir cette modélisation de la réflexion sont les suivantes :

1. La distance z entre le transducteur et chaque point de la surface étudiée doit être grande devant les dimensions du transducteur. Les fonctions de diffraction et d'atténuation peuvent être alors séparées.
2. les dimensions de la surface exposée sont petites devant z . Le terme d'atténuation est alors considéré comme constant en tout point de la surface et le terme $H_s^2(z, f)$ est égal à l'intégrale de la fonction de diffraction sur la surface étudiée.
3. La surface étudiée est suffisamment plane pour que l'angle entre le vecteur d'onde et la normale à la surface soit proche de zéro. Ainsi le coefficient de réflexion peut être considéré indépendant de l'angle en tout point de la surface.
4. L'impédance acoustique locale de la surface étudiée est constante en chaque point de la surface. Le coefficient peut être considéré comme constant en chaque point de la surface.

Pour évaluer le coefficient de réflexion, il est donc nécessaire de connaître les différentes fonctions d'atténuation, de diffraction, d'émission et de réception ou de les éliminer grâce à la normalisation par le spectre d'un signal de référence. Ce signal est obtenu par la réflexion normale de l'onde ultrasonore sur un miroir acoustique plan, considéré comme parfait et situé à la même distance z que la surface étudiée. En appliquant la modélisation utilisée pour le signal réfléchi par la surface du tissu, le spectre du signal de référence peut s'écrire :

$$S_r(z, f) = E(f) \times G(f) \times A_r(z, f) \times H_r^2(z, f) \times R_r(f) \quad (4)$$

Les dimensions de la surface étudiée restent petites devant la distance z si le transducteur est focalisé sur la surface ou juste en dessous de la surface. Par ailleurs, les dimensions de

l'ouverture du transducteur restent petites devant cette même distance. En ce qui concerne la planéité de la surface, on peut modéliser la surface du cartilage par un paraboloïde hyperbolique, quadrique qui ressemble à une selle de cheval. Les rayons de courbure calculés expérimentalement à partir des images échographiques au centre de la rotule sont respectivement 1,5 et 3,5 mm pour les plans centraux transverse et sagittal. Les différences maximales de la surface correspondante au paraboloïde hyperbolique déterminé par ces valeurs expérimentales par rapport à un plan tangent en son centre sont de l'ordre de la dizaine de microns donc très petites devant la distance focale. On peut donc pour cette même zone de mesure considérer comme négligeable l'effet de courbure de la surface et on peut poser comme hypothèses l'égalité entre les fonctions $A_0(z,f)$ et $A_r(z,f)$ et entre les fonctions $H_s^2(z,f)$ et $H_r^2(z,f)$. En considérant la plaque d'acier comme un miroir acoustique parfait et non dispersif, on peut poser que : $R_r(f)=1$.

En effectuant le rapport des deux expressions, $R_c(f)$ est défini par l'expression :

$$R_c(f) = \frac{S_c(z,f)}{S_r(z,f)} \quad (5)$$

Les dimensions des fibres de collagène et des cellules à la surface du cartilage sont respectivement de l'ordre du micron et de la dizaine de microns. Si ces structures réfléchissantes entraînent des variations locales d'impédance sur l'ensemble de la surface étudiée, $R_c(f)$ représente alors un coefficient moyen au lieu d'un coefficient constant sur la surface tout en considérant néanmoins que les fonctions d'atténuation et de diffraction sont constantes sur l'ensemble de la surface. $S_c(z,f)$ et $S_r(z,f)$ sont les spectres calculés par la transformée de Fourier des signaux réfléchis respectivement par la surface étudiée du cartilage et par la plaque d'acier utilisée comme miroir acoustique.

Les signaux sont complétés par des zéros avant le calcul par transformée de Fourier. Cette opération appelée *zero-padding* permet un échantillonnage en fréquence plus précis du spectre calculé.

L'énergie moyenne exprimée en décibel a pour expression :

$$R_c^{dB}(f) = 10 \times \log_{10} \langle |R_c(f)|^2 \rangle \quad (6)$$

où $\langle . \rangle$ désigne la moyenne spatiale sur un ensemble de lignes échographiques.

Le coefficient intégral de réflexion qui représente le niveau moyen de réflexion dans la bande passante à - 6 dB du spectre du signal réfléchi Δf est défini par :

$$CIR = \frac{1}{\Delta f} \int_{\Delta f} R_c^{dB}(f) df \quad (7)$$

b. Estimation de la rétrodiffusion :

Le signal rétrodiffusé par un volume dV de la matrice interne du cartilage situé à la focale du transducteur peut être modélisé par l'expression suivante :

$$S_c(z_v, f) = E(f) \times G(f) \times A(z_v, f) \times H_v^2(z_v, f) \times T_c^2(f) \times U(z_v, f) \quad (8)$$

où z_v est la distance séparant le début du volume dV du transducteur, $T_c(f)$ est le coefficient de transmission à l'interface sérum-cartilage, $U(z_v, f)$ est la fonction de rétrodiffusion induite par les structures diffusantes du volume dV , $H_v^2(z_v, f)$ est la fonction de diffraction (aller-retour) et $A(z_v, f)$ est la fonction d'atténuation globale (aller-retour) pour les deux milieux de propagation, sérum physiologique et cartilage. Ce dernier terme peut se décomposer sous la forme suivante :

$$A(z_v, f) = A_0(z_0, f) \times A_c(z_v - z_0, f) \quad (9)$$

où $A_0(z_0, f)$ et $A_c(z_v - z_0, f)$ sont respectivement les fonctions respectives d'atténuation dans le sérum physiologique et dans le cartilage et z_0 désigne la distance entre le transducteur et la surface du cartilage.

Les hypothèses permettant d'établir cette modélisation de la rétrodiffusion sont les suivantes :

1. la distance z entre le transducteur et chaque point du volume dV est suffisamment grande devant les dimensions du transducteur pour pouvoir séparer les fonctions d'atténuation et de diffraction dans l'expression du signal rétrodiffusé.
2. Les dimensions du volume dV sont suffisamment petites par rapport à z pour considérer la fonction d'atténuation constante en chaque point de dV et le terme $H_v^2(z_v, f)$ est égal à l'intégrale de la fonction de diffraction sur le volume dV .

Le spectre $S_c(z_v, f)$ est estimé par transformée de Fourier du signal rétrodiffusé, après être complété par des zéros. Ce spectre est normalisé par le spectre $S_r(z_v, f)$ du signal de référence,

réfléchi par une plaque d'acier placée à la distance z , afin d'éliminer les fonctions de transfert du système d'acquisition :

$$\mu_c(z_v, f) = \frac{S_c(z_v, f)}{S_r(z_v, f)} \quad (10)$$

Les dimensions du volume étudié restent petites devant la distance z lorsque le transducteur est focalisé sur la surface ou juste en dessous. De même, les dimensions de l'ouverture du transducteur restent petites devant cette même distance z . Les célérités des ultrasons dans le cartilage et le sérum physiologique sont peu différentes. L'hétérogénéité des structures à l'intérieur du volume étudié ne nous empêche pas de considérer la fonction de diffusion globale comme la multiplication par le nombre de diffuseurs de la fonction de diffusion d'un diffuseur moyen en supposant que les fonctions de diffraction et d'atténuation sont globalement constantes à l'intérieur du volume. On peut poser comme hypothèse l'égalité des fonctions $A_0(z_0, f)$ et $A_r(z_v, f)$. Le volume dV est suffisamment petit et la célérité des ultrasons dans l'eau et dans le sérum physiologique sont suffisamment proches pour considérer équivalentes les fonctions $H_v^2(z_v, f)$ et $H_r^2(z_v, f)$. En négligeant les pertes d'énergie à la surface articulaire et en considérant la plaque d'acier comme un miroir acoustique parfait, on peut estimer que : $T_c^2(f) = R_r(f) = 1$.

Ce rapport spectral est qualifié d'apparent car la fonction d'atténuation dans le tissu subsiste dans la différence spectrale.

La courbe de rétrodiffusion moyenne est exprimée en décibel par :

$$\mu_c^{dB}(z_v, f) = 10 \times \log_{10} \langle |\mu_c(z_v, f)| \rangle \quad (11)$$

A partir de la courbe de rétrodiffusion est évalué le coefficient intégral de rétrodiffusion apparente qui représente le niveau moyen de rétrodiffusion dans la bande passante à - 6 dB du spectre du signal rétrodiffusé Δf et est donné par l'expression suivante :

$$CIRD = \frac{1}{\Delta f} \int_{\Delta f} \mu_c^{dB}(z_v, f) df \quad (12)$$

2. Estimation de l'atténuation et de la célérité des ultrasons

a. Processus d'acquisition

L'atténuation et la célérité des ultrasons sont estimées par des méthodes de substitution [D'astous, 1986; Van Der Steen, 1991]. Ces deux paramètres sont déterminés en chaque point du balayage à la différence des Coefficients intégraux de réflexion et de rétrodiffusion apparente. Une plaque d'acier considérée comme miroir parfait est utilisée comme référence. Les coupes de tissu sont maintenues au dessus de la plaque d'acier. Dans la figure suivante sont représentées les deux lignes échographiques utilisées pour l'estimation des deux paramètres : une ligne échographique à travers le tissu $S_{tis}(t)$ et la ligne de référence en l'absence du tissu $S_{ref}(t)$.

Les temps de vol des quatre échos ($t_1 \rightarrow t_4$) représentent dans l'ordre les temps d'arrivée des échos de la plaque d'acier en absence du tissu, d'entrée et de sortie du tissu et de la plaque d'acier à travers le tissu.

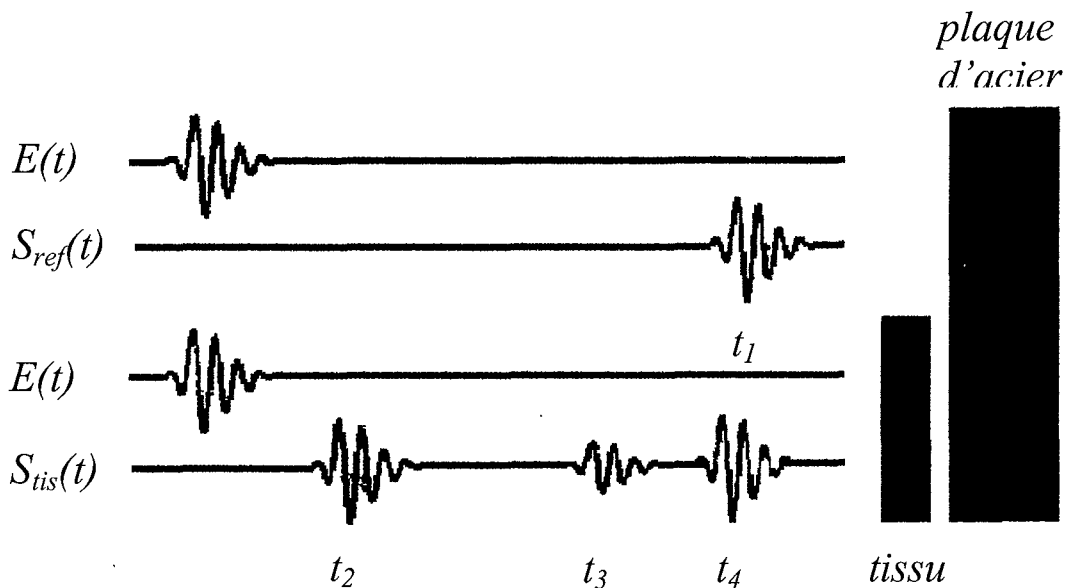


Figure 3 : Représentation schématique des lignes échographiques utilisées dans le calcul de l'atténuation et de la célérité

b. Estimation de l'atténuation

Nous avons vu pour la réflexion et la rétrodiffusion que le spectre de puissance du signal réfléchi par la plaque d'acier en l'absence de tissu $S_r(z, f)$ a pour expression :

$$S_r(z, f) = E(f) \times G(f) \times A_r(z, f) \times H_r^2(z, f) \times R_r(f) \quad (4)$$

En présence du tissu, le spectre de puissance du signal réfléchi par la plaque d'acier $S_t(z, f)$ a pour expression :

$$S_t(z, f) = E(f) \times G(f) \times A_t(z, f) \times H_t^2(z, f) \times R_r(f) \times T_c^4(f) \times e^{-\alpha(f) \cdot 2Ep} \quad (13)$$

où $A_t(z, f)$ est la fonction d'atténuation de l'onde ultrasonore dans le sérum physiologique jusqu'à la profondeur z (aller-retour) en présence du tissu, $H_t^2(z, f)$ est la fonction de diffraction (aller-retour) en présence du tissu jusqu'à la profondeur z , $\alpha(f)$ est le terme d'atténuation dans le tissu et Ep est l'épaisseur locale de tissu traversé.

On peut considérer que les fonctions $A_r(z, f)$ et $A_t(z, f)$ sont égales, car la différence de parcours dans le sérum est négligeable devant le double de la distance focale $2z$ (1,5 cm). En effet, la plus grande épaisseur de tissu traversé est de l'ordre de 300 μm et représente au maximum 4 % du double de la distance focale. De même, les fonctions $H_r^2(z, f)$ et $H_t^2(z, f)$ peuvent être considérées comme égales. Ces fonctions ne dépendent que de la géométrie de la sonde et du milieu de propagation. La plus grande source d'erreur réside dans la différence de célérité entre le tissu cartilagineux et le sérum physiologique. La célérité des ultrasons dans ce sérum est de l'ordre de 1500 m.s^{-1} et celle dans le cartilage est au maximum de 1700 m.s^{-1} . L'erreur maximale sur la célérité est donc de l'ordre de 13 %. Avec une épaisseur de tissu représentant 4 % du parcours de l'onde, l'erreur sur le plan focal est de l'ordre de 0,5 %. Enfin, on peut négliger par ailleurs les pertes aux interfaces et poser que : $T_c(f) = 1$.

L'atténuation en fonction de la fréquence a donc pour expression :

$$\alpha(f) = \frac{10}{2Ep} \text{Log}_{10} \left[\frac{S_r(f)}{S_t(f)} \right] \quad (14)$$

avec $\alpha(f)$ en dB.mm^{-1} .

L'épaisseur de tissu traversé est estimée par méthode temporelle et déterminée à partir de la position des quatre échos définis dans la figure précédente.

En fonction de la position des quatre échos ($t_1 \rightarrow t_4$) et de la célérité des ultrasons dans le sérum physiologique C_ϕ , l'épaisseur Ep s'exprime sous la forme :

$$Ep = C_\phi \times \left[\frac{(t_1 - t_4) + (t_3 - t_2)}{2} \right] \quad (15)$$

Les spectres sont calculés par transformée de Fourier du signal réfléchi par la plaque d'acier complété par des zéros.

A partir de la fonction d'atténuation sont évalués deux paramètres :

- Le coefficient intégral d'atténuation CIA exprimé en dB.mm^{-1} qui représente le niveau moyen de l'atténuation dans la bande de fréquence Δf :

$$CIA = \frac{1}{\Delta f} \int_{\Delta f} \alpha(f) df \quad (16)$$

- En supposant que la variation de l'atténuation en fonction de la fréquence peut être modélisée par l'équation suivante : $\alpha(f) = a.f^n$, l'exposant n est évalué par régression linéaire de la fonction $\text{Log}(\alpha(f))$ en fonction $\text{Log}(f)$.

c. Estimation de la célérité

La célérité des ultrasons dans le tissu cartilagineux est estimée par méthode temporelle et déterminée à partir de la position des quatre échos définis dans la figure précédente.

En fonction de la position des quatre échos ($t_1 \rightarrow t_4$) et de la célérité des ultrasons dans le sérum physiologique C_ϕ , la célérité C_c a pour expression :

$$C_c = C_\phi \times \left[1 + \frac{t_1 - t_4}{t_3 - t_2} \right] \quad (17)$$

Pour l'évaluation de la célérité dans le sérum physiologique, on acquiert l'écho réfléchi par la plaque d'acier pour deux distances différentes entre la sonde et la plaque d'acier. Connaissant la longueur du déplacement de la sonde entre l'acquisition des deux lignes, C_ϕ a été estimée grâce à la mesure du temps entre les échos de la plaque d'acier des deux lignes échographiques.

d. Détermination de la position des échos

Pour les calculs de célérité et d'épaisseur, la méthode retenue pour la détermination de la position de chaque écho est celle basée sur la détection de l'extremum de plus grande amplitude de l'écho. Cette méthode est particulièrement adaptée pour les signaux de très faibles amplitudes proches du niveau de bruit. Le début du signal entier de chaque écho est repéré par un seuil. Pour l'écho de sortie du tissu, la position déterminée par le seuil correspond à la fin du signal, car la détection se fait dans le sens décroissant du temps. A partir de la position correspondante au seuil, on détermine l'extremum de plus grande amplitude du signal dans la fenêtre contenant l'écho choisi. Pour la détermination de la position de l'écho de la plaque d'acier, l'extremum de plus grande amplitude correspond à l'extremum de la ligne échographique entière. En vue d'améliorer la précision du calcul, la position de chaque écho, retenue pour le calcul de célérité et d'épaisseur, est évaluée par un calcul d'interpolation parabolique de l'extremum détecté et de ses deux plus proches voisins.

Sur douze mesures de la célérité des ultrasons dans le sérum physiologique C_ϕ , l'écart moyen des valeurs estimées avec interpolation est divisé par deux par rapport à celui des valeurs estimées sans interpolation.

3. Estimation de l'épaisseur du cartilage

Deux images B-scan de l'enveloppe du signal sont choisies au centre du cartilage et parallèlement au plan sagittal. Dans ces images est délimitée une région d'intérêt (ROI) au centre du cartilage par les interfaces sérum-cartilage et cartilage-os et par deux segments parallèles joignant les deux interfaces et distants l'un de l'autre de 1 mm. L'épaisseur moyenne e du cartilage exprimée en μm est calculée à partir de l'expression suivante :

$$e = \frac{A}{dL} \times \frac{c}{2f_e} \quad (18)$$

où A est l'aire de la ROI en pixels, dL est le nombre de pixels séparant les deux segments, c est la célérité moyenne des ultrasons dans le tissu et f_e est la fréquence d'échantillonnage du signal.

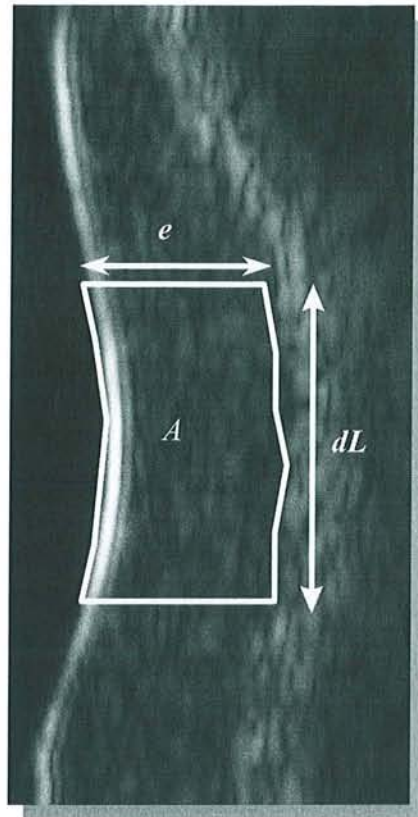


Figure 4 : Mesure d'épaisseur en échographie sur les images en mode B.

D'après l'expression de l'épaisseur, seule la valeur de la célérité des ultrasons dans le cartilage peut être une source de biais. En effet, l'incertitude sur la valeur de la célérité entraîne une incertitude du même ordre sur la valeur de l'épaisseur du cartilage exprimée en microns. Les travaux d'Agemura [Agemura, 1990] et les nôtres montrent que les variations maximales de célérité semblent de l'ordre de 11 % autour de la moyenne aussi bien lors d'une dégradation enzymatique que lors de la maturation.

CONCLUSION

Les différentes techniques qui viennent d'être présentées vont nous permettre dans les chapitres suivants de caractériser de façon quantitative le tissu cartilagineux au cours de la maturation et dans des processus de dégradation enzymatique où les caractéristiques du tissu se modifient. Cette caractérisation quantitative de haute fréquence a pour but de comprendre l'interaction de l'onde ultrasonore avec le cartilage et de déterminer l'influence des constituants biochimiques sur la propagation de l'onde ultrasonore.

CHAPITRE III : ETUDE DE L'INTERACTION

ULTRASONS/CARTILAGE DANS LE CADRE DE LA MATURATION

INTRODUCTION

Lors de travaux antérieurs effectués au Laboratoire d'Imagerie Paramétrique sur un modèle d'arthrose [Saïed, 1997; Cherin, 1998], il a été montré que les modifications induites par la pathologie au sein du cartilage entraînent des variations importantes des paramètres acoustiques à savoir les coefficients intégraux de réflexion et de rétrodiffusion. Nous avons entrepris ce travail dans le but de comprendre l'influence respective exercée par les principaux constituants du cartilage (chondrocyte, collagène et protéoglycane) sur la propagation acoustique et les paramètres acoustiques. Dans un premier temps, nous avons effectué des mesures à différents stades de la maturation du cartilage, processus naturel qui s'accompagne de modifications de composition et de structure de la matrice. Les paramètres biochimiques et histologiques ont été contrôlés aux différents stades de la maturation auxquels les propriétés acoustiques ont été mesurées.

A. PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET METHODES

1. Animaux

Dans le cadre de l'étude ont été étudiés 25 rats mâles de race Wistar répartis en 3 groupes d'âges différents. Les rats ont été sacrifiés aux âges immatures de 4 semaines (8 rats) et matures de 10 semaines (8 rats) et de 16 semaines (9 rats). Ces âges correspondent respectivement à des poids de 100 g, 300 g et 450g. Les rotules sont disséquées pour être placées quelques minutes après dans un bain de sérum physiologique à 0,9 % à température ambiante pour l'exploration ultrasonore du cartilage. Pour éviter des biais dus à une modification tissulaire, l'étude échographique est effectuée dans les 48 heures suivant le sacrifice. Avant la dissection, les rotules sont conservées à 4°C. Les rotules sont ensuite fixées dans une solution de formol pendant 48 heures, décalcifiées dans une solution d'EDTA à 10 % et placées ensuite dans un bloc de paraffine en vue de l'analyse histologique.

2. Etude ultrasonore

a. Acquisition des données

Le système d'acquisition et le transducteur utilisés sont décrits dans le chapitre précédent. Seule la rotule droite de ces rats est examinée par ultrasons, car une étude antérieure [Cherin, 1998] a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre les rotules gauche et droite

d'un même rat au point de vue échographique. En ce qui concerne le coefficient intégral de réflexion, la différence moyenne entre les deux genoux est de 0,1 dB seulement ($p > 0,05$) et correspond à une variation de 0,5 % pour un CIR de l'ordre de - 20 dB. Pour le coefficient intégral de rétrodiffusion, la même étude indique une différence moyenne entre les deux genoux de 0,6 dB ($p > 0,05$) et correspond à une variation de l'ordre de 1,2-1,5 % pour des CIR variant de - 40 dB à - 50 dB. Dans notre étude, le plan focal de la sonde est situé légèrement en dessous de la surface du cartilage. Le tir ultrasonore est perpendiculaire à la surface articulaire au centre de la rotule et balaie la rotule selon les deux axes horizontaux du système moteur avec un pas de déplacement de 40 μm . Le système d'acquisition enregistre tout le signal provenant du cartilage, de la surface articulaire à l'os sous-chondral. Pour corriger les paramètres acoustiques de la diffraction et de la fonction de transfert du système, des signaux de référence sont acquis en déplaçant dans le champ acoustique (le long de l'axe z) une plaque d'acier, considérée comme un miroir acoustique parfait.

b. Traitement du signal échographique radio-fréquence

A partir de l'enveloppe du signal sont construites des images échographiques dites B-scans qui représentent en coupe le cartilage selon le plan sagittal.

Dans l'analyse quantitative sont étudiées la réflexion de la surface articulaire et la rétrodiffusion apparente de la matrice interne dont les méthodes d'évaluation sont décrites dans le chapitre précédent.

(1) Coefficient intégral de Réflexion

Afin de séparer le signal réfléchi par la surface du cartilage du signal rétrodiffusé par les structures de la matrice interne, la largeur de la fenêtre de calcul correspond à la durée du signal de référence qui est de 0,0525 μs (correspondant à 21 points d'échantillonnage à 400 MHz). La courbe de réflexion exprimée en dB en fonction de la fréquence est la différence spectrale moyenne $R_c^{\text{dB}}(f)$ corrigée de la diffraction et calculée sur un ensemble de 20 lignes échographiques d'une région d'intérêt (ROI) située au centre de la rotule, qui correspond à la zone la plus plane du cartilage et orientée perpendiculairement à l'axe de propagation des ultrasons. Cette ROI comprend respectivement 2×10 lignes échographiques dans les plans transverse et sagittal qui correspondent à une surface de $80 \times 400 \mu\text{m}^2$. A partir de cette courbe est évalué le coefficient intégral de réflexion CIR dans la bande passante 25 - 70 MHz, bande passante du spectre moyen du signal réfléchi par la surface articulaire.

(2) Coefficient intégral de Rétrodiffusion

La courbe de rétrodiffusion apparente exprimée en dB en fonction de la fréquence est une différence spectrale moyenne $\mu_c^{dB}(f)$ corrigée de la diffraction, calculée sur un ensemble de 120 lignes échographiques d'une ROI qui comprend 6×25 lignes. La fenêtre de calcul est de 42 points correspondant à deux fois la largeur d'un pulse et est située juste derrière l'écho de la surface articulaire. La rétrodiffusion est estimée ainsi dans un volume de $240 \times 1000 \times 84 \mu\text{m}^3$. A partir de la courbe de rétrodiffusion est évalué le coefficient intégral de rétrodiffusion apparent CIRD dans la bande passante 30 - 80 MHz, bande passante du spectre moyen du signal rétrodiffusé par la matrice interne dans la fenêtre de mesure.

3. Etudes histologique et biochimique

a. Histologie

Après fixation et décalcification, la rotule est placée dans un bloc de paraffine. Des sections sériées de $5 \mu\text{m}$ d'épaisseur sont coupées au centre de la rotule dans le plan sagittal. Pour l'appréciation des protéoglycanes, la moitié des coupes est colorée au bleu de toluidine. L'autre moitié est colorée au rouge picrosirius et observée en lumière normale pour évaluer le contenu en collagène, puis en lumière polarisée pour estimer l'orientation des fibres de collagène. La cellularité est visible par les deux types de coloration.

b. Biochimie

Parallèlement aux études échographique et histologique, des mesures biochimiques ont été réalisées sur 18 rats, chaque âge comportant 6 rats. Les paramètres étudiés sont les contenus en protéoglycane et en collagène mesurés sur l'ensemble de l'épaisseur du cartilage et exprimés en μg par mg de cartilage. Avant les études colorimétriques, le cartilage est disséqué, séché et pesé. Les concentrations sont exprimées en fonction du poids sec du cartilage.

L'évaluation du contenu en PG a été obtenue à l'aide de la méthode de Goldberg qui permet d'évaluer la quantité des glycosaminoglycanes sulfatés [Goldberg, 1980]. Le cartilage est digéré par la papaïne dans une solution tampon phosphate contenant de l'EDTA et du dithiothréitol. La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide monoiodoacétique et la solution est complétée par une solution de Tris/HCl. Pour la réaction métachromatique, la solution est complétée par le réactif DMB composé de bleu de diméthyl méthylène, de glycine et de

NaCL. L'absorbance de la solution est évaluée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 525 nm.

Pour l'évaluation du contenu en collagène, la méthode de Woessner a été utilisée [Woessner, 1961]. Elle consiste à mesurer la quantité d'hydroxyproline contenue dans le cartilage, élément spécifique du collagène. Le cartilage subit une hydrolyse acide. L'hydrolysate obtenu est neutralisé par une solution de NaOH. L'oxydation de l'hydroxyproline est déclenchée par l'ajout de chloramine T. Enfin, de l'acide aldéhyde perchlorique est ajouté pour révéler la présence du chromophore. L'absorbance est mesurée par le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 550 nm.

4. Tests statistiques

Afin de calculer la probabilité de différence significative entre les moyennes des différents groupes d'âge, nous avons utilisée l'analyse de variance de Kruskal-Wallis avec un seul facteur. Ce test permet de savoir si l'âge a un effet significatif sur le paramètre étudié. Le test de comparaison multiple entre les différents groupes utilisé est le test de Kruskal-Wallis Z pour évaluer la différence significative entre les groupes pris deux à deux. Le niveau de significativité α des tests est 0,05.

B. RESULTATS ACOUSTIQUES

Seront présentés successivement les observations déduites des images échographiques (Figure 1) et les résultats concernant les paramètres de réflexion et de rétrodiffusion (Figures 4 et 7).

1. Images échographiques

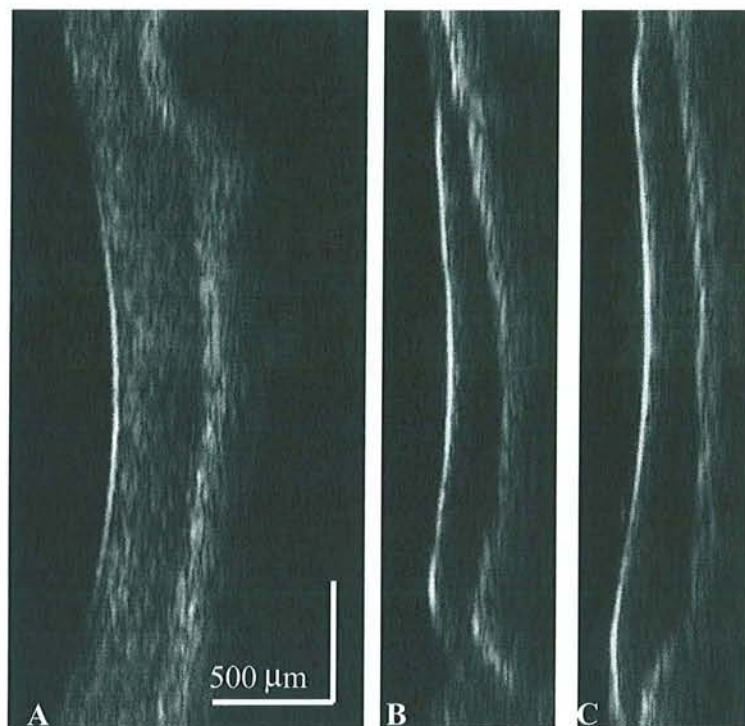


Figure 1 : images échographiques du cartilage rotulien de rats âgés de 4 semaines (A), 10 semaines (B) et 16 semaines (C). Les deux bandes échogènes correspondent à la surface à l'interface cartilage –os. Entre ces deux bandes, l'échogénicité interne diminue au cours de la maturation. Le cartilage immature (A) est échogène dans les 2/3 proches de la surface. Le cartilage mature (B, C) ne présente plus d'échogénicité globalement.

Sur les images échographiques présentées ci-dessus, l'axe horizontal est l'axe de propagation des ultrasons et l'axe vertical correspond à l'axe de balayage du transducteur. Ainsi qu'il a été décrit dans le premier chapitre, le cartilage rotulien sain apparaît sur l'image échographique sous la forme d'une bande peu échogène encadrée par deux interfaces très échogènes. Ces interfaces sont dues à la rupture d'impédance au niveau de la surface articulaire à gauche et au niveau de la limite entre le cartilage et l'os sous-chondral à droite. La distance entre les deux interfaces correspond à l'épaisseur du cartilage. Une étude précédente réalisée au sein du Laboratoire d'Imagerie Paramétrique [Cherin, 1998] a montré que l'épaisseur mesurée en échographie est corrélée de façon hautement significative à l'épaisseur mesurée en histologie ($R = 0.89$, $p < 10^{-4}$). Cette épaisseur diminue entre la quatrième et la dixième semaines mais semble ne plus évoluer entre la dixième et la seizième.

La surface articulaire (interface de gauche) semble ne pas changer au cours du temps aussi bien pour son échogénicité que pour sa largeur. En revanche, l'échogénicité est plus faible aux

extrémités du cartilage qu'au centre en raison de la courbure du tissu par rapport à l'axe du faisceau ultrasonore qui effectue un balayage linéaire.

Par contre, l'interface os/cartilage évolue au cours de la maturation. Il semble que sa largeur diminue et que son échogénicité augmente entre la 4^{ème} et la 16^{ème} semaine.

L'intérieur du cartilage évolue de façon plus significative. La plupart des images des cartilages immatures présente un aspect bilaminaire. Une première zone, située juste derrière la surface articulaire et représentant entre la moitié et les trois quarts de l'épaisseur du cartilage, est la plus échogène des deux couches. La deuxième couche située près de l'os sous-chondral est moins échogène. Au cours de la maturation, l'aspect bilaminaire tend à disparaître et la couche hyperéchogène située sous la surface n'est plus observée chez le rat mature. On peut néanmoins observer chez le rat mature juste derrière l'écho d'interface une très fine couche échogène qui semble différente de l'écho d'interface.

2. Résultats quantitatifs

Dans l'ordre sont présentés les résultats sur la réflexion suivis de ceux sur la rétrodiffusion. Pour chacun des deux paramètres CIR et CIRD sont présentées les valeurs moyennes et écarts types en fonction de l'âge. Les trois paramètres sont calculés à partir des signaux délimités par les fenêtres représentées par des rectangles dans la figure suivante (Figure 2).

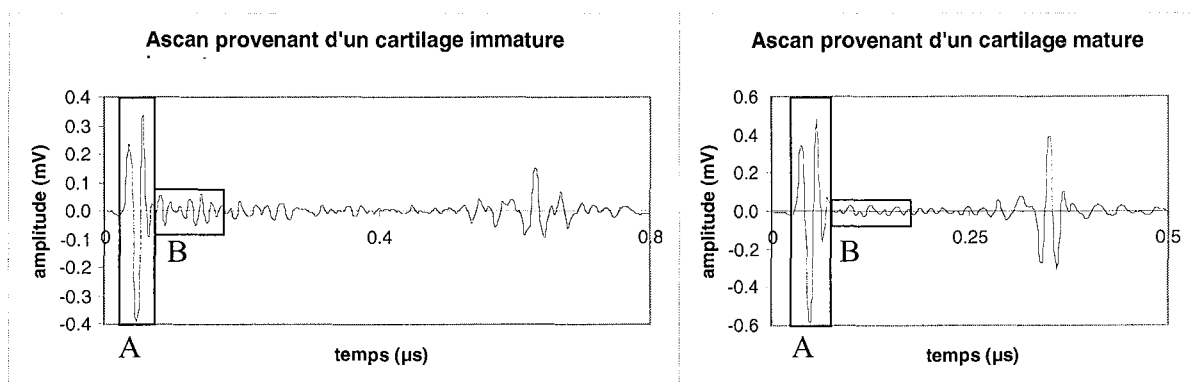


Figure 2 : lignes échographiques provenant de cartilage immature (à gauche) et mature (à droite). Pour les deux lignes, les rectangles délimitent les zones de mesures du CIR (A) et du CIRD (B).

a. Réflexion de la surface articulaire

Pour chaque stade de la maturation, les courbes moyennes de réflexion de chaque cartilage ne présentent pas de variations selon la fréquence (Figure 3). Cette absence de variation est en accord avec la théorie de la réflexion des ondes acoustiques sur une interface plane dont la surface est grande devant la longueur d'onde. C'est pourquoi, nous nous sommes essentiellement intéressés à la variation du coefficient intégral de réflexion CIR en fonction de l'âge (Figure 4).

Sur le graphe suivant est présentée la courbe de réflexion moyenne sur l'ensemble des rats en fonction de la fréquence (*moy*) encadrée par deux courbes qui correspondent à la moyenne $\pm$ écart type (*moy-ec*, *moy+ec*) (Figure 3).

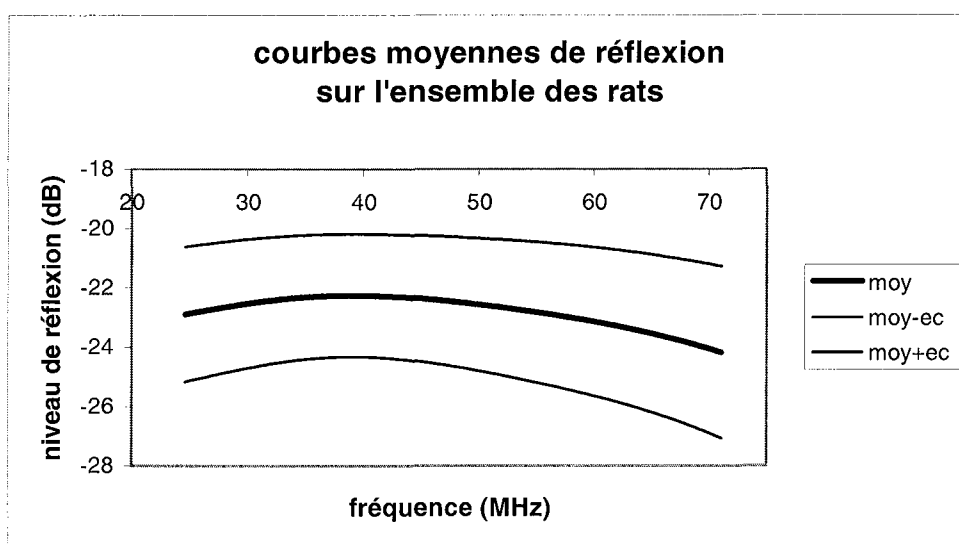


Figure 3 : courbes de réflexion (moyenne, moyenne $\pm$ écart type) en fonction de la fréquence sur l'ensemble des rats

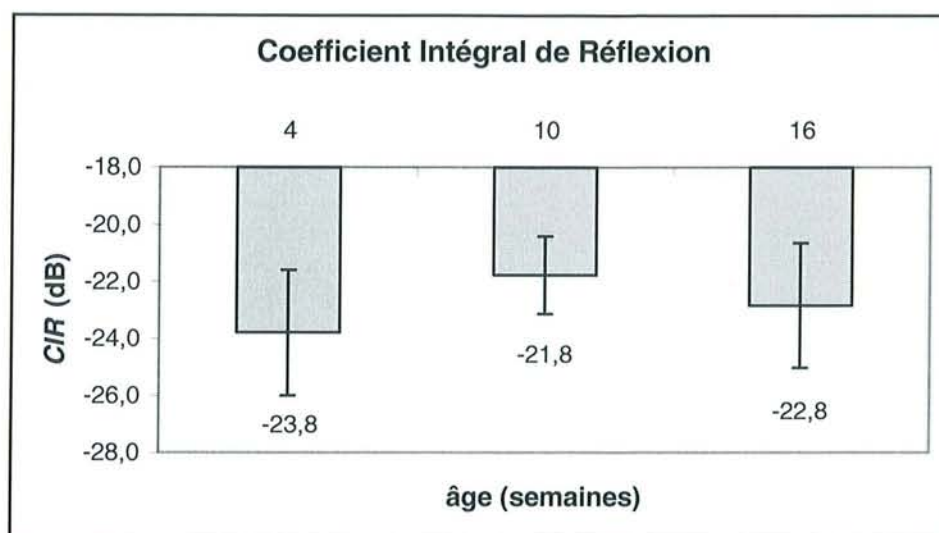


Figure 4 : Variation du coefficient intégral de réflexion CIR avec l'âge ($p > 0,05$).

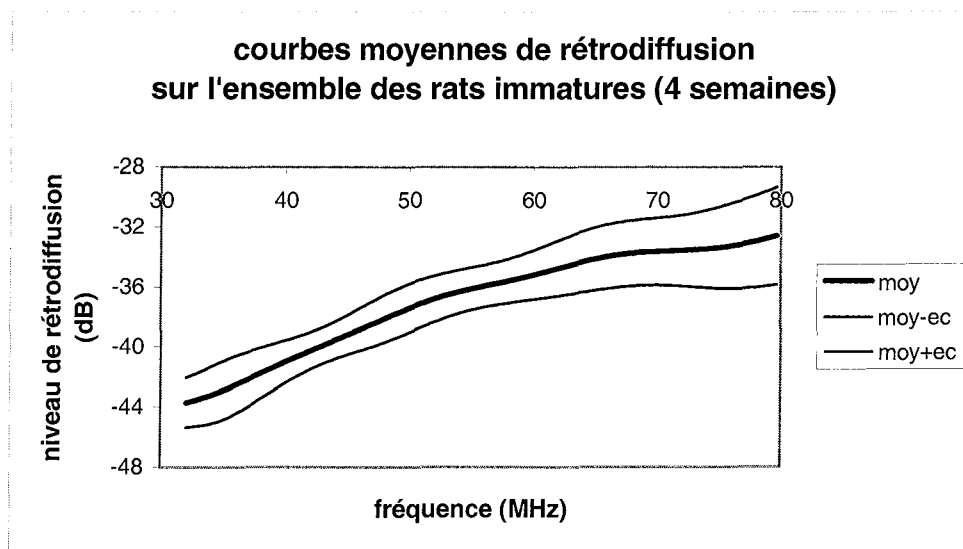
Les barres d'erreur représentent l'écart type du CIR pour chaque âge

Les valeurs individuelles du coefficient intégral de réflexion sont comprises entre - 19,9 dB et - 27,2 dB. Les valeurs moyennes se situent entre - 21,8 dB et - 23,8 dB avec des écarts types allant de 1,4 dB à 2,2 dB. L'analyse de la variance montre que l'âge n'a pas d'effet significatif sur le CIR ($p > 0,05$). Aucun groupe n'est différent des deux autres (Figure 4).

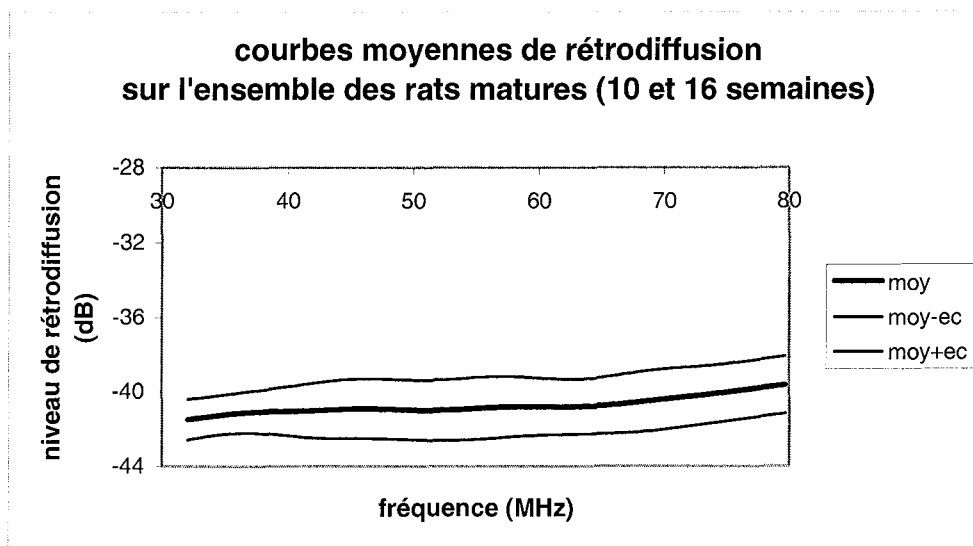
b. Rétrodiffusion de la matrice interne

Pour les deux groupes de rats matures, les courbes moyennes de rétrodiffusion de chaque cartilage selon la fréquence présentent des variations qui semblent négligeables (Figures 6). Pour l'âge immature, ces courbes moyennes de rétrodiffusion présentent une forte croissance en fonction de la fréquence (Figure 5). Cette augmentation demeure une exception par rapport à nos autres expériences et est inexpliquée jusqu'à maintenant. C'est pourquoi, nous nous sommes essentiellement intéressés à la variation du coefficient intégral de rétrodiffusion CIRD en fonction de l'âge (Figure 7).

Sur deux graphes séparés sont présentées les courbes de rétrodiffusion moyenne respectivement sur l'ensemble des rats immatures (4 semaines) et sur l'ensemble des rats matures (10 et 16 semaines) en fonction de la fréquence (*moy*). Chacune des deux courbes est encadrée par deux courbes qui correspondent à la moyenne $\pm$ écart type (*moy-ec*, *moy+ec*) (Figures 5 et 6).



**Figure 5 : courbes de rétrodiffusion (moyenne, moyenne $\pm$ écart type)
en fonction de la fréquence pour les rats âgés de 4 semaines (stade immature)**



**Figure 6 : courbes de rétrodiffusion (moyenne, moyenne $\pm$ écart type)
en fonction de la fréquence pour les rats âgés de 10 et 16 semaines (stades matures)**

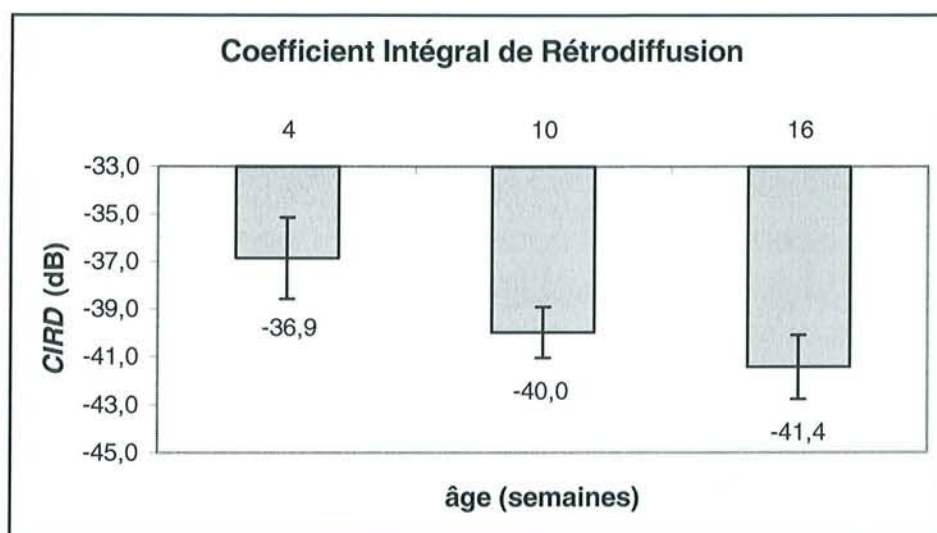


Figure 7 : Variation du coefficient intégral de rétrodiffusion CIRD avec l'âge ($p < 0,01$).

Les barres d'erreur représentent l'écart type du CIRD pour chaque âge.

Les valeurs individuelles du coefficient intégral de rétrodiffusion sont comprises entre - 33,8 dB et - 43,5 dB. Les valeurs moyennes se situent entre - 36,9 dB et - 41,4 dB avec des écarts types allant de 1,1 dB à 1,7 dB. L'analyse de la variance indique que la maturation a un effet significatif sur le CIRD ($p < 0,01$) et la comparaison des groupes d'âge pris deux à deux montre que le groupe des rats âgés de 4 semaines est distinct des deux autres. Les valeurs moyennes et écarts types des états immatures (4 semaines) et matures (10 et 16 semaines) sont respectivement de $- 36,9 \pm 1,7$ dB et de $- 40,7 \pm 1,4$ dB (Figure 7).

3. Résultats histologiques et biochimiques

Dans un premier temps, nous décrivons les observations déduites des images des coupes histologiques colorées au bleu de toluidine et au rouge picrosirius observées en lumière normale et polarisée. Ensuite, seront présentés les résultats biochimiques sur l'évaluation des contenus en PG et en collagène.

a. Images histologiques

Pour chaque âge sont présentées les coupes histologiques colorées au bleu de toluidine à gauche et au rouge sirius au centre et à droite. L'image de droite est obtenue en lumière polarisée. Le rectangle blanc délimite la zone de mesure de la rétrodiffusion (Figures 8, 9 et 10).

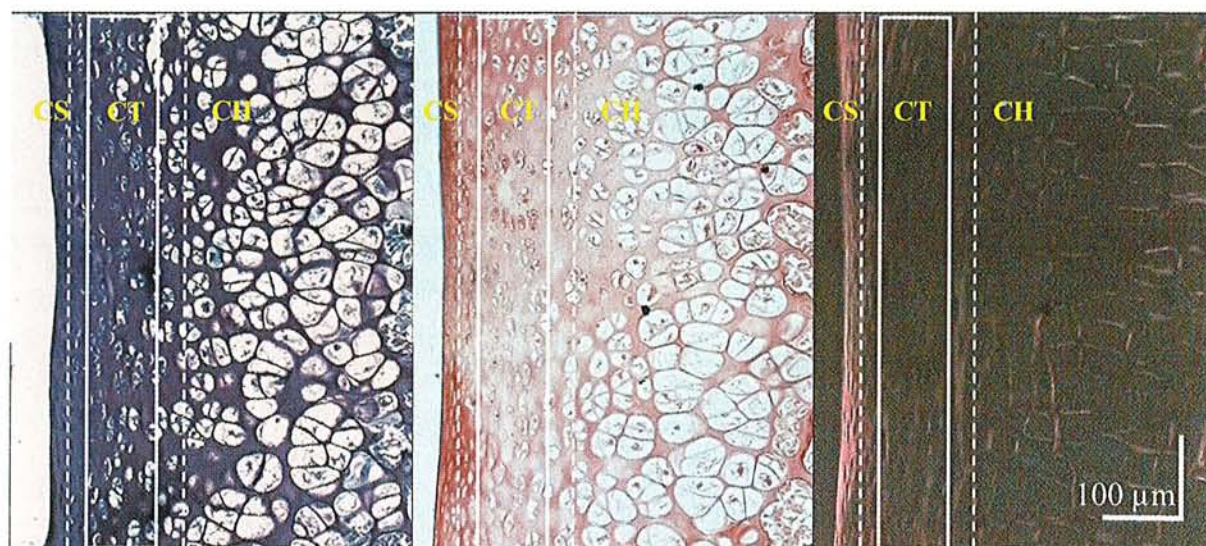


Figure 8 : images de coupes histologiques d'un rat âgé de 4 semaines

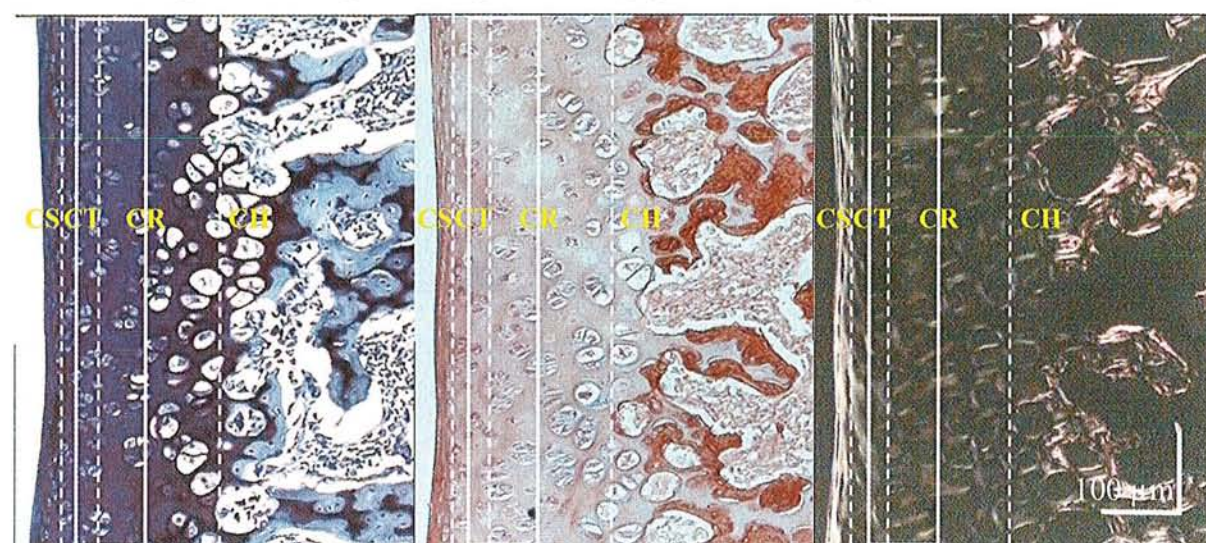


Figure 9 : images de coupes histologiques d'un rat âgé de 10 semaines

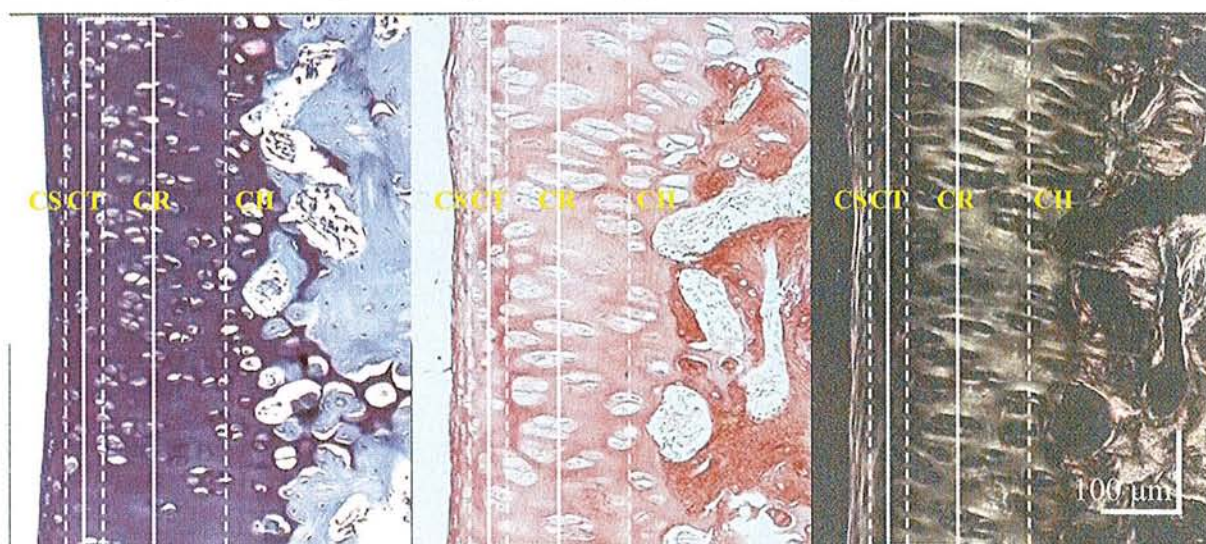


Figure 10 : images de coupes histologiques d'un rat âgé de 16 semaines

Sur les images histologiques, on peut observer une diminution de l'épaisseur du cartilage en fonction de l'âge. Le cartilage immature (âgé de 4 semaines) est épais de 390 μm et est sensiblement divisé en trois couches :

- La couche superficielle (**CS**) ou tangentielle représente approximativement 5 % de l'épaisseur du cartilage (20 μm). Sur l'image en lumière polarisée, les fibres de collagène apparaissent vertes et sont parallèles à la surface. L'image colorée au bleu de toluidine montre des cellules orientées parallèlement à la surface et de forme elliptique dont la taille varie approximativement de 5 à 10 μm .
- La couche transitionnelle (**CT**) ou alvéolaire représente 35 % de l'épaisseur du cartilage (140 μm). Les fibres apparaissent en vert et ont une organisation dite en forme de maille de filet ou alvéolaire avec une direction privilégiée parallèle à la surface. Les cellules ont une forme circulaire dont le diamètre est de l'ordre de 10-15 μm et ont une répartition aléatoire.
- la couche hypertrophique (**CH**) représente la majeure partie de l'épaisseur du cartilage (de l'ordre de 60 %, 230 μm). Les cellules sont de forme circulaire d'un diamètre de l'ordre de 30 μm constituant 3 à 4 rangées dans le sens de l'épaisseur de la couche. Entre les rangées de cellules, des fibres d'apparence verte en lumière polarisée ont une orientation globalement perpendiculaire à la surface et un diamètre moyen de 4 μm environ.

La limite entre le cartilage et l'os sous-chondral est difficile à déterminer car elle se révèle être un mélange de cellules, d'os et de moelle osseuse.

En fonction de la profondeur,

- Le contenu en PG a tendance à augmenter (augmentation de la coloration du bleu de toluidine).
- Le contenu en collagène est plus important en surface que dans le reste du cartilage (diminution de la coloration du rouge sirius).
- Les fibres de collagène passent d'une orientation parallèle à la surface à une orientation perpendiculaire.
- La taille des cellules et le volume occupé par celles-ci augmentent.
- La part relative de la matrice extracellulaire diminue.

A l'âge mature (à partir de 10 semaines), le cartilage dont l'épaisseur moyenne est d'environ 225 μm se divise en quatre couches comme il a été décrit dans le premier chapitre d'après Hunziker (10) :

- La couche superficielle (**CS**) reste inchangée par rapport à celle du cartilage immature.
- La couche transitionnelle (**CT**) ou aléatoire, représentant 20 % de l'épaisseur du cartilage (45 μm) apparaît en noir à cause de l'absence de biréfringence du collagène. En effet, les fibres se présentant sous la forme d'arches dans cette zone ont une direction privilégiée à 45° par rapport à la surface et à l'axe de profondeur du cartilage, axes des deux filtres de polarisation et sont donc invisibles en lumière polarisée.
- La couche radiale (**CR**) représente près de 65 % de l'épaisseur du cartilage (150 μm). Elle contient des cellules principalement orientées perpendiculairement à la surface dont les dimensions sont 30 μm et 50 μm . En lumière polarisée, les fibres de collagène entourent les amas de cellules et apparaissent en vert plus intense indiquant une densité élevée et un épaississement des faisceaux de fibres par rapport à la polarisation des fibres chez le rat immature. L'orientation des fibres est perpendiculaire à la surface articulaire et le diamètre des faisceaux des fibres est environ de 13 μm en moyenne.
- La couche hypertrophique (**CH**) ne représente plus que 10 % de l'épaisseur du cartilage (25 μm). Elle est caractérisée par une seule rangée de cellules hypertrophiques.

La limite entre le cartilage et l'os sous-chondral est beaucoup plus nette qu'au stade immature. Du côté de la jonction cartilage os, l'os sous chondral ou compact est prépondérant par rapport à la moelle.

En fonction de la profondeur :

- Le contenu en PG a également tendance à augmenter (augmentation de l'intensité de la couleur du bleu de toluidine).
- Le contenu en collagène est plus important en surface que dans le reste du cartilage (diminution de la coloration du rouge sirius).
- Entre la surface et la couche transitionnelle, le changement d'orientation des fibres de collagène s'effectue plus brutalement d'une orientation parallèle à perpendiculaire à la surface.
- La taille des cellules augmente comme dans le cartilage immature.
- Le volume occupé par les cellules semble constant, à part dans la zone hypertrophique où il est plus important.

- Le volume de la matrice extracellulaire semble constant, à part dans la couche hypertrophique où il est plus faible.

Les couleurs des images histologiques prises en lumière normale nous renseignent sur les variations globales des contenus en PG et en collagène du cartilage entre les âges immature (4 semaines) et mature (10 et 16 semaines). En effet, les colorants n'apprécient qu'approximativement la concentration des constituants matriciels du cartilage. Cependant, l'histologie permet d'affirmer qu'il n'existe pas de variation brutale des constituants matriciels de la surface à la profondeur.

Peu de différences sont à relever entre les rats âgés de 10 et 16 semaines :

- le contenu en PG continue à décroître.
- le contenu en collagène continue à augmenter.
- les faisceaux de fibres de la couche radiale s'épaississent entre les deux âges et la polarisation de cette couche s'intensifie.
- les cellules de la couche radiale sont assemblées en amas de 3 à 4 unités et sont alignées perpendiculairement à la surface.

b. Résultats biochimiques

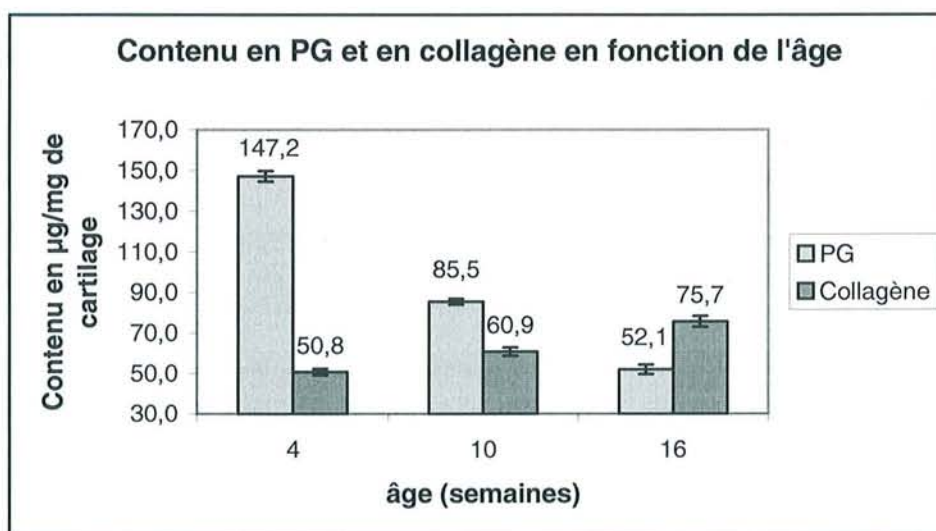


Figure 11 : Variation des contenus en PG ($p < 0,01$) et en collagène ($p < 0,01$) mesurés sur l'ensemble du cartilage en fonction de l'âge. Les barres d'erreur représentent l'écart type des contenus en PG et en collagène pour chaque âge.

L'ANOVA indique que la maturation a un effet significatif sur les contenus en collagène ($p < 0,01$) et en PG ($p < 0,01$) et la comparaison des groupes d'âge pris deux à deux montre que les trois groupes sont différents les uns des autres. Le contenu en PG décroît en fonction de l'âge de $147 \mu\text{g}/\text{mg}$ à $52,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ (65 %) alors que le contenu en collagène croît en fonction de l'âge de $51 \mu\text{g}/\text{mg}$ à $76 \mu\text{g}/\text{mg}$ (49 %) (Figure 11).

C. DISCUSSION

Au point de vue qualitatif, il existe une bonne corrélation entre les images échographiques et les images de coupes histologiques, notamment pour ce qui concerne la diminution de l'épaisseur du cartilage, le maintien de l'aspect régulier de la surface articulaire et l'aspect de l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral au cours de la maturation.

Par ailleurs, un aspect bilaminaire aperçu sur la plupart des images échographiques de cartilage immature peut correspondre aux couches observées en histologie. L'épaisseur des couches échographiques diffère de celle des couches histologiques. Cette différence peut être due à des traitements subis par le tissu pour l'analyse histologique et probablement aussi du fait que la célérité des ultrasons peut varier selon les couches. De plus, la résolution axiale de la sonde (de l'ordre de $25 \mu\text{m}$) ne permet pas de distinguer la couche superficielle sur les images échographiques. La première couche hyperéchogène observée derrière la surface et la deuxième couche hypoéchogène située près de l'os sous-chondral semblent correspondre, aux épaisseurs près, respectivement aux couches transitionnelle et profonde observée sur les coupes histologiques.

En ce qui concerne le cartilage mature, une très fine bande échogène dont l'épaisseur moyenne est environ $35 \mu\text{m}$ apparaît juste derrière l'écho de surface et semble correspondre à la couche aléatoire. Le reste du cartilage qui est hypoéchogène correspond aux deux couches radiale et hypertrophique observées sur les coupes histologiques. Ces deux dernières couches ne sont pas distinctes sur les B-scan. Cette absence de distinction peut sans doute s'expliquer par l'absence de modification de l'orientation générale des fibres de collagène dans les deux couches si cette orientation a une influence prépondérante sur le signal ultrasonore.

Le cartilage mature présente une interface cartilage/os sous-chondral plus fine, plus échogène et par conséquent mieux délimitée que celle du cartilage immature. Les images histologiques montrent que ces modifications d'échostructure sont sans doute dues au changement de la composition de l'interface. Dans le cartilage immature, cette interface est

irrégulière, hétérogène et constituée d'un mélange de moelle, d'os, et de cellules du cartilage. Avec la maturation, cette interface devient plus régulière et plus riche en os.

Le coefficient intégral de réflexion ne varie pas au cours de la maturation. Ceci s'explique par l'absence de modifications de la surface articulaire et de la couche superficielle sur les images histologiques des cartilages immature et mature.

La variation avec l'âge du paramètre de la rétrodiffusion CIRD représente un résultat important de cette étude. Dans la zone de mesure de la rétrodiffusion, les images colorées au bleu de toluidine montrent qu'au cours de la maturation la densité cellulaire décroît faiblement, la taille et l'organisation des cellules changent ainsi que le contenu en PG diminue (diminution de l'intensité de la coloration). Les images en lumière polarisée montrent un changement important de l'orientation des fibres et une augmentation de la densité et du diamètre des fibres au cours de la maturation. En parallèle de ces observations qualitatives, les mesures biochimiques évaluées sur l'ensemble du cartilage montrent que le contenu en collagène augmente et celui en PG diminue de façon significative.

A notre connaissance, l'influence des cellules sur l'onde ultrasonore dans le domaine des hautes fréquences n'est pas élucidée. Dans notre étude, les chondrocytes (10-30 μm de diamètre) peuvent contribuer au changement de la propagation de l'onde ultrasonore, mais ne sont probablement pas responsables des variations significatives de la rétrodiffusion. En effet, une étude récente à 50 MHz sur le myocarde de porc (dont les myocytes ont un diamètre du même ordre de grandeur que celui des chondrocytes) a montré que la matrice extracellulaire constituée de collagène a une contribution prépondérante dans la rétrodiffusion par rapport aux cellules [Hall, 2000].

Les mesures biochimiques montrent que le contenu en PG diminue alors que celui du collagène augmente. Ces deux composants du cartilage contribuent à la modification du signal ultrasonore, notamment, la diminution de l'énergie rétrodiffusée pourrait être due à la diminution du contenu en PG.

Le collagène contribue aux changements de l'énergie rétrodiffusée. Cependant, la variation du CIRD au cours de la maturation ne semble pas s'expliquer par la variation globale du contenu en constituant, mais plutôt par le changement local de l'orientation des fibres de collagène dans la zone de mesure. En effet, le CIRD est plus faible lorsque l'onde ultrasonore se propage dans une ROI où les fibres sont obliques et parallèles à l'axe ultrasonore que dans

le cas où elle se propage perpendiculairement aux fibres. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par d'autres groupes, à basse fréquence, dans le myocarde [O'donnell, 1981] et le muscle bovin [Roberjot, 1994].

La faible variation de la courbe de rétrodiffusion apparente en fonction de la fréquence pourrait s'expliquer par le fait que la bande passante du signal correspond à la zone de fréquence où le produit ka est supérieur à 1 avec k le nombre d'onde et a la taille caractéristique des diffuseurs. Comme la bande passante s'étend de 30 MHz à 80 MHz, la taille caractéristique a est comprise entre 3,2 μm et 8,5 μm pour ka égal à 1. Or, ces valeurs sont proches de celles des diamètres des faisceaux de fibres observées en microscopie électronique qui sont de l'ordre de la dizaine de microns [Clark, 1985]. Ainsi, la faible variation de la courbe de rétrodiffusion s'explique dans le cadre de l'hypothèse où le collagène a une part prépondérante dans l'origine de la rétrodiffusion de l'onde ultrasonore.

CONCLUSION

Nos résultats ont confirmé que l'on peut relier les variations de la rétrodiffusion apparente aux modifications structurales et biochimiques du cartilage. Le contenu en PG et le CIRD variant dans le même sens, le signal ultrasonore rétrodiffusé pourrait être influencé par le contenu en protéoglycanes. Par ailleurs, nos résultats sont en accord avec des études rapportées par d'autres groupes et montrent que le changement de l'orientation des fibres de collagène par rapport à la direction de propagation de l'onde ultrasonore semble contribuer d'une façon prépondérante aux variations du CIRD.

L'estimation de la rétrodiffusion apparente dans le cas de dégradations sélectives des différents constituants biochimiques du cartilage et la mesure locale au sein du cartilage et au cours de la maturation d'autres paramètres acoustiques tels que l'atténuation et la célérité des ultrasons devraient nous éclairer notamment quant à la contribution des contenus en collagène et en PG dans la propagation des ultrasons à haute fréquence dans le cartilage. Ces études feront l'objet des chapitres suivants.

L'étude de la maturation a fait l'objet d'une publication présentée à la suite du chapitre.

Osteoarthritis and Cartilage

Journal of the Osteoarthritis Research Society International



Assessment of rat articular cartilage maturation using 50-MHz quantitative ultrasonography

E. Chérin*, A. Saïed*, B. Pellaumail*, D. Loeuille†, P. Laugier*, P. Gillett†, P. Netter† and G. Berger*

*Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, Université Paris VI, CNRS UMR 7623 Faculté de Médecine Broussais, Hôtel-Dieu 15, rue de l'Ecole de Médecine 75006 Paris, France

†Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie articulaire UMR 7561, CNRS-UHP Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France

Summary

Objective: The objective was to assess the relationship between maturation-related structural changes of articular cartilage and variations of acoustic parameters estimated using high frequency ultrasonography.

Design: Patellae taken from 48 immature Wistar male rats and divided into six age groups (from five to 11 weeks old) were explored *in vitro* using 50-MHz scanning acoustic microscopy, then assessed by histology for the analysis of the cartilage cell distribution and fibrillar collagen organization. The variation of cartilage proteoglycan and collagen content with age was evaluated. Thickness measurements performed on both B-scan images and histologic sections were compared. Ultrasonic radiofrequency signals reflected by the cartilage surface and backscattered from its internal matrix were processed to estimate the integrated reflection coefficient (IRC) and apparent integrated backscatter (AIB).

Results: One-way ANOVA indicated that acoustic parameters and thickness change significantly ($P < 0.05$) as the animal matures because of age-related changes in cartilage composition and morphology. A moderate correlation was found between IRC and the animal age. The parameter decreased slightly but significantly over time. However, a good correlation was observed between the rat age and the AIB, which decreased significantly over time. The parameter variation was mostly related to the changes in collagen fiber orientation, and/or to a change in cell size, density and organization.

Conclusions: Current results indicate that acoustic properties of cartilage are affected by maturation-related cartilage changes. This suggests that high frequency ultrasonography may serve as a useful means for the investigation of cartilage matrix structural changes occurring under various clinical circumstances, like those observed during osteoarthritis, and for the evaluation of the efficacy of specific therapeutics.

© 2001 Osteoarthritis Research Society International

Key words: Cartilage, Maturation, High frequency Ultrasonography, Tissue characterization.

Introduction

During progression of osteoarthritis (OA), the common degenerative modifications observed in cartilage are a fibrillation of its superficial layer, changes in organization and activity of the chondrocytes, changes in water and proteoglycan content, and a disruption of cross-links between the collagen fibers^{1–3}. All these phenomena take part in a remodeling of the cartilage and can induce variations of the tissue thickness.

The diagnosis of OA is delayed because its initial phase activity is clinically silent. Furthermore, current clinical non-invasive imaging modalities, such as radiography (X-ray),

computed tomography (CT) and conventional echography (5–10 MHz) allow the detection of only severe cartilage lesions that characterize the late stages of OA. Difficulties in this field are partly related to the constraints of image resolution. An enhanced spatial resolution is required to detect early lesions and follow their evolution in time. Using magnetic resonance imaging (MRI), these resolution challenges can be addressed in part by the use of higher performance gradients that are becoming available from the equipment and permit thinner sections and smaller field of view. Clinical studies have demonstrated that MRI allows a direct evaluation of the patellar cartilage from its surface to its deepest zones and the detection of severe focal chondral lesions with a spatial resolution of $470 \times 625 \mu\text{m}^2$ and slice thickness varying between 2 and 3 mm^{4–6}. Higher MRI sensitivity can be obtained by the use of advanced imaging sequences that can provide specific information about the molecular structure in general. However, the accuracy of these techniques for detecting early structural abnormalities of the cartilage still remains controversial⁷.

In ultrasonography, higher spatial resolution is reached by increasing the frequency of the imaging system. In a previous study⁸, our group reported that high-frequency (50 MHz) scanning acoustic microscope (SAM) could be used to investigate cartilage structural changes at various

Received 18 October 1999; accepted 27 July 2000.

Supported in part by PHRC grants (Projets Hospitaliers de Recherche Clinique) No. 9937 and No. 9867, and grants from the MENRT (Ministère français de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie) and the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique): GDR 1210 (Groupement de Recherche: os, cartilage, tendons: Méthodes physiques innovantes d'imagerie et de caractérisation).

Address correspondence to: Amana Saïed, Laboratoire d'Imagerie Paramétrique CNRS UMR 7623, 15, rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France. Tel: (33) 1 44-41-49-68; Fax: (33) 1 46-33-56-73; E-mail: Amana.Saied@lip.bhdc.jussieu.fr

stages of a chemically induced OA in rat knees. The 30- μm axial resolution of the SAM allowed the *in-vitro* visualization of the early and progressive lesions involving both the surface and internal matrix of the cartilage. Furthermore, we have shown that quantitative ultrasound parameters such as the integrated reflection coefficient (IRC, a quantitative index of the acoustic energy level reflected from the surface of the cartilage) and apparent integrated backscatter (AIB, a quantitative index of the level of acoustic energy backscattered from the cartilage internal structure) could reflect the overall structural and biochemical composition of cartilage matrix and their variations caused by the disease⁹. However, for the successful clinical application of high frequency ultrasonography to the assessment of the cartilage integrity, it is necessary to establish the relationship between the changes of this complex tissue and variations of acoustical parameters.

The goal of the present work was to determine more precisely the components of the cartilage, which are involved in the variations of acoustical parameters. For this purpose, acoustic parameters were measured during the maturation of the cartilage, which is a reproducible and well-described model of cartilage changes¹⁰, and correlated to qualitative analysis of histologic images and quantitative evaluation of biochemical constituents of the tissue. To the best of our knowledge, there is no report on the relationship between the variations of ultrasound parameters and age-related progressive changes of the cartilage occurring in the early maturation period.

Animals and method

ANIMALS

One set ($N=48$) of immature male Wistar rats, approximately 5 weeks old, was studied. These animals were divided into six groups, which were sacrificed when the animals were 5, 6, 7, 8, 10 or 11 weeks old (approximately 200 g, 250 g, 300 g, 350 g, 400 g and 450 g in weight, respectively). The rats were anesthetized and killed by cervical dislocation. Patellae were dissected within minutes of the sacrifice. They were mounted on a special holder and placed in degassed saline (0.9%) at room temperature for ultrasound (US) data acquisition. After the scanning, patellae were fixed in formaldehyde solution for tissue preparation and histomorphological analysis. Only right patellae were examined by ultrasound in this study. Institutional guidelines and legal requirements for laboratory procedures and use of animals were adhered to at all times.

ULTRASONIC MEASUREMENTS

Acquisition system

A scanning acoustical microscope (SAM) was used for US examination of the patellar cartilage (Fig. 1). This microscope operated with a PVDF focused transducer (Krautkramer Foertser Co Ltd, Tokyo, Japan) that had an 80-MHz resonant frequency (7.5 mm focal length, F ; 3 mm diameter, d). A pulser-receiver (Panametrics Inc, Waltham, MA; Model 5900 PR) excited the transducer to generate a wide bandwidth pulse. The spectrum of the pulse reflected by a steel plate located in the focal plane had a center frequency of 53 MHz. At the focus, the -6 dB axial and lateral resolutions were 30 and 80 μm , respectively, and the

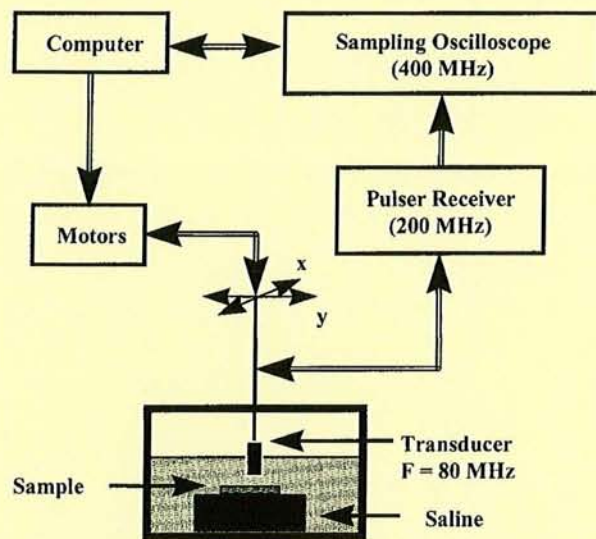


Fig. 1. Block diagram of the Scanning Acoustic Microscope.

experimental -3 dB depth of field was approximately 1.2 mm. The signal backscattered from the tissue was amplified by the receiver and digitized at 400 MHz by an eight-bit digital oscilloscope (LeCroy Co, NY, U.S.A.; Model 9450A). Then, the signal was transferred to a personal computer (PC) for B-scan US images visualization and data processing. A high precision stepping motor system (Micro Controle Newport, Evry, France), which was controlled by the PC was used for the transducer displacements. The rat patellae were approximately 5 mm long (sagittal direction) by 2 mm wide (transverse direction). They were positioned at the focal zone in order that the cartilage was centered on the focus, with the cartilage surface oriented perpendicularly to the probe axis. The patellae were scanned with a displacement step of 40 μm along both the sagittal (long axis) and transverse directions to acquire three-dimensional information about the cartilage structure.

Estimation of acoustical parameters

The integrated reflection coefficient (IRC) and apparent integrated backscatter (AIB) were measured using a standard substitution method, which has already been extensively discussed in a previous paper⁹. For the sake of clarity, the main steps of this measurement technique, which eliminates the apparatus transfer functions, are briefly described below.

Integrated reflection coefficient. The 32 first samples of the signal reflected by the cartilage surface were selected using an 80-ns-duration Hamming window. The power spectrum $|S_c(f, z_0)|^2$ of the windowed signal was calculated and normalized to the power spectrum $|S_s(f, z_0)|^2$ of the signal reflected by a steel plate. The steel plate was positioned at the same distance z_0 from the transducer as the cartilage surface. The ratio of both spectra was averaged spatially over a region of interest (ROI) that was selected in the central part of the patella, where the cartilage surface was perpendicular to the direction of sound propagation. Then, the mean ratio was converted into dB and integrated over the -6 dB frequency bandwidth

Δf of $|S_c(f, z_0)|^2$ to estimate the integrated reflection coefficient. All calculations are summarized by the following equations:

$$R_c^{dB}(f) = 10 \log_{10} \left\langle \frac{|S_c(f, z_0)|^2}{|S_r(f, z_0)|^2} \right\rangle \quad (1)$$

where $R_c^{dB}(f)$ is the intensity reflection coefficient at the cartilage surface in dB, and $\langle \dots \rangle$ indicates the spatial average calculated over 45 A-lines corresponding to a ROI of 120 μm in the transverse direction by 600 μm in the sagittal direction. The integrated reflection coefficient is defined by the following integral equation:

$$IRC = \frac{1}{\Delta f} \int_{\Delta f} R_c^{dB}(f) df \quad (2)$$

where Δf corresponds to the frequency range of 30–75 MHz.

Apparent integrated backscatter. The signal backscattered from a volume dV of 100 μm thickness, which was located 32 μm beneath the cartilage surface, was selected using a 120-ns-duration Hamming window. Its power spectrum $|S_v(f, z_v)|^2$ was calculated and normalized to the power spectrum $|S_r(f, z_v)|^2$ of the signal reflected by a steel plate. The steel plate was positioned at the same distance z_v from the transducer as the center of the volume dV . The frequency dependence, in dB, of the apparent energy backscattered by the cartilage is equal to:

$$\mu^{dB}(f) = 10 \log_{10} \left\langle \frac{|S_v(f, z_v)|^2}{|S_r(f, z_v)|^2} \right\rangle \quad (3)$$

where $\langle \dots \rangle$ indicates the spatial average over 200 echographic A-scans corresponding to a ROI of 320 μm in the transversal direction by 1 mm in the sagittal direction, which was selected in the central region of each patella. The energy backscattered by the cartilage is given by:

$$AIB = \frac{1}{\Delta f} \int_{\Delta f} \mu^{dB}(f) df \quad (4)$$

where Δf is the frequency range from 35 to 70 MHz corresponding to the -6 dB frequency bandwidth of the backscattered signal from the cartilage internal matrix.

Estimation of cartilage thickness

Ultrasonic measurements of the mean cartilage thickness were performed on two adjacent sagittal B-scan images of the central region of the patella and then averaged. On these images, two hyperechoic bands marked the cartilage boundaries. The first results from the US reflection at the cartilage surface and the second marks the hyaline cartilage-calcified cartilage-bone interface. A region, 1 mm long approximately, corresponding to 25 A-scans (dL), was adjusted manually to the cartilage boundaries in the central part of each B-scan image (Fig. 2), where the cartilage thickness is the greatest. The area A of this region was calculated in pixels and the average thickness of the cartilage (in pixels) was estimated by dividing the area A by its length dL. The average

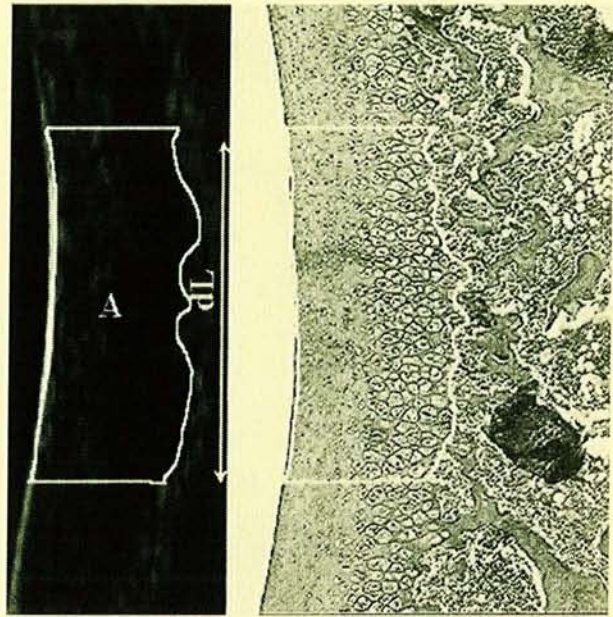


Fig. 2. Thickness measurements on: (left) B-scan image; (right) histologic section: method for which the cartilage-bone interface was considered to be located beneath the deepest cells of cartilage.

thickness in pixels was converted to micrometers using a scaling factor of 1.25 ns/pixel which accounts for the double path length, and a speed of sound of 1600 m/s¹¹.

Lateral dimensions of the cartilage over which ultrasonic thickness (UT) was averaged were approximately 1 mm in the scan plane and 120 μm in the transverse direction (corresponding to 80 μm of beam width, plus one 40 μm -displacement step).

HISTOLOGICAL ANALYSIS

Tissue preparation

After US data acquisition, the patellae were fixed in 10% neutral buffered formalin solution for 5 days, decalcified (RDO solution, Eurobio) for 24 h and conventionally wax embedded. Sixty sagittal contiguous sections (5–10 μm thick) were performed in the central part of the patellae corresponding to the US acquisitions. Then the serial sections were stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) and Toluidine blue to estimate the cellularity and the proteoglycan (PG) content, and with Picrosirius red to estimate the collagen content. The collagen fiber orientation was determined by polarized light microscopy¹².

Because of technical problems in preservation of the 7-week-old animal cartilages, histologic processing could not be performed at this maturation stage.

Histologic measurement of cartilage thickness

The mean thickness of identical site-matched regions was estimated on corresponding images of histologic sections stained with HES. These sections were selected in such a way that the cartilage thickness was the greatest, indicating that they are located in the central part of the patella in the transverse direction.

To estimate a mean 'histologic' thickness (HT) over the same volume of cartilage approximately, measurements were averaged over four non-adjacent histologic sections (in sagittal plane) separated by an interval of 15–30 μm . A 1-mm-long region was adjusted manually to the cartilage boundaries in the central part of each histologic sections. The difficulty encountered in histologic measurement of cartilage thickness consisted mainly in determining the deep boundary corresponding to that of the region previously selected on B-scan images. The deep boundary was set on histologic sections just beneath the deepest hypertrophic cells.

BIOCHEMICAL ANALYSIS

The contents of sulfated glycosaminoglycan and collagen were evaluated as a function of the cartilage maturation using patellae taken from additional groups of animals ($N=6$ per group) of the same ages and weights as those explored by ultrasound. The values of these parameters were expressed in μg per mg of dry cartilage.

For the quantification of sulfated glycosaminoglycans, the cartilage was digested in sodium phosphate buffer containing EDTA, dithiothreitol and papain. The solution was completed to 1 ml by addition of Tris/HCl. The assay was calibrated using reagent blanks and standards containing up chondroitin sulfate in the same solvent as that of the samples. The metachromatic reaction of dimethylmethylene blue was measured at 525 nm¹³.

For the evaluation of hydroxyproline (collagen), samples of cartilage were dried and hydrolyzed in HCl. NaOH solution was added for neutralization. Hydroxyproline oxidation was initiated by adding chloramine T. Finally, aldehyde-perchloric acid reagent was added and mixed. The absorbency was determined with a spectrophotometer at 550 nm¹⁴.

STATISTICS

Distribution properties of all the data were examined. All measurements were normally distributed. However, it was necessary to reject a single high outlier from each of IRC and histologic thickness measurements. An analysis of variance (one-way ANOVA) was performed using NCSS software (version 2000, NCSS, Utah, U.S.A.) to test for significant differences between group means. For each variable, statistical significance tests and multiple comparison procedures were performed with a level of significance $\alpha=0.05$.

Results

QUALITATIVE ANALYSIS

Structure of cartilage

Only sections stained with Toluidine blue and Picrosirius red (in polarizing microscopy) are shown in Fig. 3 and Fig. 4 to describe the change in cartilage structure as a function of maturation.

Immature patellar cartilage (5–10 week old). Structural organization. On histological sections stained with Toluidine blue (Fig. 3) the articular cartilage was thick with a typical endochondral bone formation at the lower border. The

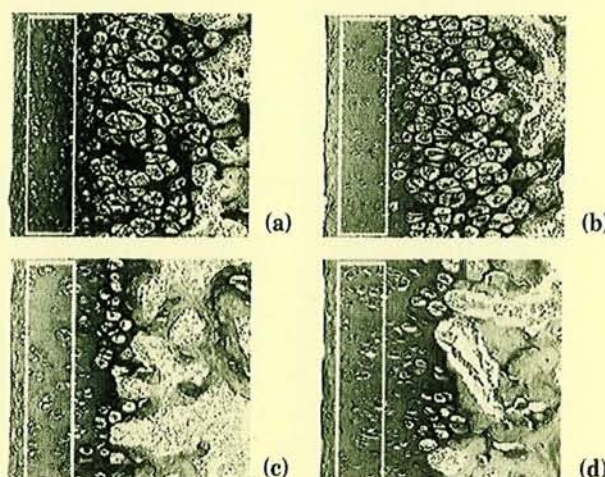


Fig. 3. Images of histologic sections of patellar cartilage in the sagittal plane as a function of rat age (Toluidine blue staining). The rectangles (100 μm in width) delimit the extent of the region of measurement of apparent integrated backscatter. (a) 5-week-old, (b) 6-week-old, (c) 8-week-old and (d) 11-week-old.

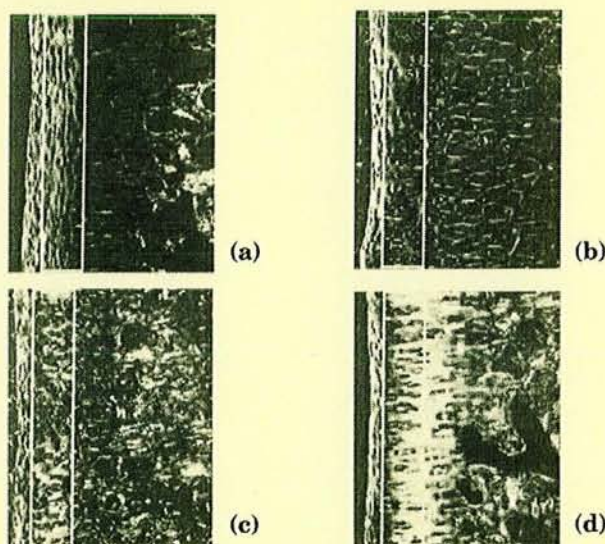


Fig. 4. Images in polarizing microscopy of histologic sections of patellar cartilage in the sagittal plane as a function of rat age (Picrosirius red staining). The rectangles (100 μm in width) delimit the extent of the region of measurement of apparent integrated backscatter. (a) 5-week-old, (b) 6-week-old, (c) 8-week-old and (d) 11-week-old.

cartilage thickness decreased rapidly between five and 10 weeks of age. On sections stained with picrosirius red and viewed with polarizing microscopy (Fig. 4) the articular cartilage was organized in three zones: the *superficial zone* (approximately 5% of the cartilage thickness, varying between 20 μm at 5 weeks old and 12 μm at 8 weeks old) with orange collagen fibers oriented parallel to the cartilage surface. On corresponding sections stained with Toluidine blue, this layer contained ellipsoidal cells which were approximately 5–10 μm in width by 10 μm in length and oriented parallel to the cartilage surface. The *transitional or intermediate zone* (approximately 35% of the cartilage thickness, varying between 130 μm at 5 weeks and 80 μm

at 8 weeks) where the collagen fibers display a green color and an alveolar meshwork organization with their long axis oriented parallel to the articular surface. In this zone, the cells were spherical, 10–15 μm in diameter and randomly distributed. The *hypertrophic zone*, which contained the largest cells (30 μm in diameter), corresponded approximately to 60% of the cartilage thickness (varying between 230 μm at 5 weeks and 140 μm at 8 weeks) contained thin green collagen fibers having a perpendicular organization and surrounding the hypertrophic cells which occupied three or four rows. The cellularity in the different zones tended to decrease progressively as a function of cartilage maturation. The cells changed in size and shape, and assembled in clusters. The cartilage–bone interface was not well delineated since it constituted a mixture of cells, marrow and bone.

Matrix of the cartilage. The matrix (PGs) of youngest cartilage was markedly stained by Toluidine blue. No spatial variation between the different zones of the tissue was observed (Fig. 3). Nevertheless, the matrix organization and, more precisely, the cells–matrix ratio was different between the transitional and the hypertrophic zones. The hypertrophic zone presented a high cells–matrix ratio whereas the transitional zone was composed of small cells surrounded by an abundant matrix. An important decrease of Toluidine blue staining was observed between 5 and 10 weeks. The Picrosirius red (collagen content) mainly stained the cartilage in the superficial and transitional layers.

Mature patellar cartilage (from 10-week-old). Structural organization. On histological sections, the articular cartilage was organized in four zones. The *superficial zone* had a thickness and structure that remained unchanged. The *transitional zone* was thinner than that of immature cartilage since it occupied approximately 18% of the cartilage thickness (approximately 45 μm). This layer remained dark with no birefringence because the collagen fibers were arching in several directions. The *radial zone* occupied approximately 68% of the cartilage depth and was 175 μm thick for 11-week-old rats. In this layer almost all the cells (approximately 30 μm in width by 50 μm in length) were grouped in clusters of 3–4 units that were organized in columns oriented perpendicular to the articular surface. On polarizing light microscopy, these cells were surrounded by thick and intense orange collagen fibers which were perpendicular to the cartilage surface. In 11-week-old rats, the hypertrophic layer was formed by just one row of cells surrounded by thick orange collagen fibers. Finally, the *calcified zone*, which allows distinction between immature and mature cartilage, was seen only in 11-week-old animals. This layer occupied 10% of the cartilage thickness. The cartilage–bone interface consisted of a large proportion of bone compared to that of marrow. Thus, this interface was sharper and easily identified.

Matrix of the cartilage. The cartilage matrix (PGs) was weakly stained by Toluidine blue. No spatial variation of PGs between the different zones of the tissue was observed. Compared to immature cartilage, the intensity of Picrosirius red staining of mature cartilage increased in the different zones and mainly in the radial zone. Thick bundles, perpendicular to the articular surface and surrounding the clusters, were observed in the deepest region of the radial zone. On polarizing microscopy, these birefringent bundles were green in their upper part and became orange near the calcified cartilage.

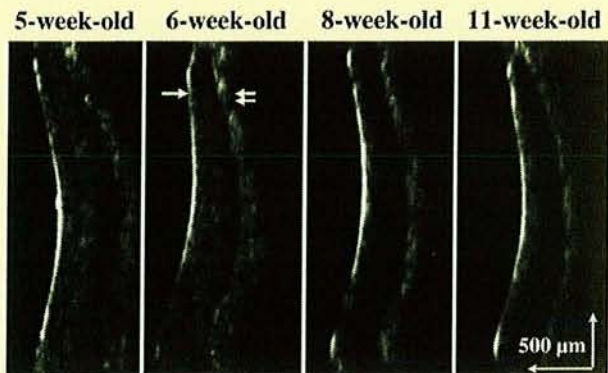


Fig. 5. B-scan images of patellar cartilage in the sagittal plane as a function of rat age. Two bright bands correspond to the cartilage surface (arrow) and cartilage–bone interface (double arrow). Between these bands, the echogenicity of the cartilage varies during the maturation. For immature animals, the matrix is echoic in its first two-thirds. The echogenicity decreases with age and for mature animals the matrix is anechoic.

Ultrasonic images of cartilage

Ultrasonic images that were acquired in the sagittal plane of the patellae are displayed as a function of rat age in Fig. 5. Vertical and horizontal axes correspond to the transducer displacement axis and sound propagation axis, respectively.

Each image shows two continuous bright bands, which result from the reflection of the ultrasonic pulse on the cartilage surface and at the cartilage–bone interface. The first band is thin, regular and smooth. Since the transducer displacement is rectilinear and the cartilage surface is curved, the intensity of the echo from the cartilage surface varies as a function of the surface orientation with respect to the incident acoustic beam axis. Thus, the surface echo is brightest in the central region of the cartilage where the surface is most perpendicular to the acoustic beam. The second bright band is thicker, less regular and echoic than the band delimiting the cartilage surface. Its thickness tends to decrease with rat aging, and its reflectivity appears to increase with time.

Between these bright bands the appearance of cartilage matrix changed as a function of animal age. For the youngest animals the cartilage matrix was echoic, displaying a bilaminar pattern. The first layer that was located beneath the surface occupied 50% to 75% of the cartilage volume and was more echoic than the second one. The echogenicity decreased with rat aging and the bilaminar pattern disappeared for most of the 7-week-old animals and for all older rats. For the oldest animals the cartilage matrix was anechoic. For all animals, the subchondral bone was not visible on B-scan images, probably because of the low level of acoustic energy backscattered from this tissue due to the high attenuation of ultrasound at the operating frequency.

QUANTITATIVE ANALYSIS

Analysis of the integrated reflection and backscatter coefficients

The estimated reproducibility of IRC and AIB measurements was reported earlier and found to be 3.5% and 1%,

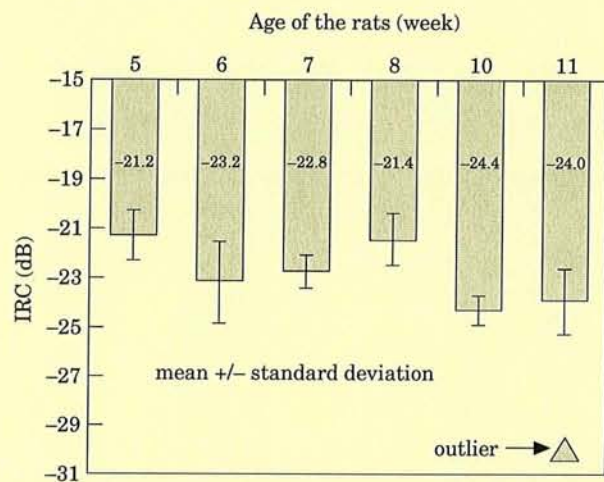


Fig. 6. Mean integrated reflection coefficient as a function of animal age. The error bars represent ($\pm$) the standard deviation of the IRC over each group.

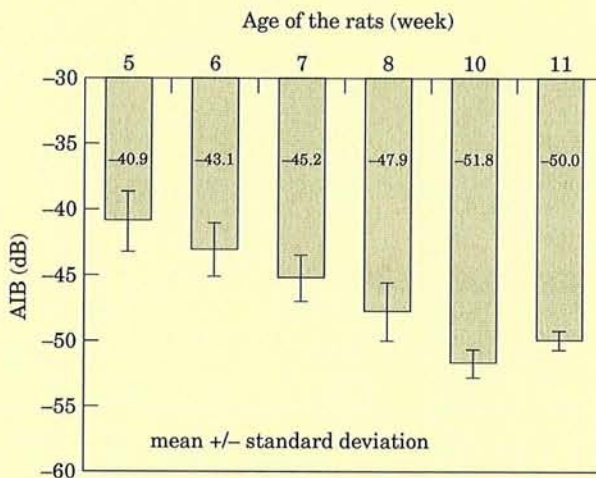


Fig. 7. Mean apparent integrated backscatter as a function of animal age. The error bars represent ($\pm$) the standard deviation of the AIB over each group.

respectively⁹. The mean values of IRC and AIB and the standard deviation were calculated in each group of animals and plotted in Figs 6 and 7, respectively, as a function of animal age.

Individual integrated reflection coefficient values ranged between -19.9 dB and -25.4 dB, except that of one 11-week-old rat outlier which was equal to -30.8 dB. Excluding this outlier, the group average IRC values varied between -21.2 dB and -24.4 dB and the standard deviation ranged between 0.7 and 1.7 dB. One-way ANOVA indicated that age has a significant effect on cartilage surface ($P < 0.05$). All-pairwise multiple comparison between means showed that the difference in IRC between 5 and 6 weeks old was significant and IRC values in 5- and 8-week-old cartilages were significantly different from those obtained at 10 and 11 weeks of age. A least-square linear fit to IRC data over time showed a moderate but significant correlation between IRC and age ($R = -0.52$; $P < 10^{-3}$). The parameter decreased slightly but significantly by -0.40 dB per week.

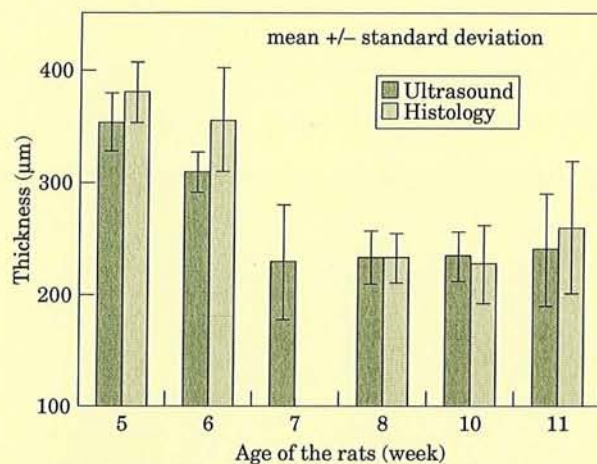


Fig. 8. Variation of the mean cartilage thickness in echography and histology as a function of age. The error bars represent ($\pm$) the standard deviation of the thickness over each group. Value from 7 week-old rats are not reported because no histologic sections were obtained for this group.

Individual AIB values ranged from -36.6 dB to -53.6 dB. One way ANOVA indicated that age has a significant effect on cartilage internal structure ($P < 0.05$). The group average AIB values, estimated over each group, showed a decline with age from -40.9 dB for 5-week-old animals to -51.8 dB for 10-week-old animals. All-pairwise multiple comparison between means showed that the difference in AIB was significant between two groups of animals sacrificed at least 2 weeks apart. However, because of the slight increase of AIB observed between 10 and 11 weeks, the AIB measured at 8 weeks of age was not significantly different from the AIB of 11-week-old rats. A least-square linear fit to AIB data over time showed a significant linear decrease of -2.2 dB per week ($R = -0.89$; $P < 10^{-4}$).

Cartilage thickness

The reproducibility of thickness measurement in B-scan images assessed in a previous work was 1.3%⁹. For both ultrasonic and histologic measurements, the mean cartilage thickness and the standard deviation were calculated over the eight animals of each group and plotted as a function of rat aging in Fig. 8.

The mean ultrasonic (US) thickness decreased from $353.9 \pm 25.4 \mu\text{m}$ for the 5-week-old rats down to $227.2 \pm 51.5 \mu\text{m}$ for the 7-week-old animals, and was approximately constant ($232 \pm 40 \mu\text{m}$) for the older groups. One-way ANOVA indicated that age has a significant effect on cartilage thickness ($P < 0.05$). All-pairwise multiple comparison between means showed that the cartilage thickness of the 5- and 6-week-old groups was significantly different from that of all the other groups. No significant difference was found between 7, 8, 10 and 11-week-old specimens. A least-square linear fit to US cartilage thickness data of the three first groups over time showed a significant linear decrease of $-63.3 \mu\text{m}$ per week ($R = -0.82$; $P < 10^{-4}$).

Statistical analysis of thickness data obtained from histology showed the same trends as those observed on ultrasonic data. A good agreement was noted between US and histologic thickness with a highly significant positive

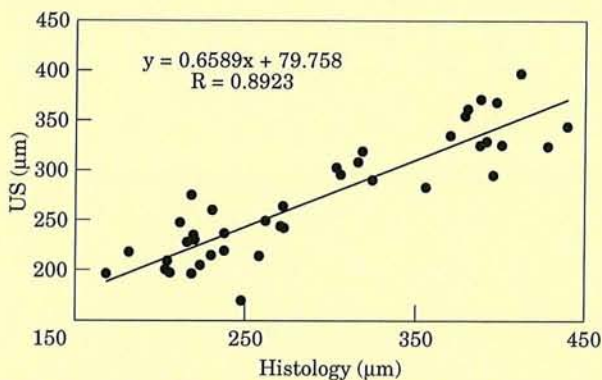


Fig. 9. Least mean square linear fit of ultrasound measurement vs histologic measurement of the cartilage thickness.

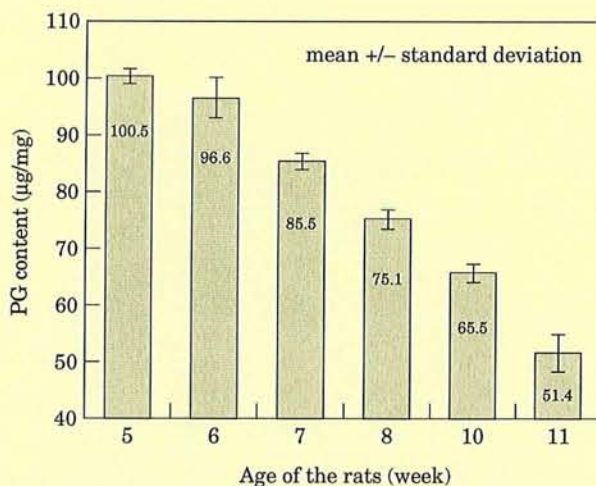


Fig. 10. Variation of the mean proteoglycan (PG) content in the whole matrix of rat patellar cartilage as a function of maturation. The error bars represent ($\pm$) the standard deviation of the PG content over each group.

correlation ($R=0.89$; $P<10^{-4}$). However, the slope and the intercept of a least-square linear fit were significantly different from 1 ($P<10^{-4}$) and 0 ($P<10^{-4}$), respectively (Fig. 9).

The mean thickness measured in histologic sections decreased from $380.5 \pm 26.6 \mu\text{m}$ for the 5-week-old animals down to $231.0 \pm 22.3 \mu\text{m}$ for the 8-week-old animals. Then it remained approximately constant around $225 \pm 35 \mu\text{m}$ for 10-week-old animals and slightly increased up to $258 \pm 59 \mu\text{m}$ for the 11-week-old animals.

Biochemical data

In immature cartilage, the proteoglycan content progressively decreased from $100.53 \pm 1.29 \mu\text{g}$ per mg of 5-week-old cartilage to $65.50 \pm 1.58 \mu\text{g}$ per mg of 10-week-old cartilage (Fig. 10). One-way ANOVA indicated that age has a significant effect on PG's content ($P<0.05$). Multiple comparison showed that the difference between PG content means was in all cases significant except between 5- and 6-week-old cartilages.

Compared with the PG content, the collagen content slightly increased from $55.84 \pm 4.64 \mu\text{g}$ per mg of cartilage to $71.01 \pm 2.46 \mu\text{g}$ per mg of cartilage between 5 and 10 weeks of age (Fig. 11). Statistical analysis indicated that

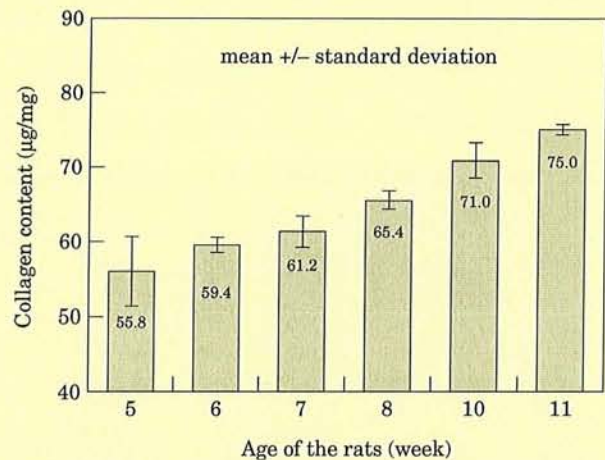


Fig. 11. Variation of the mean collagen content in the whole matrix of rat patellar cartilage as a function of maturation. The error bars represent ($\pm$) the standard deviation of the collagen content over each group.

age has a significant effect on cartilage collagen content ($P<0.05$). All-pairwise multiple comparison between means showed that all the groups were significantly different except the collagen content at 6 weeks, which was not significantly different from that obtained at 5 and 7 weeks old.

In mature cartilage, the biochemical analysis of PGs showed a significant decrease between 10- and 11-week-old cartilage. The collagen content slightly but significantly increased to $75.01 \pm 0.70 \mu\text{g}$ per mg of cartilage at 11 weeks of age.

Discussion

The current study investigated the relationship between maturation-related structural changes in rat patellar cartilage and high frequency ultrasound measurements. The US method, which combined high resolution imaging and local estimation of acoustic parameters, was confronted to histological and biochemical findings.

Maturation is characterized by cartilage thinning and structural modifications of the tissue mainly involving the PG and collagen content and the collagen fibrillar network orientation and density. Correspondences were observed between histologic sections and ultrasonic images, concerning the cartilage surface, the laminar appearance of matrix, and the cartilage–bone interface. The bilaminar backscatter pattern of the matrix that was observed on B-scans of immature cartilage apparently corresponded to the laminar organization of the cartilage in histologic sections. However, the thickness of the layers that were observed in US images did not exactly correspond to the thickness of the layers observed in images of histologic sections. This is due to the fact that, first, in ultrasound exploration the superficial layer of the cartilage could not be separated from the cartilage surface since its thickness is below the axial resolution of the SAM ($30 \mu\text{m}$), and second, the acoustic properties, in particular, speed of sound, may vary within the different layers.

Changes in echo intensity and thickness of the cartilage–bone interface observed in B-scan images may result from the effective remodeling of this interface during maturation, which could be observed on histologic sections. For

5-week-old animals, this interface was irregular due to the interpenetration, sometimes over a depth larger than 50 μm , of cartilage hypertrophic cells, marrow and bone trabeculae. This irregularity gave rise to thick echogenic band on the corresponding B-scan images. For 11-week-old animals, the cells were well separated from the bone and the cartilage–bone interface contained less marrow. Thus, the boundary between cartilage and subchondral bone was more smooth and regular and gave rise to a short specular and more intense echo.

The integrated reflection coefficient is primarily determined by the composition and micro-architecture of the superficial layer, and the surface roughness⁹. In the current study, IRC measurements demonstrated a moderate correlation between the IRC values and time. A visual analysis of histologic sections obtained at different stages of maturation did not show any alteration of either the cartilage surface or the superficial layer. Since, to our knowledge, there is no reported study on the local histologic evaluation of the cartilage superficial layer as a function of the early stages of the tissue maturation, the slight decrease of IRC with maturation cannot be thoroughly explained at this time. It should, however, be noted that IRC values are subject to measurement errors. The most possible sources of error are the effect of the internal structure backscatter on IRC values (the resolution of our US system does not allow the detection of the superficial layer) and/or a strong influence of the US beam incidence angle with respect to the cartilage surface on IRC measurement (a 2°-variation of incident angle induced by a 50 μm lateral displacement of the transducer resulted in an IRC variation of -1.7 dB, i.e. approximately 7.5%).

The most important finding of the current study was the highly significant age-related decrease of AIB. This parameter, which is device- and operator-independent, provides quantitative information on the characteristics (concentration, size, orientation, e.g. anisotropy and acoustic impedance mismatch) of subresolution scatterers of the explored tissue. AIB values were greater by up to 11 dB, i.e. 27% in immature cartilage, than that of AIB in mature cartilage. Substantial modifications of cartilage composition and structure were observed in the region of interest on histologic images during the maturation. Progressively, in the volume of US measurements, the cellularity slightly decreases, the size and the shape of cells change, and the collagen fibers change in orientation. Regarding the modification of the matrix biochemical constituents within the whole depth of the specimens, our analysis indicated that age has a significant effect on proteoglycan and collagen content. During maturation the PG's content progressively decreased by up to 49%, while the collagen content slightly increased by up to 34%.

The AIB decrease should not be associated significantly with the decrease in PG content. Indeed, a recent preliminary study reported by our group, dealing with correlation of 50 MHz ultrasound backscatter with matrix constituents of rat patellar cartilage, has shown that there was no difference between ultrasound backscatter images of PG depleted cartilage (selective degradation of PGs using hyaluronidase enzyme) and backscatter images of their control contralateral nondegraded cartilage¹⁵.

With regard to cell contribution, it can be noted that in our study ultrasound backscatter does not provide resolution to the cellular level. However, the cell size (10–30 μm) is consistent with expected domains of scatterers to which ultrasound backscatter is sensitive. It would appear likely, therefore, that the apparent decrease in cell density and

changes in cell diameter and organization within the region of measurement have some effect on apparent integrated backscatter during the maturation process. Previous studies performed in ocular melanoma at lower frequencies (10 MHz) demonstrated a correlation between ultrasound backscatter parameters and cell characteristics¹⁶.

AIB may also be affected by the increase in collagen content of the whole matrix, which may be attributed to the high fiber density observed in the mature state of the cartilage. Because of their small size, collagen fibers cannot be directly detected; however, the change in collagen fiber orientation could explain the local change in apparent integrated backscatter. Indeed, AIB value was greater when ultrasound propagated across collagen fibers than that of AIB of ultrasound propagating along the fibers. This finding is in agreement with results described by other groups in highly oriented biological tissues such as myocardium and skeletal muscles^{17,18}.

Finally, our findings demonstrated a good agreement between US and histologic measurements of the total cartilage thickness. The potential sources of error that may account for the difference in US and histologic cartilage thickness measurements include variations of cartilage thickness due to histologic preparation, difference in orientation of US scan plane and histologic section, and inaccuracy of speed of sound. The slope and intercept of a linear fit between US and histologic thickness data were significantly different from 1 and 0, respectively, indicating that the error between US and histologic measurements was a function of the cartilage thickness. Since cartilage thickness was found to be age-dependent, one could argue that the difference between US and histologic thickness measurement is also dependent on age. Speed of sound is known to vary as a function of the cartilage composition and micro-architecture¹¹. Thus, age-related changes in cartilage composition, water content and/or micro-structure may influence speed of sound and may potentially explain the age-related difference between US and histologic thickness measurements observed in this study.

In summary, this study reports the first results on the relationship between quantitative ultrasound and maturation-related changes in rat patellar cartilage. US technique allows local characterization of structural changes in cartilage. The decrease of the apparent integrated backscatter appears more likely to be related to changes in the cartilage anisotropy resulting from the change in collagen fiber orientation within the region of measurement. Histologic and biochemical findings indicate that chondrocytes and collagen content may contribute to the changes in ultrasound backscatter. Local measurements of other acoustic properties, such as speed of sound and the frequency variation of attenuation in immature and mature cartilage, is under way in our laboratory in order to clarify the contribution of each cartilage constituent, in particular the collagen content, to the changes in backscattered ultrasound.

This study demonstrates that quantitative measurements of ultrasound backscatter may provide a useful and sensitive index to age-related or disease-related modifications of cartilage composition or microstructure. High frequency ultrasound has the potential to be used as a non-invasive and quantitative technique for the research and evaluation of pharmacological treatments using animal models. In the future, attention should also be focused on the miniaturization of the echographic probes potentially to extend this technique to the clinical field. Such understanding provided

by this study could improve the utility of ultrasonography for the assessment of joint cartilage and related diseases.

References

- Herbage D. Collagènes, cartilages et arthrose. In: Simon L, Loyau G, Eds. *L'arthrose: Perspectives et réalités*. Paris, France: Masson 1987:49–56.
- McDevitt CA. Biochemistry of articular cartilage. Nature of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1973;32:364–78.
- Weiss C, Mirow S. An ultrastructural study of Osteoarthritic changes in the articular cartilage of human knees. *J Bone and Joint Surg Am* 1972;54:954–72.
- Chan WP, Stevens MP, Sack K, Majumdar S, Stoller DW, Basch G, *et al.* Osteoarthritis of the knee, comparison of radiography, CT, MR imaging to assess extent and severity. *Am J Roentgenol* 1991;157:799–806.
- Gaggiardi JA, Chung EM, Chandnani VP, Kesling KL, Christensen KP, Null RN, *et al.* Detection and staging of chondromalacia patellae: relative efficacies of conventional MR imaging, MR arthrography and CT arthrography. *Am J Roentgenol* 1994;163:629–36.
- Loeulle D, Olivier P, Mainard D, Gillet P, Netter P, Blum A Review: Magnetic resonance imaging of normal and osteoarthritic cartilage. *Arth Rheum* 1998;41:963–75.
- Chandnani VP, Ho C, Chu P, Trudell D, Resnick D. Knee hyaline cartilage evaluated with MR imaging: a cadaveric study involving multiple imaging sequences and intraarticular injection of gadolinium and saline solution. *Radiology* 1991;178:557–61.
- Saïed A, Chérin E, Gaucher H, Laugier P, Netter P, Berger G. Assessment of articular cartilage and subchondral bone subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography. *J Bone Min Res* 1997;12(9):1378–86.
- Chérin E, Saïed A, Laugier P, Netter P, Berger G. Evaluation of acoustical parameter sensitivity to age-related and osteoarthritic changes in articular cartilage using 50 MHz ultrasound. *Ultras Med Biol* 1998;24(3):341–54.
- Bland YS, Ashhurst DE. Development and ageing of the articular cartilage of the rabbit knee joint: distribution of the fibrillar collagens. *Anat Embryol* 1996;194:607–19.
- Agemura DH, O'Brien WD, Olerud JE, Chun LE, Eyre DE. Ultrasonic propagation properties of articular cartilage at 100 MHz. *J Acoust Soc Am* 1990;87:1786–91.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447–55.
- Goldberg RL, Kolibas LM. An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture. *Conn Tissue Res* 1990;24:265–75.
- Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of the amino acid. *Bioch Biophys* 1961;93:440–7.
- Pellaumail B, Loeuille D, Watrin A, Netter P, Berger G, Saïed A. Correlation of high frequency ultrasound backscatter with cartilage matrix constituents. *IEEE Ultras Symp Proc 98CH36102* 1998:1463–6.
- Coleman DJ, Silverman RH, Rondeau MJ. Correlation of acoustic tissue typing of malignant melanoma and histopathologic features as a predictor of death. *Am J Ophthalmol* 1990;110:380–8.
- O'Donnell M, Mimbs JW, Miller JG. Relationship between collagen and ultrasonic backscatter in myocardial tissue. *J Acoust Soc Am* 1981;69:580–8.
- Roberjot V, Laugier P, Berger G. Anisotropy in bovine skeletal muscle in vitro: Frequency dependent attenuation and backscatter coefficient over a wide range of frequencies. *IEEE Ultras Symp Proc 94CH3468-6* 1994:1467–70.

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES DU CARTILAGE

INTRODUCTION

A partir des résultats obtenus au chapitre précédent, le collagène et les PG sont apparus comme des candidats susceptibles d'expliquer les variations du niveau de rétrodiffusion par la matrice extracellulaire du cartilage rotulien du rat. Nous avons cherché à tester la validité de notre hypothèse en étudiant le cartilage et sa réponse acoustique à différentes étapes de la dégradation contrôlée des constituants de la matrice. Celle-ci étant composée en majeure partie de protéoglycanes et de collagène, il eut été souhaitable de pouvoir effectuer une dégradation contrôlée et spécifique de chacun des constituants. Dans une première partie, nous avons obtenu la dégradation sélective des protéoglycanes par une enzyme spécifique, la hyaluronidase testiculaire ovine. En ce qui concerne le collagène, les enzymes spécifiques (collagénase) étant trop destructives, nous avons opté pour une enzyme peu spécifique attaquant aussi bien les PG et le collagène, la papaïne. Les résultats de cette deuxième expérience sont obtenus au début de la phase de dégradation.

A. DEGRADATION DES PROTEOGLYCANES PAR LA HYALURONIDASE TESTICULAIRE OVINE

1. Protocole expérimental

a. Animaux

26 rats sont étudiés au cours de l'expérience, repartis en deux lots. L'un est de 16 rats pour l'échographie et l'histologie et l'autre est de 10 rats pour la biochimie. Chacun des lots a inclus deux groupes de rats immatures de 5 semaines et matures de 10 semaines correspondant respectivement à des poids de 125 g et de 300 g. En dehors de cet aspect lié à la maturation, l'intérêt de ce travail est d'étudier des cartilages présentant des caractéristiques structurales et biochimiques différentes. Les rotules de chaque rat sont disséquées, celle de gauche servant de témoin et celle de droite subissant la dégradation. Dans cette étude, on suppose qu'il n'existe pas de différence significative entre les cartilages rotuliens des genoux d'un même rat. En effet, des travaux antérieurs du laboratoire [Cherin, 1998] ont montré que les cartilages rotuliens gauche et droit d'un même rat ne présentent pas de différence significative pour ce qui concerne l'aspect des images échographiques et histologiques, l'épaisseur et les coefficients intégraux de réflexion et de rétrodiffusion apparente ($p > 0,05$).

b. Dégradation par la hyaluronidase testiculaire ovine

La dégradation par la hyaluronidase testiculaire ovine hydrolyse spécifiquement les chondroïtines sulfates et l'acide hyaluronique [Yamada, 1982]. Les rotules droites subissent l'incubation séparément dans 1 ml de solution de $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{NaCl}$ (0,1 M) contenant 1000 U/ml de hyaluronidase pendant 6 heures à 37 °C et avec un pH de 5,1. Elles sont ensuite rincées dans 30 ml de solution de $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{NaCl}$ sans hyaluronidase. La réaction enzymatique est stoppée par l'incubation des rotules dans 2 ml d'une solution d'inhibiteurs de protéase pendant 1 minute. La rotule témoin est mise dans un bain de sérum physiologique à 0,9 % pendant 6 heures à 37 °C.

c. Méthodes acoustiques, histologiques et biochimiques

Les études acoustique, histologique et biochimique se déroulent de façon semblable à celles décrites dans le chapitre précédent à savoir, la construction des images échographiques, le calcul des coefficients intégraux de réflexion et de rétrodiffusion apparente, la coloration des coupes histologiques au rouge sirius observées en lumière normale et polarisée et au bleu de toluidine et la mesure des contenus globaux en PG et en collagène. Les seules différences sont les mesures de l'épaisseur du cartilage en histologie et en échographie dont la méthode d'évaluation est décrite à la fin du second chapitre.

d. Tests statistiques

Le Wilcoxon Signed-Rank Test pour variables appariées est utilisé pour estimer les différences entre les coefficients intégraux de réflexion et de rétrodiffusion des cartilages témoins et dégradés. Le même test est appliqué pour les mesures d'épaisseurs aussi bien en échographie qu'en histologie. Chacun des tests est utilisé avec un niveau significatif α de 0,05.

2. Résultats

Seront présentées successivement les observations déduites des images échographiques et l'étude quantitative de la réflexion et de la rétrodiffusion apparente. Ensuite, nous verrons la comparaison des mesures d'épaisseur du cartilage déterminées à partir des images échographiques et histologiques. Enfin, comme dans le chapitre précédent, nous présenterons en dernier les résultats histologiques et biochimiques (Figure 1).

a. Images échographiques

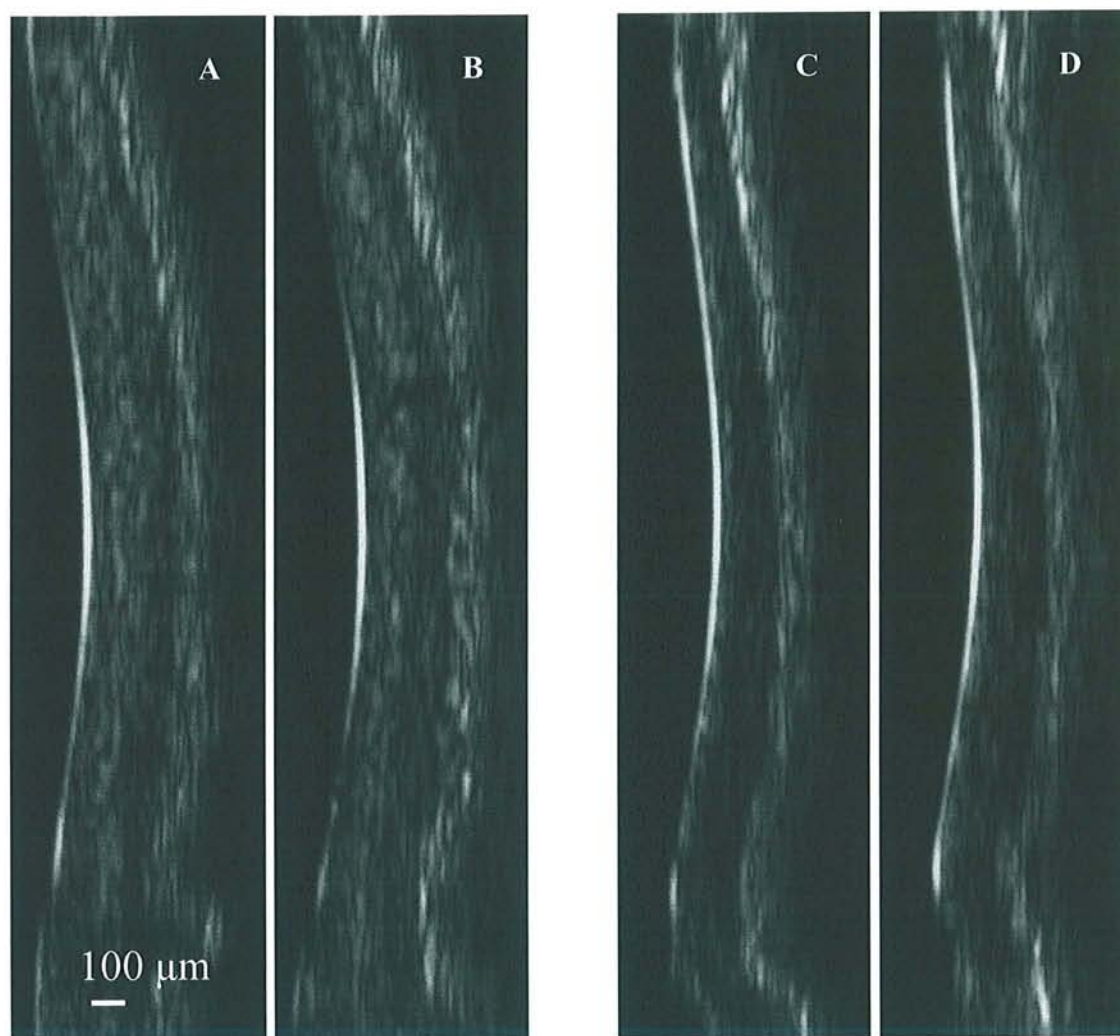


Figure 1 : images échographiques de cartilage présentées de gauche à droite : témoin immature (A), dégradé immature (B), témoin mature (C) et dégradé mature (D). Les cartilages témoins (A, C) et dégradés (B, D) ne présentent pas de différence observable.

En fonction de l'âge des rats, les images échographiques des cartilages témoins et dégradés présentent le même aspect que les images présentées dans le chapitre précédent. Les principales observations sont l'aspect bilaminaire du cartilage immature, la diminution au cours de la maturation de l'épaisseur du cartilage et de l'échogenicité de la couche située derrière la surface. Il n'existe pas de différence observable entre les images des cartilages témoins et dégradés pour les deux âges.

b. Paramètres acoustiques

Dans l'ordre sont exposés les résultats sur la réflexion, sur la rétrodiffusion et sur les mesures d'épaisseur du cartilage réalisées en échographie et en histologie. Pour les quatre

index quantitatifs sont présentées les valeurs des moyennes et écarts types des cartilages témoins et dégradés pour les deux âges.

(1) Réflexion de la surface articulaire

Comme dans le chapitre précédent, les courbes moyennes de réflexion présentent des variations non significatives en fonction de la fréquence aussi bien pour les cartilages témoins que dégradés des deux âges. Le seul paramètre étudié pour la réflexion de l'onde ultrasonore par la surface articulaire est le coefficient intégral de réflexion CIR (Figure 2).

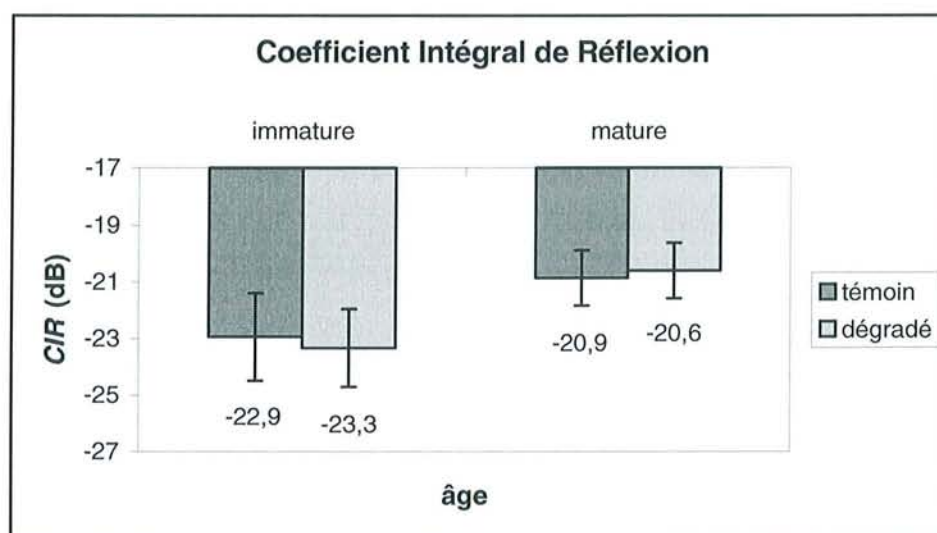


Figure 2 : Variation du CIR entre les cartilages témoins et dégradés pour les âges immature ($p > 0,05$) et mature ($p > 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart type des contenus en PG et en collagène pour chaque groupe.

Les valeurs individuelles du coefficient intégral de réflexion s'échelonnent entre - 19,3 dB et - 24,9 dB. Pour l'âge immature, les valeurs moyennes des coefficients des cartilages témoins et dégradés sont respectivement de $- 22,9 \pm 1,5$ dB et de $- 23,3 \pm 1,4$ dB. Pour l'âge mature, les valeurs moyennes des coefficients des cartilages témoins et dégradés sont respectivement de $- 20,9 \pm 1,0$ dB et de $- 20,6 \pm 1,0$ dB. Le Wilcoxon Signed-Rank Test pour valeurs appariées indique qu'il n'existe pas de différence significative entre les coefficients des cartilages témoins et dégradés pour chacun des deux âges ($p > 0,05$).

(2) Rétrodiffusion de la matrice interne

Comme dans le chapitre précédent, les courbes moyennes de rétrodiffusion présentent des variations non significatives en fonction de la fréquence aussi bien pour les cartilages témoins

que dégradées et ceci pour les deux âges. Le seul coefficient étudié pour la rétrodiffusion de l'onde ultrasonore par l'intérieur du cartilage est le coefficient intégral de rétrodiffusion apparente CIRD (Figure 3).

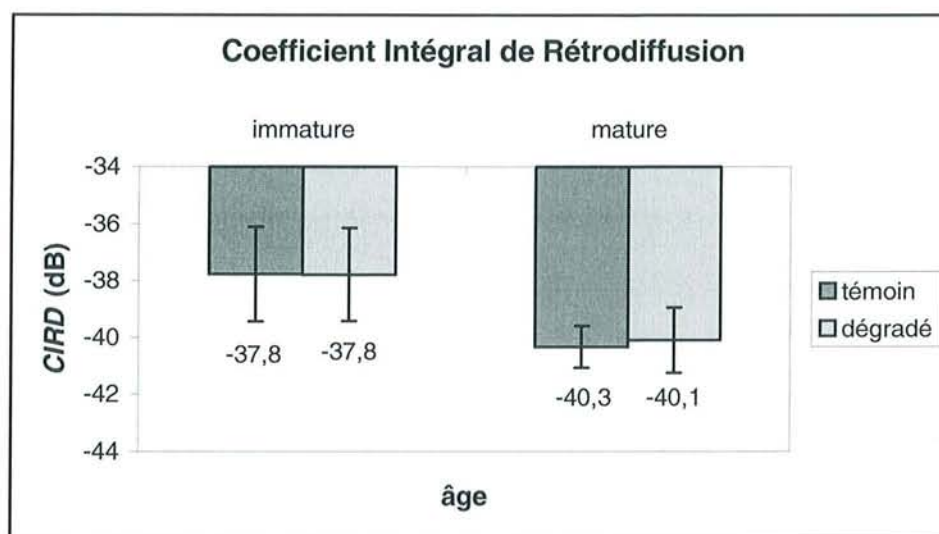


Figure 3 : Variation du CIRD entre les cartilages témoins et dégradés pour les âges immature ($p > 0,05$) et mature ($p > 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart type des contenus en PG et en collagène pour chaque groupe.

Les valeurs individuelles du coefficient intégral de rétrodiffusion apparent s'échelonnent entre - 34,9 dB et - 41,8 dB. Pour l'âge immature, les valeurs moyennes des coefficients des cartilages témoins et dégradés sont respectivement de $- 37,8 \pm 1,7$ dB et de $- 37,8 \pm 1,6$ dB. Pour l'âge mature, les valeurs moyennes des coefficients des cartilages témoins et dégradés sont respectivement de $- 40,3 \pm 0,7$ dB et de $- 40,1 \pm 1,1$ dB. Le Wilcoxon Signed-Rank Test pour valeurs appariées indique qu'il n'existe pas de différence significative entre les coefficients des cartilages témoins et dégradés pour chacun des deux âges ($p > 0,05$).

(3) Mesures d'épaisseur du cartilage

Sur les deux graphes suivants correspondant respectivement aux mesures obtenues à partir des images échographiques et histologiques sont présentées les épaisseurs du cartilage (moyenne et écart type) pour les cartilages témoins et dégradés aux âges immature et mature (Figure 4 et 5).

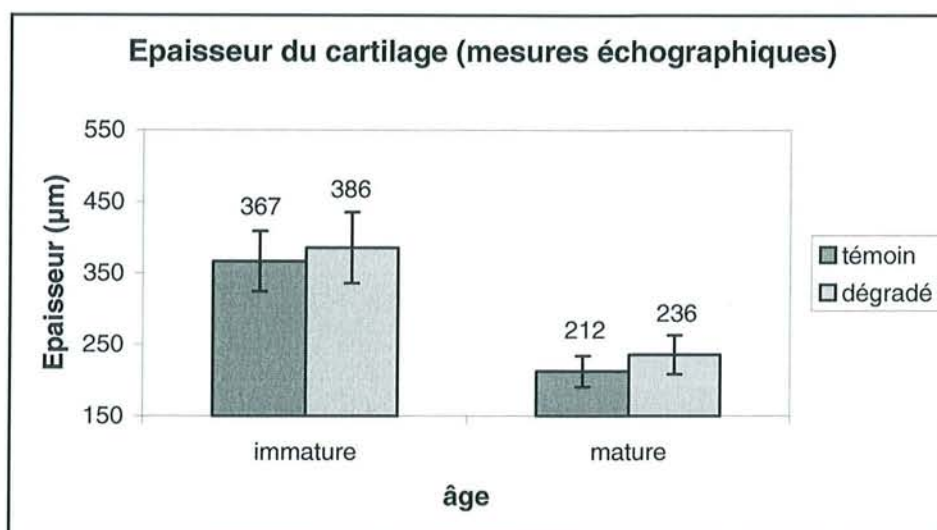


Figure 4 : Variation de l'épaisseur du cartilage mesurée sur les images échographiques entre les cartilages témoins et dégradés pour les âges immature ($p < 0,05$) et mature ($p < 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart type des contenus en PG et en collagène pour chaque groupe.

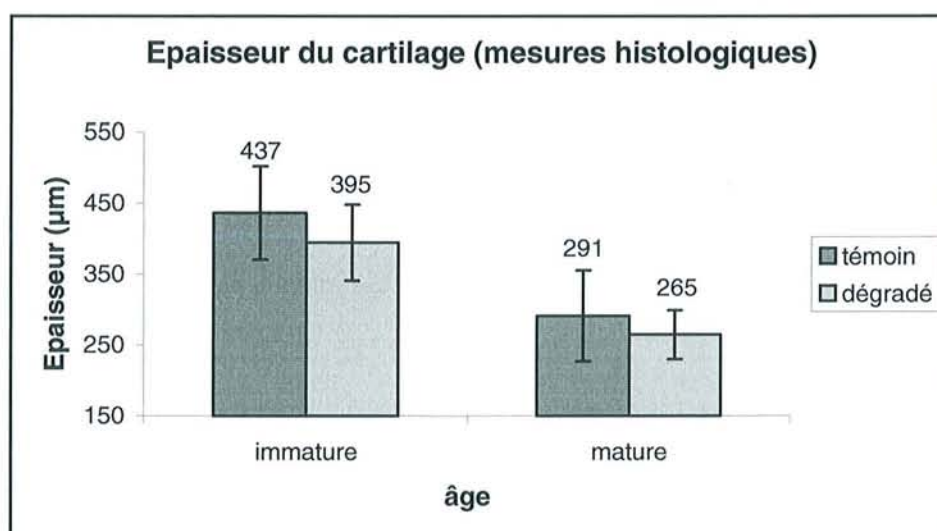


Figure 5 : Variation de l'épaisseur du cartilage mesurée sur les images histologiques entre les cartilages témoins et dégradés pour les âges immature ($p > 0,05$) et mature ($p > 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart type des contenus en PG et en collagène pour chaque groupe.

Les mesures d'épaisseur des cartilages témoins et dégradés à partir des images échographiques prennent en compte une valeur constante de la célérité. Lors de la dégradation, la valeur moyenne de l'épaisseur mesurée en échographie passe de $367 \pm 42 \mu\text{m}$ à $386 \pm 50 \mu\text{m}$ pour l'âge immature et de $212 \pm 22 \mu\text{m}$ à $236 \pm 27 \mu\text{m}$ pour l'âge mature. Les

tests statistiques montrent que l'épaisseur du cartilage mesurée en échographie augmente faiblement, mais de façon significative entre les cartilages témoins et dégradés aussi bien pour l'âge immature que mature ($p < 0,05$). Lors de la dégradation, la valeur moyenne de l'épaisseur mesurée en histologie passe de $436 \pm 66 \mu\text{m}$ à $394 \pm 54 \mu\text{m}$ pour l'âge immature et de $291 \pm 64 \mu\text{m}$ à $265 \pm 34 \mu\text{m}$ pour l'âge mature. Le test statistique indique qu'il n'existe pas de différence significative entre les cartilages témoins et dégradés pour les deux âges ($p > 0,05$).

c. Résultats histologiques et biochimiques

Sont présentées en premier lieu les observations déduites des images des coupes histologiques colorées au bleu de toluidine et au rouge sirius en lumière normale et polarisée suivies des résultats biochimiques sur l'évaluation des contenus globaux en PG et en collagène.

(1) Images histologiques

Pour les âges immature et mature sont présentées des images de coupes histologiques de cartilages témoins et dégradés, colorées au bleu de toluidine à gauche et au rouge sirius au centre et à droite (Figures 6, 7, 8, 9). L'image de droite est obtenue en lumière polarisée. Le rectangle blanc délimite la zone de mesure de la rétrodiffusion.

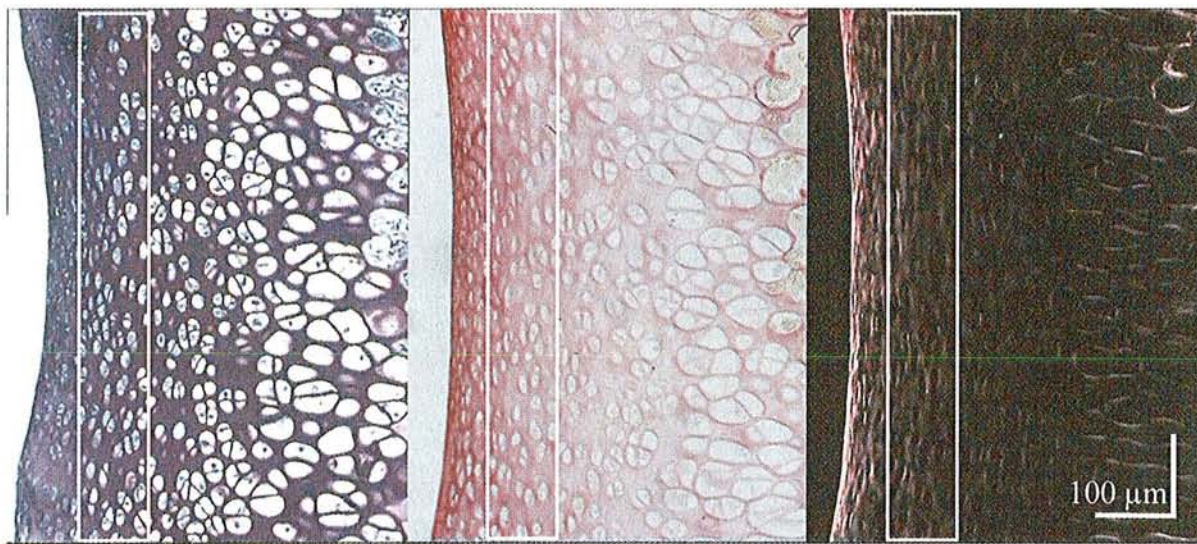


Figure 6 : images de coupes histologiques d'un rat immature témoin.

Le rectangle blanc délimite la zone de mesure de la rétrodiffusion.



Figure 7 : images de coupes histologiques d'un rat immature dégradé.

Le rectangle blanc délimite la zone de mesure de la rétrodiffusion.

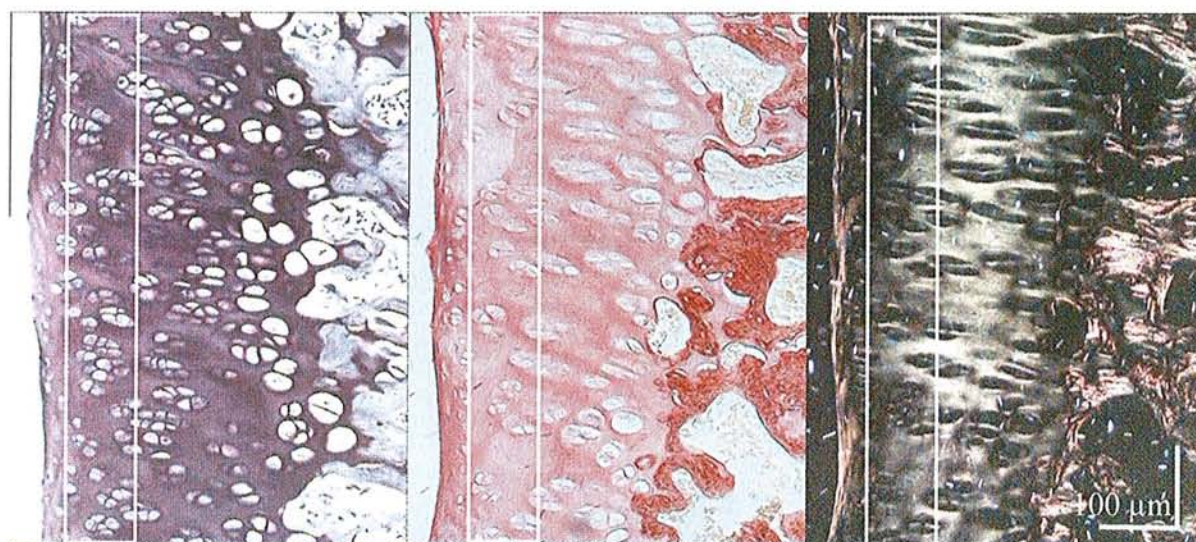


Figure 8 : images de coupes histologiques d'un cartilage mature témoin

Le rectangle blanc délimite la zone de mesure de la rétrodiffusion.

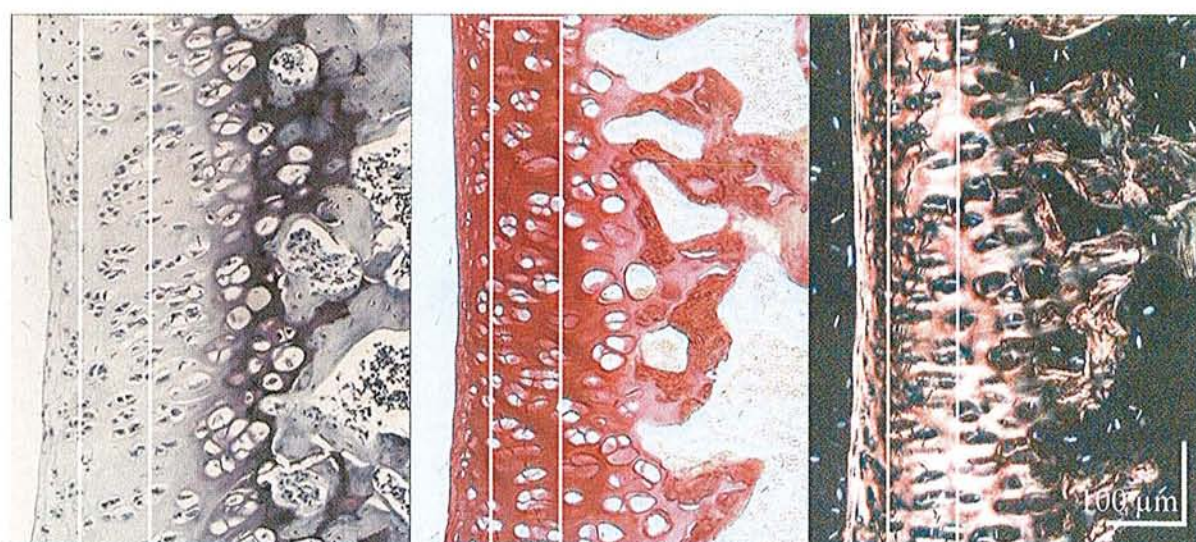


Figure 9 : images de coupes histologiques d'un cartilage mature dégradé

Le rectangle blanc délimite la zone de mesure de la rétrodiffusion.

Les images histologiques des rats témoins immature et mature présentent le même aspect que celles décrites dans le chapitre précédent. Les principales observations décrites pour les cartilages témoins sont rappelées en vue de la comparaison avec les images histologiques des cartilages dégradés.

Au cours de la maturation, l'épaisseur du cartilage diminue. Le contenu global en PG indiqué par l'intensité du bleu de toluidine diminue avec l'âge. Le contenu global en collagène indiqué par l'intensité du rouge sirius augmente avec l'âge. Le degré d'anisotropie du cartilage

augmente avec l'âge et les cartilages immature et mature sont sensiblement divisés respectivement en trois et quatre couches.

Dans la zone de mesure de la rétrodiffusion, les fibres de collagène passent d'une orientation parallèle à perpendiculaire vis à vis de la surface articulaire, le diamètre des fibres augmente et les contenus en PG et en collagène suivent les mêmes variations que celles des contenus globaux. Pour les deux âges, les contenus en PG et en collagène ont tendance respectivement à augmenter et à diminuer en fonction de la profondeur.

L'état de surface du cartilage dégradé reste identique à celui du cartilage témoin aussi bien pour l'âge immature que mature. La surface garde un aspect net et régulier et on n'observe aucune altération ou fibrillation de surface.

Pour les cartilages dégradés, la décoloration du bleu de toluidine indique une diminution importante du contenu en PG. L'intensité de la décoloration diminue en fonction de la profondeur. Les deux tiers de la matrice proches de la surface sont décolorés alors que le tiers proche de l'os sous-chondral a une coloration identique au cartilage témoin. Il existe un front de dégradation entre les deux zones.

En parallèle de cette décoloration, la couleur du rouge sirius est renforcée dans la zone supérieure déplétée en PG.. La dégradation par la hyaluronidase ne pouvant pas augmenter le contenu en collagène, le renforcement de la coloration par le rouge sirius peut être expliqué par l'augmentation du nombre de sites de fixation de rouge sirius sur les molécules de collagène. En effet, en dégradant l'acide hyaluronique des PG, la hyaluronidase casse les liaisons entre le collagène et les PG. Les sites de liaison du collagène libérés permettent la fixation du rouge sirius sur le collagène.

Le renforcement de la polarisation s'accompagne d'un changement de couleur de la lumière polarisée (du vert à l'orange). Ce phénomène est particulièrement important à l'âge mature. D'après Dayan [Dayan, 1989], le changement de longueur d'onde de la lumière polarisée traduit, soit une variation du diamètre des fibres de collagène, soit un changement du type de collagène. La hyaluronidase ne pouvant pas modifier le type du collagène sans attaquer le collagène, le changement de couleur de la lumière polarisée correspondrait plutôt à une variation du diamètre des fibres. Par ailleurs, ceci peut s'expliquer par le fait que l'espace libéré par les PG permet aux fibres de collagène de se dilater dans le sens du diamètre et l'augmentation de la longueur d'onde (du vert à l'orange) traduirait une augmentation du diamètre des fibres. Quant à l'orientation des fibres et à l'organisation du réseau collagénique en général, il semble qu'il n'existe pas de modification induite par la dégradation.

A part la variation d'intensité des colorations, le cartilage dégradé présente le même aspect que le cartilage témoin. En effet, l'organisation multicouche du cartilage ne semble pas se modifier. Le nombre de couches reste identique. L'épaisseur et l'aspect cellulaire des différentes couches ne semblent pas varier.

(2) Résultats biochimiques

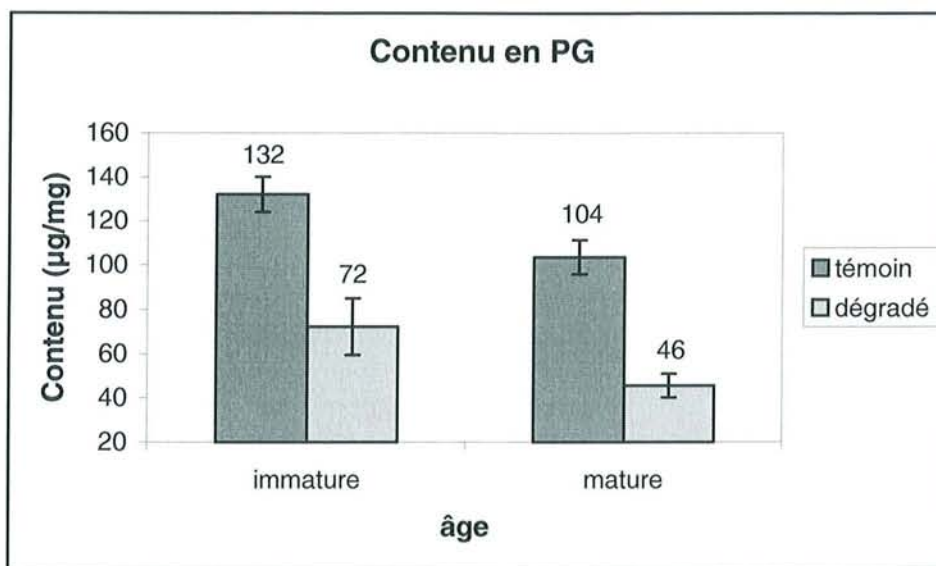


Figure 10 : Variation du contenu en PG entre les cartilages témoins et dégradés pour les âges immature ($p < 0,05$) et mature ($p < 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart type des contenus en PG et en collagène pour chaque groupe.

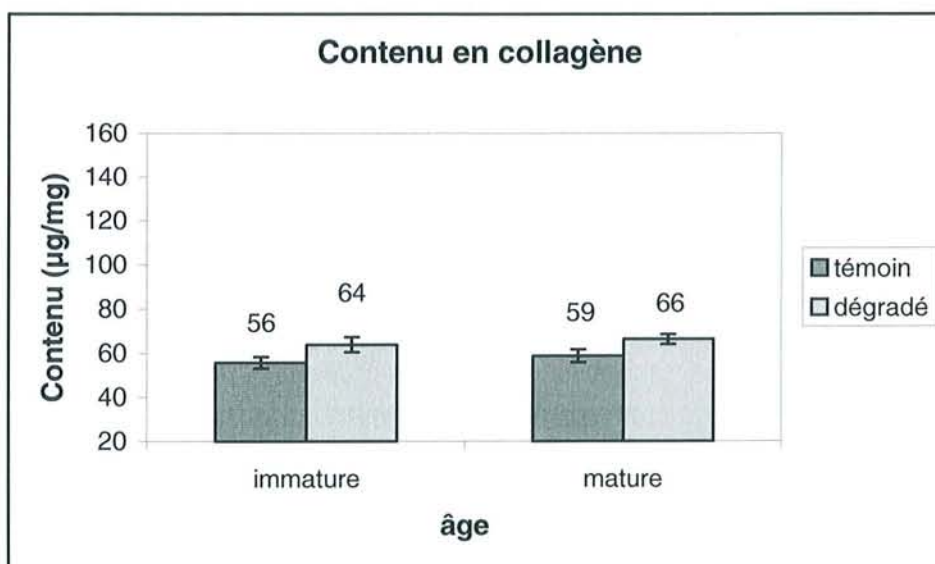


Figure 11 : Variation du contenu en collagène entre les cartilages témoins et dégradés pour les âges immature ($p < 0,05$) et mature ($p < 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart type des contenus en PG et en collagène pour chaque groupe.

Lors de la dégradation, la valeur moyenne de la concentration en PG passe de 132 ± 8 µg/mg à 72 ± 13 µg/mg pour l'âge immature et de 104 ± 8 µg/mg à 46 ± 5 µg/mg pour l'âge mature

correspondant à des diminutions respectives de 45 % et de 56 %. Lors de la dégradation, la valeur moyenne de la concentration en collagène passe de $56 \pm 3 \mu\text{g/mg}$ à $64 \pm 3 \mu\text{g/mg}$ pour l'âge immature et de $59 \pm 3 \mu\text{g/mg}$ à $66 \pm 3 \mu\text{g/mg}$ pour l'âge mature correspondant à des augmentations respectives de 14 % et de 12 %. Le Wilcoxon Signed-Rank test montre que les contenus en PG ($p < 0,05$) et en collagène ($p < 0,05$) présentent des différences significatives entre les cartilages témoins et dégradés pour les cartilages immatures et matures. Cette faible augmentation de la concentration du collagène en $\mu\text{g/mg}$ peut être expliquée par une diminution de la précision de la mesure du fait de la diminution de la masse du cartilage lors de la dégradation. La quantité de collagène peut être considérée comme inchangée.

3. Discussion

Le principal résultat de cette étude est l'absence de variation des coefficients intégraux de réflexion et de rétrodiffusion apparente au cours de la dégradation enzymatique des PG. Les résultats histologiques et biochimiques correspondants indiquent clairement une altération importante des PG (de l'ordre de 50 % pour les deux âges) et une absence de modification de l'organisation du réseau collagénique. L'absence de variation des paramètres acoustiques indique que les pertes significatives en PG n'influencent pas la propagation du signal ultrasonore.

Nos résultats sur le coefficient intégral de réflexion sont en accord avec ceux de Töyräs qui a aussi montré qu'à 22 MHz le coefficient de réflexion ne varie pas au cours de la déplétion des PG du cartilage bovin par la chondroïtinase ABC [Töyräs, 1999]. En revanche, Töyräs a montré que la déplétion des PG entraîne une variation de l'échogénicité interne des images du cartilage bovin de l'ordre de 20 % (pas de mesure du CIRD).

Nous avons tout de même noté sur les images des coupes histologiques observées en lumière polarisée une modification de la longueur d'onde de la lumière qui semble indiquer une augmentation du diamètre des fibres de collagène. Dayan [Dayan, 1989] indique en effet, que les diamètres de $0,8 \mu\text{m}$ ou moins correspondent à la couleur verte et les diamètres de $1,6 \mu\text{m}$ à $2,4 \mu\text{m}$ correspondent à la couleur orange pour différents types de collagène de différents organes (peau, tendon et cartilage) prélevés chez différents animaux (veau, bœuf et rat). Ces modifications ne semblent pas influencer le CIRD et nos observations méritent d'être confirmées par une étude systématique quantitative d'un nombre plus important d'images de coupes histologiques. On peut penser toutefois que la quantité de collagène ne variant pas au cours de la dégradation, si les fibres de collagène se dilatent dans le sens du diamètre, leur

masse volumique diminue et donc leur impédance acoustique diminue. Si la diminution des fluctuations d'impédance acoustique compense dans la fonction de rétrodiffusion l'augmentation du diamètre des fibres de collagène, la rétrodiffusion ne change pas, bien que le diamètre des fibres augmente. Ces modifications qui sont certainement faibles par rapport aux pertes en PG, n'ont pas pu être mises en évidence par manque d'informations sur le cartilage étudié.

Par ailleurs, certains auteurs rapportent que la déplétion des PG induit une augmentation du contenu en eau. Cette augmentation a été estimée par des mesures directes du contenu au sein du cartilage de bœuf [Zhu, 1993] et de cheval [Simon, 1982] et par des mesures du paramètre T2 en IRM au sein du cartilage de veau [Lehner, 1989] et du cartilage humain [Mlynarik, 1996; Dardzinski, 1997]. En effet, la libération des espaces interfibrillaires par la dégradation enzymatique conduit à une augmentation de l'hydratation des espaces laissés vacants par les PG [Watrin, 1998]. Si une telle augmentation s'est produite au cours de nos expériences, elle n'a pas pu être mise en évidence par une variation de la rétrodiffusion comme il a déjà été montré auparavant sur d'autres tissus. En effet, une expérience sur l'exploration du myocarde canin dans la bande de fréquence 4-6,8 MHz a montré qu'une variation du contenu en eau au sein du myocarde n'entraîne pas de modification du coefficient intégral de rétrodiffusion apparente [Hassler, 1993].

En revanche, l'augmentation du contenu en eau dans le cartilage dégradé est certainement mise en évidence par l'augmentation de l'épaisseur du cartilage mesurée sur les images échographiques qui, dans cette étude, est le seul index acoustique qui présente des différences significatives entre les cartilages témoins et dégradés. Le fait que l'épaisseur mesurée en échographie croît légèrement, mais de façon significative entre les cartilages témoins et dégradés, alors que les mesures histologiques ne montrent pas de variation significative, traduit une diminution de la célérité des ultrasons dans le cartilage dégradé. Cette diminution de la célérité ne peut être expliquée que par une augmentation du contenu en eau comme il a déjà été montré à plus basse fréquence dans le foie [Tuthill, 1991] et le cartilage bovin [Töyräs, 1999].

Dans l'objectif de dégrader sélectivement le collagène, une expérimentation a été menée dans un premier temps sur quelques rats. Les résultats préliminaires ont été très encourageants. Cependant, le protocole de dégradation n'a malheureusement pas pu être reproductible sur un plus grand nombre de rats. Nous avons, néanmoins jugé intéressant de décrire brièvement ci-dessous les expérimentations et les résultats obtenus.

B. DEGRADATION DES PROTEOGLYCANES ET DU COLLAGENE PAR LA PAPAINE

1. Protocole expérimental

Les enzymes dégradant spécifiquement le collagène comme la collagénase altèrent le réseau collagénique de façon trop rapide et ne permettent pas l'étude de l'interaction de l'onde ultrasonore avec le collagène à différents stades de dégradation. La papaine présente l'inconvénient de dégrader les PG et le collagène, mais a l'avantage de dégrader le cartilage suffisamment lentement pour permettre l'exploration ultrasonore du cartilage lors de la dégradation du réseau collagénique. Mais deux problèmes subsistent au sujet de la papaine : la reproductibilité de son activité et son mode d'action liée à une température élevée (60°C) susceptible de dénaturer le tissu cartilagineux. Avec la hyaluronidase, les résultats histologiques et biochimiques ont montré que l'activité de l'enzyme est parfaitement reproductible. En ce qui concerne la papaine, les résultats montrent qu'il est difficile de reproduire de façon identique la dégradation du cartilage par cette enzyme qui agit rapidement (en quelques minutes) empêchant un contrôle précis de cette dégradation. C'est pourquoi nous avons dû renoncer à une étude similaire à celle sur la hyaluronidase sur un nombre important d'animaux. A cause de ce manque de reproductibilité, nous présentons l'étude préliminaire sur la dégradation par la papaine.

La papaine déplete dans un premier temps les PG, suivant plus ou moins le mode de dégradation de la hyaluronidase et dégrade dans un deuxième temps le réseau collagénique suivant un front parallèle à la surface articulaire. Ce front est une stricte séparation entre un tissu composé d'un réseau collagénique non dégradé et le sérum physiologique prenant la place du tissu dégradé. L'étude de la rétrodiffusion en fonction de la dégradation n'est possible qu'au tout début de la dégradation du réseau collagénique au niveau de la surface articulaire qui concerne un seul rat.

Les tests préliminaires ont pour but de déterminer le temps optimal d'incubation des rotules dans la solution enzymatique correspondant au début de la dégradation du réseau collagénique. Quatre rats de caractéristiques semblables à celles des rats de l'expérience précédente (mâles de race Wistar âgés de 5 semaines et pesant 125 g environ) sont utilisés. Après avoir été prélevées, les rotules servant à la dégradation sont mises à incuber dans 1 ml de solution contenant 15 mg de papaine à une température de 60 °C et un pH de 6,2 pendant 5,

8, 10 et 15 minutes (un animal pour chaque temps). Les rotules sont ensuite lavées pendant une minute dans 2 ml d'une solution d'inhibiteurs de la papaïne (MIA) qui bloque la réaction enzymatique. L'exploration ultrasonore du cartilage et l'étude histologique se déroulent comme dans l'expérience précédente.

2. Résultats

a. Echographie

Seules sont présentées les images échographiques de cartilage des temps d'incubation de 10 et de 15 minutes correspondant respectivement au début de la dégradation du réseau collagénique au niveau de la surface articulaire et à un stade avancé de la dégradation du cartilage (Figure 12).

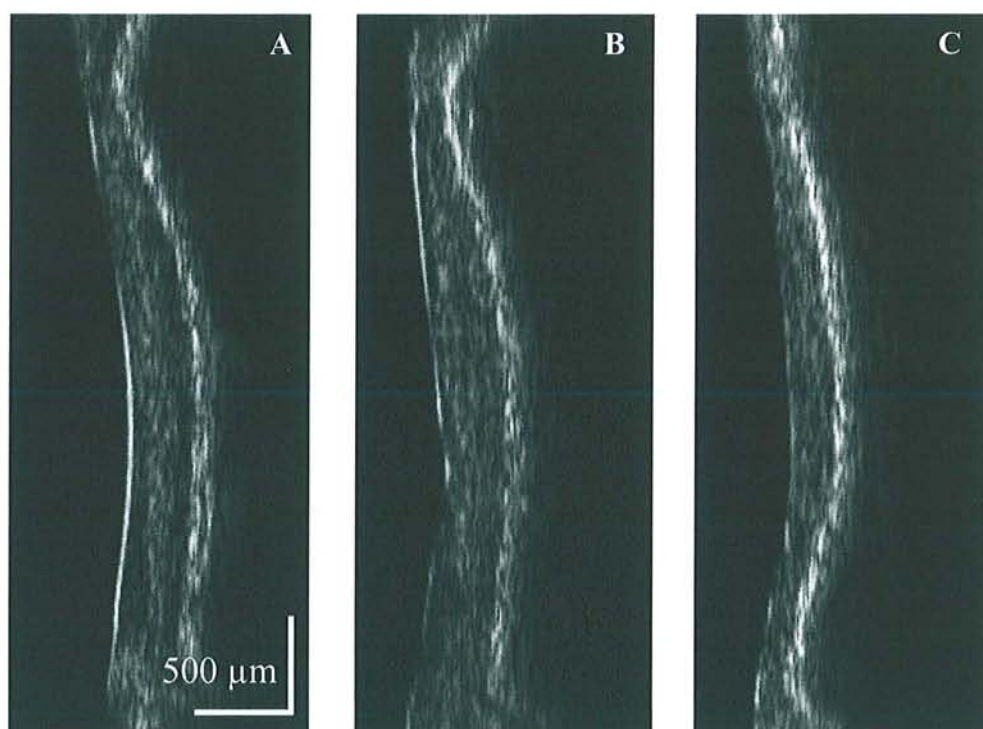


Figure 12 : images échographiques des cartilages témoin (A) et dégradé (B) (10 minutes) et dégradé (C) (15 minutes) (de gauche à droite). L'image B présente un cartilage dont seule la surface semble être altérée. L'image C présente un cartilage détruit de façon importante (diminution de l'épaisseur du cartilage) et une augmentation de l'échogénicité de l'interface cartilage-os

Pour le temps d'incubation de 10 minutes, l'image du cartilage témoin présente les mêmes caractéristiques que l'image du cartilage témoin immature de l'expérience précédente. Le cartilage dégradé présente une diminution et une irrégularité spatiale de l'échogénicité de la surface articulaire, un aspect bilaminaire moins marqué, une rétrodiffusion plus homogène selon la profondeur et une légère diminution de l'échogénicité de l'interface os/cartilage.

On observe ainsi que la dégradation induit une très forte baisse de la réflexivité de la surface articulaire, alors qu'aucun changement n'a été détecté au niveau de la rétrodiffusion de la structure interne du cartilage.

Pour le temps d'incubation de 15 minutes, l'image échographique du cartilage témoin n'est pas présentée car elle ne montre pas de différence par rapport à l'image échographique du cartilage témoin du temps d'incubation de 10 minutes. L'image du cartilage dégradé présente un cartilage plus mince, une échogénicité plus faible de la surface articulaire et une échogénicité plus importante de l'interface entre le cartilage et l'os par rapport à l'image du cartilage témoin.

b. Histologie

Sont présentées les images des coupes colorées au rouge sirius des cartilages témoin et dégradé pour le temps d'incubation de 10 minutes (Figures 13 et 14) et du cartilage dégradé pour le temps d'incubation de 15 minutes (Figure 15).

Pour le temps d'incubation de 10 minutes, les images de gauche et de droite sont obtenues respectivement en lumière normale et polarisée. Les images des coupes histologiques colorées au bleu de toluidine ne sont pas présentées car elles montrent le même aspect que celui des images présentées dans le cadre de l'étude sur la dégradation par la hyaluronidase.

Il est juste présenté pour le temps d'incubation de 15 minutes une image de coupe colorée au rouge sirius prise en lumière normale afin de voir la destruction importante des couches supérieures du cartilage (superficielle et transitionnelle) du cartilage par l'action de la papaïne.

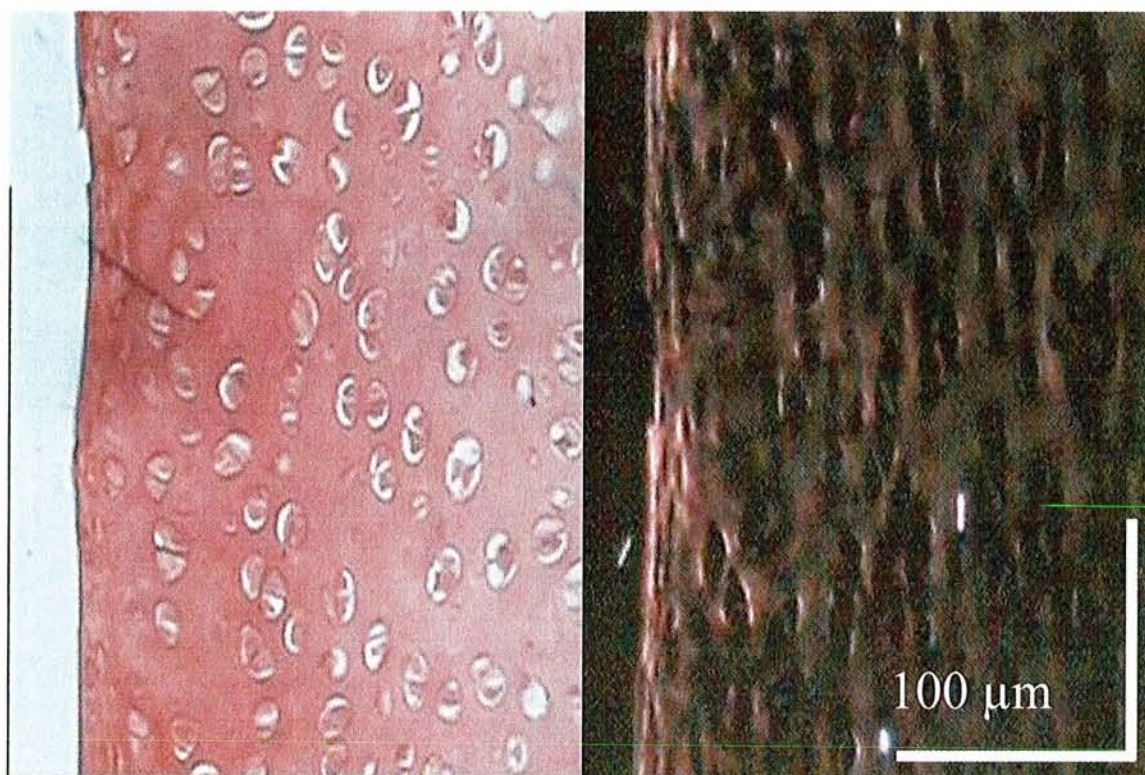
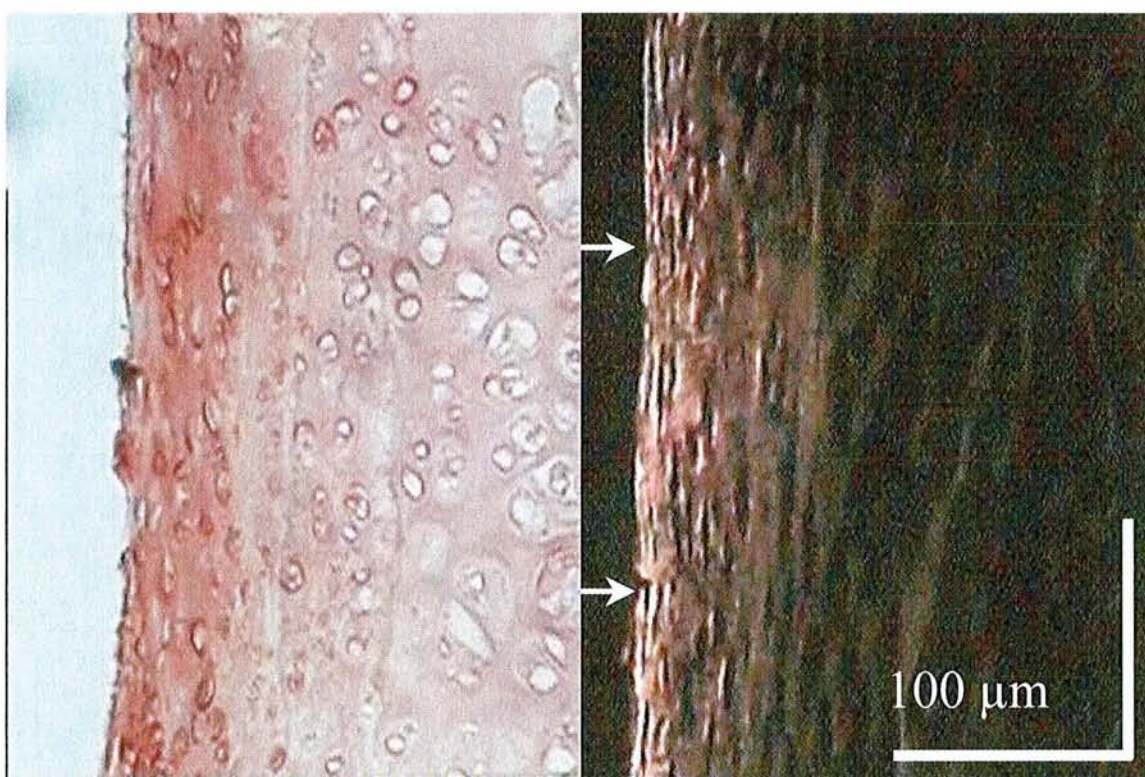


Figure 13 : images de coupes histologiques du cartilage témoin (10 minutes)



**Figure 14 : images de coupes histologiques du cartilage dégradé (10 minutes)
(les flèches blanches indiquent les fibres cassées lors de la dégradation)**

Pour le temps d'incubation de 10 minutes, seul l'aspect de la surface est décrit en vue d'expliquer les variations du signal réfléchi par la surface articulaire induites par la dégradation. L'intérieur du cartilage présente le même aspect que celui observé sur les images de l'expérience précédente. Sur les images en lumière normale, la surface articulaire du cartilage dégradé apparaît moins nette et moins régulière que celle du cartilage témoin. La comparaison des images en lumière polarisée montre qu'en parallèle d'un aspect moins net la surface articulaire du cartilage dégradé présente un certain nombre de fibres très fines de couleur blanche qui sont cassées par endroit (indiquées par des flèches blanches sur l'image en lumière polarisée). Par ailleurs, il semble que le cartilage dégradé présente un début de fibrillation de surface où on peut remarquer une diminution du diamètre des fibres de collagène en parallèle d'une augmentation de l'espace interfibrillaire.

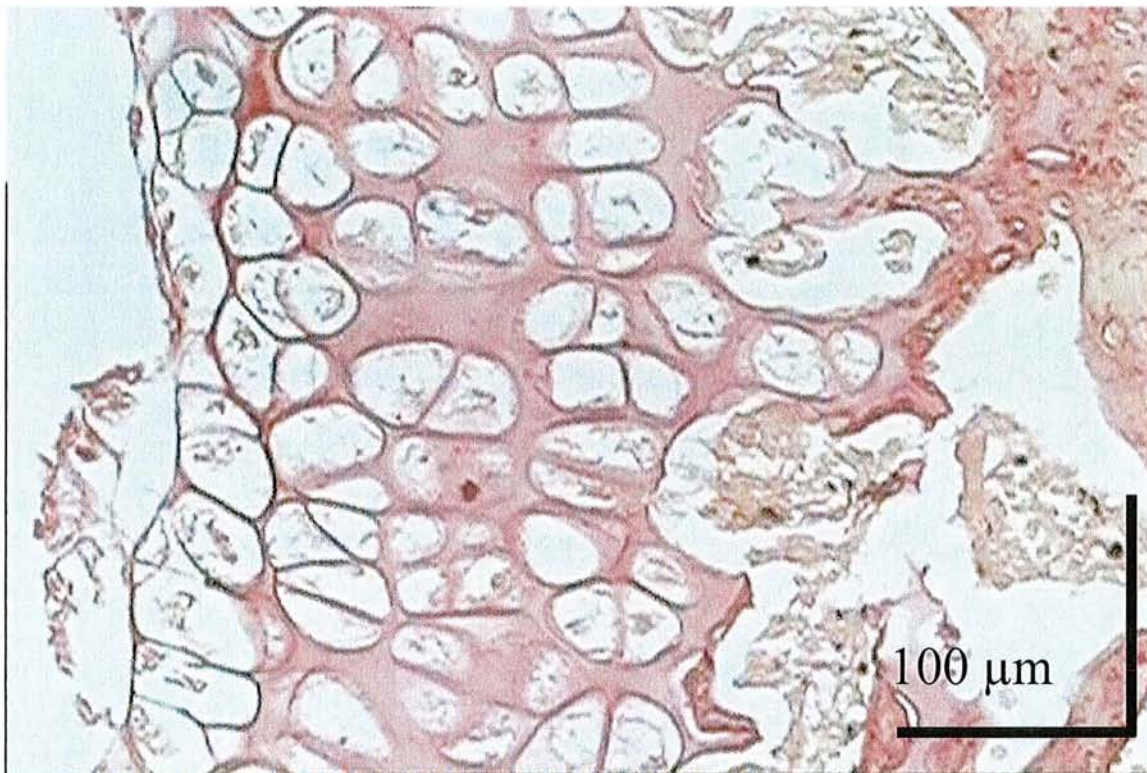


Figure 15: image de coupe histologique du cartilage dégradé (15minutes) montrant une altération importante du cartilage (les couches superficielle et transitionnelle du cartilage immature ont été détruites)

Pour le temps d'incubation de 15 minutes, le cartilage est dégradé, il ne subsiste donc qu'en partie la couche hypertrophique et les couches superficielle et transitionnelle ont été détruites par la papaïne.

3. Discussion

Pour le temps 10minutes, les images histologiques montrent que les cartilages témoin et dégradé présentent le même nombre de couches ayant des épaisseurs semblables pour chacune d'entre elles. Seule la surface du cartilage dégradé est altérée. Ce résultat est bien en accord avec l'expérience précédente qui a montré clairement que la perte en PG du cartilage n'entraîne pas de modification du signal rétrodiffusé. La surface est irrégulière et accidentée. Certains faisceaux de fibres de collagène formant la surface sont cassés et sont plus fins et plus espacés que ceux du cartilage témoin. Ces modifications expliquent la diminution importante de l'amplitude du signal ultrasonore réfléchi par la surface. D'autres études ont décrit ce phénomène d'altération du réseau collagénique lors de la dégradation du cartilage par la papaïne [O'connor, 1984; Grevenstein, 1991]. Cette expérience semble indiquer que le collagène a une influence prépondérante sur le signal ultrasonore, tout au moins pour le signal réfléchi par la surface articulaire et corrobore les travaux de Töyräs qui montre que la dégradation du cartilage par la collagénase, enzyme dégradant spécifiquement le collagène, entraîne une diminution du coefficient de réflexion.

CONCLUSION

Ces différentes expériences ont permis de montrer l'influence des principaux constituants biochimiques du cartilage sur les signaux ultrasonores réfléchis par la surface articulaire et rétrodiffusé par la matrice interne du cartilage. La déplétion des PG montre que ce constituant n'a pas d'influence sur la réflexion par la surface articulaire et sur la rétrodiffusion apparente par la matrice interne de l'onde ultrasonore. L'étude sur la dégradation du réseau collagénique suggère que le collagène a une influence prépondérante sur la réflexion de l'onde. La cinétique de digestion de la papaïne étant difficilement contrôlable et son mode d'action étant non sélectif (dégradation des PG, puis du collagène), il n'a pas été possible d'analyser l'influence du collagène sur le signal échographique en dehors de la zone superficielle. Dans le chapitre précédent, il a été montré comment les chondrocytes ne semblent pas influencer de façon prépondérante le signal rétrodiffusé par la matrice interne. Le collagène est donc le constituant biochimique du cartilage qui est responsable de la rétrodiffusion. Aussi dans le but d'approfondir la compréhension de l'interaction des ultrasons avec le cartilage, nous exposerons dans le chapitre suivant la mesure de nouveaux paramètres ultrasonores, la variation de l'atténuation des ultrasons en fonction de la fréquence et la célérité des ultrasons.

Ces études ont fait l'objet d'une publication présentée à la suite du chapitre.

Correlation of high Frequency Ultrasound Backscatter with Cartilage Matrix Constituents

B. PELLAUMAIL¹, D. LOEUILLE², A. WATRIN², P. NETTER², G. BERGER¹, A. SAÏED¹

¹Lab. Imagerie Paramétrique CNRS UMR 7623, 15 rue de l'École de Médecine 75006 Paris, FRANCE

²Lab. Pharmacologie URA CNRS 1288, BP 184 Faculté de Médecine 54505 Nancy, France

Abstract - We have shown in a previous work that high frequency quantitative backscatter ultrasound (US) was sensitive to progressive changes related to various stages of osteoarthritis (OA) and to normal development of rat patellar cartilage. The goal of the current study was to identify the cartilage matrix constituents that are responsible for the changes in the echographic signal. To this end, echographic signals from the cartilage were explored after proteoglycan (PG) and collagen degradation by hyaluronidase and papain enzymes. The patellar cartilages of immature rats were degraded and examined *in vitro* using a three-dimensional (3-D) 55 MHz backscatter ultrasound scanner. B-scan images were correlated with histologic images. For all the specimens US images of control cartilages showed a hyperechoic internal structure involving mainly the first two-thirds of the tissue and consisting of the transitional and deep layers of the cartilage. The backscattered signal from degraded cartilage did not change when hyaluronidase has selectively extracted an important part of the PGs during 6 hours. Whereas the echographic signal from the cartilage surface was significantly affected after 10-minute-papain degradation which induced a first stage of collagen network alteration. These preliminary results demonstrate that high frequency ultrasound does not provide information about variations in PG content but seems to be very sensitive to changes in collagen fibrillar network.

INTRODUCTION

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue, mainly with regard to its physical properties. Its degeneration is one of the predominant characteristics of OA which is the most common joint disease in humans [1]. The articular cartilage contains relatively few cells embedded in a large extracellular matrix rich in hydrophilic PGs, collagen fibers and other matrix constituents. The different components of the tissue are interrelated and contribute to its structural integrity. The collagen fiber characteristics and organization vary in the tissue. The PGs are bound to the collagen fibers and occupy a volume which is restricted by the collagenous fibrillar network in which they are immobilized [2]. The cartilage structure is well suited to its required mechanical function in the joint. The tissue morphology is anisotropic and is composed of three main layers from the surface to the subchondral bone. These layers are

characterized by a heterogeneity in the concentration of the cartilage principal constituents (PGs and collagen), in collagen fiber orientation and in cell density and size. During the maturation or under pathological process such as OA the cartilage thickness and structure undergo a progressive change. The structural modifications involve mainly the PG and collagen content and the organization of the cross-linked collagen fibrillar network. In particular, during the cartilage development the fiber organization changes, the collagen content increases while the PG content and cellularity decrease. Under OA disease process the PG content is reduced, the cells and collagen fibers are highly altered and the collagen network is disorganized [3,4].

A high resolution imaging technique is required for the non invasive detection and quantitative assessment of early stage of the cartilage alterations. We have shown in previous studies performed on rat cartilage that high frequency US can detect early cartilage lesions due to a chemically induced OA and is also sensitive to changes related to cartilage maturation. The method included ultrasonic imaging and quantitative evaluation using acoustic parameters (integrated reflection and apparent integrated backscatter coefficients) [5,6]. In particular, we have reported that integrated backscatter decreases with age and increases during the progression of OA.

The purpose of the current study is to identify the matrix constituents that are responsible for the variation of ultrasound backscatter. To this end, the PGs and collagen of rat patellar cartilage are selectively degraded using specific enzymes. 3-D US exploration of the patellae was performed using a 55 MHz acoustical microscope. US images were compared to histologic images.

EXPERIMENTAL AND MEASUREMENT PROCEDURE

1 - Degradation by enzymes

Hyaluronidase and papain enzymes were used. Hyaluronidase selectively degrades the PGs whereas the papain extracts the PGs at first then disorganizes and destroys the collagen network. Six male wistar rats (130 g in weight, 4-5 week-old) were studied: the patellae of 3 rats were used for hyaluronidase degradation and the others for papain degradation. For 5 rats of the group, the right

patella of each rat was degraded while the left patella served as a control. For one rat, both patellae were degraded by hyaluronidase. Different times of degradation were studied as described in the following table.

Hyaluronidase			Papain		
	patellae			patellae	
	left	right		left	right
rat 1	ND*	2 H	rat 4	ND	15 min
rat 2	ND	6 H	rat 5	ND	5 min
rat 3	6 H	2 H	rat 6	ND	10 min

Time of degradation.

* non degraded (control)

Protocol of degradation by hyaluronidase - The patellae of rat 1, 2 and 3 were degraded in 1 ml of 0.1 M sodium acetate in saline solution which contained 1000 U/ml of hyaluronidase from bovine testes (2950 U/mg, pH = 5.11) at 37°C. The patellae were washed in 30 ml of solution of 0.1 M sodium acetate and immersed for 2 minutes in protease inhibitor solution.

Protocol of degradation by papain - The patellae of rat 4, 5 and 6 were degraded in 1 ml of papain solution which contained 15 mg/ml (pH = 6.2) at 60°C. The patellae were washed in 30 ml of buffer solution for 30 seconds and immersed in 2 ml of protease inhibitor solution of papain (mono-iodo-acetic acid) for 1 minute.

2 - Acquisition of ultrasonic data

After cartilage degradation, a 55 MHz Scanning Backscatter Microscope was used to acquire ultrasonic signal from the patellae. The system operates with a PVDF 125 MHz resonant frequency focused transducer which is excited by a pulser receiver (Panametrics 5900 PR). The spectrum of the generated US pulse is centered at 55 MHz at focus (7.5mm). The -6 dB axial and lateral resolutions are 20 microns and 65 microns, respectively. The radio frequency (rf) signal backscattered by the tissue is

amplified and digitized at 400 MHz by a 8-bit digital oscilloscope (Lecroy 9450A) and transferred to a PC computer for image and data processing. For signal acquisition, the ultrasound wave was focused beneath the cartilage surface. The transducer scanned the sample in two perpendicular directions using a micropositioning system (Micro-control, Newport) which has 1 micron resolution step and was controlled by the PC. The patellae 5 mm by 2 mm in size were scanned with a 40 µm increment step so that 3-D information on both cartilage and subchondral bone was acquired. At each transducer position the rf signal was time averaged to improve the signal to noise ratio and transferred to the computer for the processing of B-mode images.

3 - Histological preparation

After ultrasonic acquisition, the patellae were fixed in formalin (12%) for 72 hours, then decalcified in EDTA for 7 to 10 days, embedded in paraffin and cut into 5 µm thick slices. Cartilage sections were stained with Safranin-O and Picrosirius red for the qualitative evaluation of PG and collagen content, respectively. For the evaluation of collagen network organization, the sections stained with Picrosirius red were viewed with polarized light. The histologic images were digitized using a 3 CCD camera (24 bits).

RESULTS

1 - Control patellae

55 MHz image of an immature rat patellar cartilage and its corresponding histologic sections are shown in figure 1. The B-scan image exhibited two hyperechoic bands which delimit the cartilage surface and the cartilage-calcified cartilage/bone interface. The cartilage interfaces are separated by a hyperechoic internal structure involving mainly the first two-thirds of the tissue. The cartilage thickness is approximately 350 µm.

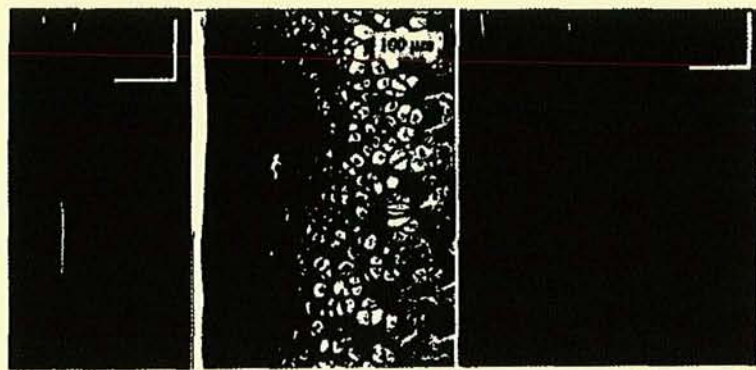


Figure 1 : images of control patella

(a) 55 MHz B-scan image. The articular surface is on the left side and the cartilage bone interface is on the right side.

(b) histologic section stained with Safranin-O

(c) histologic section stained with Picrosirius red and viewed with polarized light

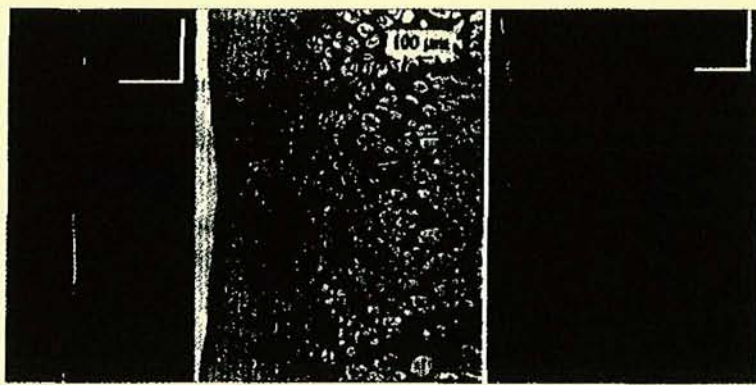


Figure 2 : images of cartilage after 6-hour- hyaluronidase degradation

(a) 55 MHz B-scan image

(b) histologic section stained with Safranin-O

(c) histologic section stained with Picrosirius red and viewed with polarized light

Histologic section stained with Safranin-O revealed three zones which are characterized by cells (chondrocytes) of different shape and size surrounded by a matrix of collagen fibers and PGs. The Safranin-O staining appeared almost homogeneous in the extracellular matrix. Histologic section stained with Picrosirius red showed connective tissue in polarized light and revealed the anisotropic structure of the cartilage. The tissue consists of three layers demarcated by collagen fibers of different patterns. The superficial zone or the tangential layer occupies 5 to 10% of the cartilage thickness. In this layer the polarization light was intense and orange indicating a high density of collagen fibers which are packed parallel to the surface. As indicated by Safranin-O image the superficial layer contains a low density of cells which have an ellipsoidal shape. In the transitional layer which appears green in polarized light and consists of 40% of the cartilage thickness the collagen fibers have an alveolar organization. In this zone the cells have a spherical shape and are randomly distributed. The deep zone or radial layer (50 % of the cartilage thickness) appeared almost dark indicating a low density of collagen fibers. The fibers are oriented perpendicular to the articular surface and surround the hypertrophic cells which are grouped and occupy the most important volume of the zone. It is important to notice that the maturation period of the cartilage is characterized by an increased structural anisotropy.

2 - Degradation by hyaluronidase

2 Hours - B-scan image of degraded patella showed that cartilage thickness and echogenicity did not change after 2 hours of PG degradation. Safranin-O image exhibited a decrease of the staining intensity in the most part of the transitional layer. The cellularity was not altered. Polarized light image revealed an intense transitional layer which became orange.

6 Hours - Images of the cartilage obtained after 6-hour-degradation are shown in figure 2. The backscattered signal from the cartilage did not change and US image displayed the same aspect than that of control. On Safranin-O image the matrix was almost faded indicating a depletion of an important part of the PGs while the cell density and size were not modified. Histologic section visualized with polarized light displayed an organized collagen fibrillar network having an intense orange color. The change in the staining intensity and in wavelength involved almost all the cartilage. However, the orientation of collagen fibers was not altered by the degradation. The increase of the staining intensity and wavelength reveals a thickening of the diameter of the collagen fibers due to the PG depletion. In fact, Dayan *et al.* have shown that polarization wavelength of collagen fibers increases when the diameter of the fibers increases [7].

3 - Degradation by papain

5 minutes - This time of papain degradation induced the same results than 6-hour-hyaluronidase degradation. The B-scan of degraded cartilage was similar to that of control. Whereas Safranin-O image showed a faded matrix relative to that of control indicating a depletion of PGs in the half of the transitional layer. Polarized light image showed that the staining of the transitional layer was orange and more intense than that of control indicating an increase of the collagen fiber diameter.

10 minutes - Echographic image (figure 3) showed a discontinuous and less echoic cartilage surface while the cartilage thickness and the echogenicity of its internal structure were not changed. The cellularity in the tangential and transitional layers displayed by the Safranin-O section was similar to that of control cartilage. Image of collagen network obtained with polarized light exhibited an intense green color. The cartilage surface was discontinuous and

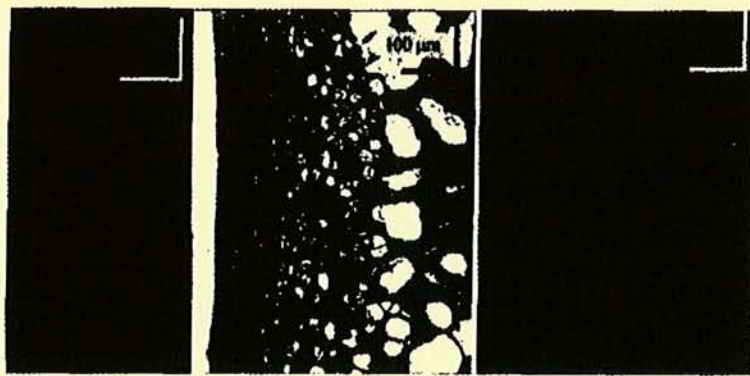


Figure 3 : images of cartilage after 10-minute-degradation by papain

(a) 50 MHz B-scan image

(b) histologic section stained with Safranin-O

(c) histologic section stained with Picrosirius red and viewed with polarized light

altered because the collagen fibers in the superficial layer are thinner and less tightly packed than those of control cartilage. This demonstrates the first stage of the collagen network alteration by the enzyme.

15 minutes - A loss of the most part of the cartilage was observed on US image after 15 minutes of degradation and was confirmed by histologic findings. Safranin-O image showed a depletion of PGs in the remaining deep layer of the cartilage.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The purpose of the current work was to determine the components of immature cartilage that interacts with backscattered ultrasound. Collagen and PGs which are the main constituents of the tissue were selectively degraded by specific enzymes. Hyaluronidase enzyme did not change the backscatter ultrasound while histologic findings revealed a loss of an important part of the PG content and a consequent increase of collagen fiber diameter, however, the fibrillar collagen network and the cellularity were not modified. This suggests that US is not sensitive to PG content neither to collagen fiber diameter which are of the order of 2 μm and are very small compared to the wavelength. In fact, at 70 MHz which is the highest frequency of the useful signal the wavelength is 22 μm . With regard to the effect of papain, 5-minute-degradation resulted in similar US and histologic changes than those induced by 6-hour-hyaluronidase degradation. Whereas after 10-minute-degradation, the enzyme induced a PG depletion and started to alter the fibrillar collagen network of the cartilage surface but the cellularity was not modified. Thus, the local changes in the echographic signal demonstrate that US does not provide information about cellularity and PG content but is significantly affected by changes in collagen fibers. A study performed on a larger number of rats with lower doses of papain will be conducted to confirm our findings. Nevertheless, this original approach provides a better understanding of the interaction between high frequency ultrasound and cartilage

biochemical constituents. The current results suggest that high resolution ultrasound could be used as a non destructive alternative to provide valuable and local information on collagen fibrillar network modifications and may be very helpful for the quantitative evaluation of pharmacological treatment effects.

REFERENCES

- [1] J. H. Aubray et al, "Pathology of osteoarthritis", in *Arthritis and Allied Conditions*, Philadelphia : Lea & Febiger, 1989, pp. 1571-1580.
- [2] J. M. Williams et al, "Alteration and Recovery of the Spatial Orientation of the Collagen Network of Articular Cartilage in Adolescent Rabbits Following Intra-articular Chymopapain Injection", *Connective Tissue Research*, vol. 34, No. 2, pp. 105-117, 1996.
- [3] E. B. Hunziker, "Articular Cartilage Structure in Humans and Experimental Animals", in *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, New-York : Raven Press, Ltd., 1992, pp. 183-199.
- [4] C. A. McDevitt, "Biochemistry of articular cartilage Nature of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthritis", *Ann. Rheum. Dis*, vol. 32, pp.364-378, 1973.
- [5] A. Saïed et al, "Assessment of articular cartilage and subchondral bone subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro", *J Bone Miner Res*, vol. 12, pp. 1378-1386, 1997.
- [6] E. Cherin et al, "Evaluation of acoustical parameter sensitivity to age-related and osteoarthritic changes in articular cartilage using 50 MHz ultrasound", *Ultrasound in Med. & Biol.*, vol. 24, No. 3, pp. 341-354, 1998.
- [7] D. Dayan et al, "Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers ?", *Histochemistry*, vol. 93, pp. 27-29, 1989.

**CHAPITRE V : CARACTERISATION PAR LA CELERITE ET
L'ATTENUATION DES STADES MATURES ET IMMATURES**

INTRODUCTION

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le collagène semble être le constituant matriciel principal responsable de l'interaction de l'onde ultrasonore avec le tissu cartilagineux. Dans le but d'approfondir la compréhension de cette interaction, nous exposons maintenant l'étude de la variation en fréquence de l'atténuation et la célérité des ultrasons. En raison de difficultés liées à la préparation des échantillons, il n'a pas été possible d'effectuer ces mesures dans une direction de propagation perpendiculaire à la surface du cartilage comme pour l'estimation de la rétrodiffusion. La mesure de l'atténuation et de la célérité est réalisée par une méthode de transmission. Une telle orientation nécessite de séparer le cartilage articulaire de l'os sous-chondral, ce qui ne peut-être réalisé sans risque de détérioration des échantillons et de la forme en selle de cheval. Nous avons donc opté pour une exploration de sections de rotule coupées selon le plan sagittal. La direction du faisceau ultrasonore est perpendiculaire au plan de coupe. Bien que cette solution ait comme inconvénient une direction du faisceau ultrasonore différente de celle employée dans la mesure des coefficients de réflexion et de rétrodiffusion, elle permet de réaliser une cartographie des paramètres mesurés en fonction de la profondeur du cartilage (de la surface à l'os sous-chondral).

A. PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET METHODES

1. Préparation des échantillons

L'étude a porté sur 12 rats répartis en deux groupes d'âge, l'un au stade immature (6 rats de 150 g) et l'autre au stade mature (6 rats de 300 g). Une seule rotule par rat a été explorée.

Après congélation des rotules, une section a été coupée au centre de la rotule, parallèlement au plan sagittal avec un microtome à congélation. L'épaisseur des coupes se situe entre 150 μm et 300 μm .

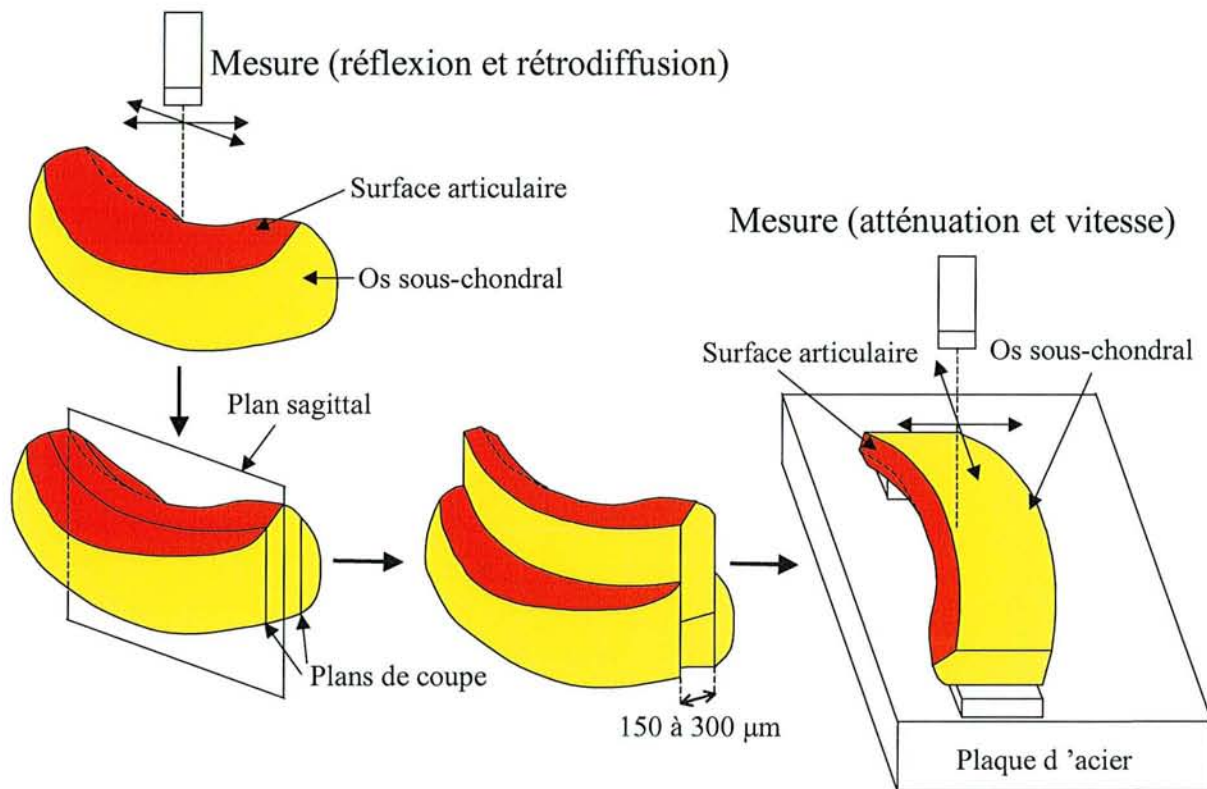


Figure 1 : Schémas de coupe et de montage des échantillons pour l'exploration ultrasonore

2. Etude acoustique

Les rotules sont décongelées et placées dans le sérum physiologique. Avant l'exploration ultrasonore, elles subissent une opération de dégazage à l'aide d'une pompe à vide. Une plaque d'acier sert de référence. Nous avons utilisé la méthode de substitution.

Le manque de planéité des surfaces de coupe empêche les échantillons d'être en contact avec la plaque d'acier en chaque point de la surface. Dans les régions où le contact fait défaut, la distance entre le tissu et la plaque d'acier peut être inférieure à la résolution axiale de la sonde. Dans ce cas, le transducteur ne reçoit qu'un seul signal provenant à la fois de la face arrière du tissu et de la plaque d'acier. La déformation de ce signal empêche une estimation correcte des paramètres de célérité et d'atténuation. Il est donc nécessaire de placer les coupes au-dessus de la plaque d'acier.

Le transducteur est focalisé sur la plaque d'acier en présence du tissu. Le faisceau ultrasonore de la sonde est perpendiculaire au plan de coupe de telle façon que les différentes couches du cartilage sont explorées indépendamment les unes des autres. La sonde balaie le cartilage dans un plan parallèle au plan de coupe selon deux axes perpendiculaires, l'un et

l'autre étant respectivement parallèle et perpendiculaire à la surface articulaire. Dans la figure suivante est représentée la zone de la coupe de tissu explorée par la sonde ultrasonore.

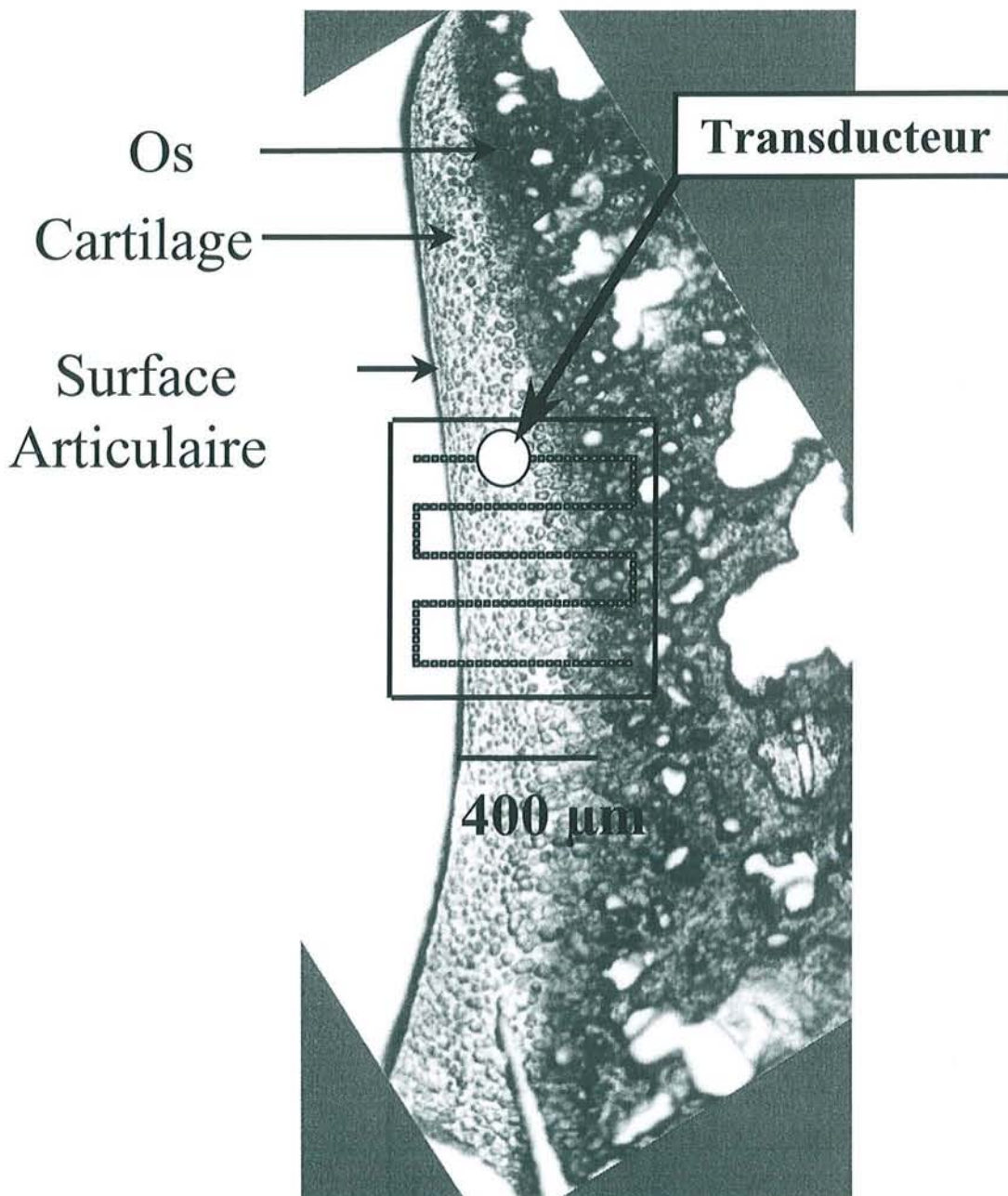


Figure 2 : Schéma de balayage du transducteur

Cette zone représente un rectangle dont les dimensions sont de 700 μm le long de l'axe perpendiculaire à la surface articulaire (axe de profondeur du cartilage) et de 800 μm le long de l'axe parallèle à la surface articulaire avec des pas de balayage respectifs de 20 μm et de 50 μm pour les axes perpendiculaire et parallèle à la surface articulaire. Le cartilage est

exploré sur l'ensemble de son épaisseur (de la surface articulaire à l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral).

En chaque point du balayage, la ligne échographique acquise présente trois échos : les signaux d'entrée et de sortie dans le tissu biologique et le signal réfléchi par la plaque d'acier à travers le tissu comme le montre la figure 3. Afin de calculer correctement les paramètres de célérité et d'atténuation, aucun des trois échos n'est saturé. Mais la faible amplitude des deux premiers échos ne permet pas de calculer avec précision la célérité des ultrasons dans le cartilage. Dans le but de déterminer avec précision cette célérité, une deuxième acquisition est réalisée en chaque point du balayage où l'écho de la plaque d'acier est saturé comme le montre la figure 4. Cette saturation permet d'enregistrer les échos d'entrée et de sortie du tissu avec une plus grande dynamique. Un seul tir de référence est enregistré pour le calcul des paramètres.

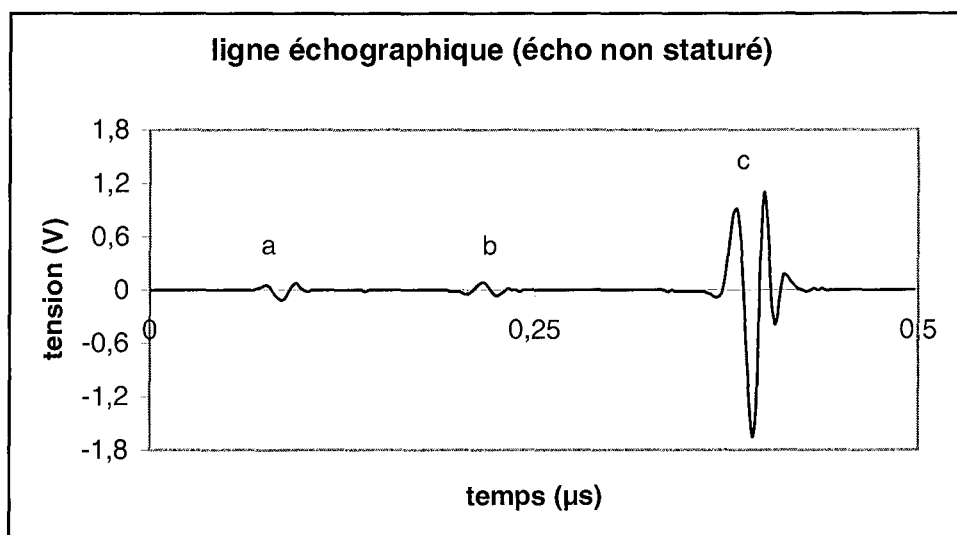


Figure 3 : Ligne échographique dont l'écho de la plaque d'acier n'est pas saturé
(a : écho d'entrée dans le tissu, b : écho de sortie dans le tissu,
c : écho de la plaque d'acier à travers le tissu)

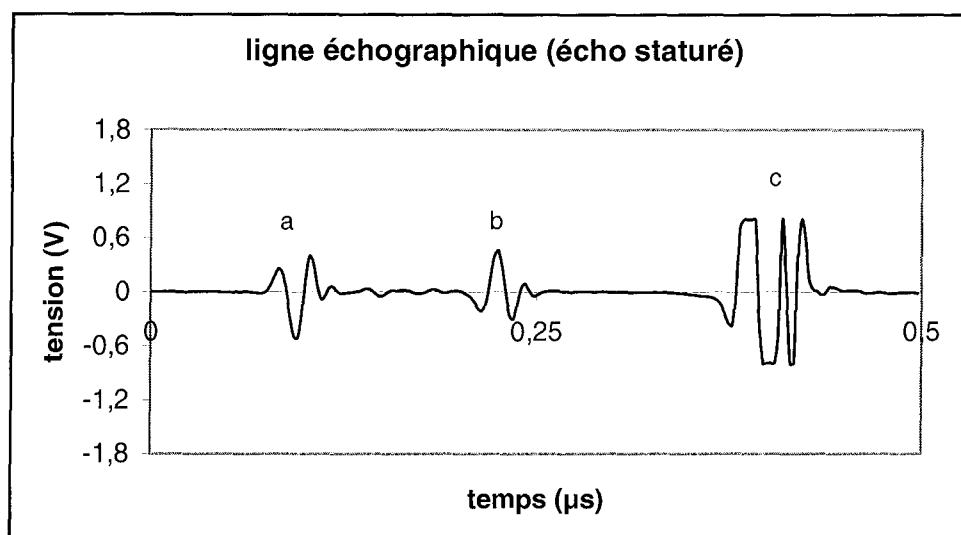


Figure 4 : Ligne échographique dont l'écho de la plaque d'acier est saturé

(a : écho d'entrée dans le tissu, b : écho de sortie dans le tissu,
c : écho de la plaque d'acier à travers le tissu)

Les paramètres de célérité et d'atténuation sont estimés selon la méthode décrite dans le second chapitre. Comme le coefficient de rétrodiffusion reflète le niveau d'énergie renvoyée par la structure de l'intérieur du cartilage vers le transducteur, l'atténuation correspond à l'énergie perdue par l'onde ultrasonore lors de sa propagation à travers le tissu biologique. Lors de nos expériences, nous avons remarqué que la variation de l'atténuation en fonction de la fréquence f varie selon une fonction de type $\alpha(f) = a.f^n$, avec n , l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation. A partir de la courbe d'atténuation normalisée par l'épaisseur locale, sont calculés dans la bande de fréquence 38-68 MHz, deux paramètres définis dans le deuxième chapitre, le coefficient intégral d'atténuation CIA et l'exposant n . Le CIA représente le niveau moyen d'énergie de l'atténuation dans une bande de fréquence déterminée et l'exposant n peut être relié à la taille des structures diffusantes si le phénomène de diffusion est prédominant dans l'atténuation.

3. Etudes histologique et biochimique

Les résultats des paramètres acoustiques sont comparés aux résultats histologiques et biochimiques de l'étude sur la maturation décrits dans le troisième chapitre (description des images histologiques et mesure des contenus globaux en PG et en collagène).

4. Statistiques

La variation des paramètres en fonction de la profondeur du cartilage est estimée par la régression linéaire. Pour la comparaison des valeurs des paramètres sont utilisés le Wilcoxon Signed-Rank Test et Wilcoxon Rank-Sum Test. Tous les tests sont calculés avec un niveau significatif $\alpha = 0,05$.

B. RESULTATS

1. Images paramétriques

a. Constructions des images

Les paramètres évalués sont représentés sous forme de cartographie et codés en niveau de gris. Le niveau de gris et les coordonnées de chaque pixel de ces images correspondent respectivement à la valeur du paramètre calculé et aux coordonnées du balayage acoustique du tissu. Les figures 5, 6 et 7 montrent pour chacun des trois paramètres les images paramétriques d'un cartilage immature à gauche et d'un cartilage mature à droite. Sur les images sont désignées en pointillé les limites indicatives entre le sérum physiologique et le cartilage (S/C) et entre le cartilage et l'os sous-chondral (C/O). Les pixels représentés entre deux limites correspondent à des positions du transducteur pour lesquelles toute la largeur du faisceau ultrasonore traverse le cartilage. Nous avons aussi évité de prendre en compte les acquisitions pour lesquelles le faisceau ultrasonore ne traverse qu'en partie le cartilage.

b. Etude des images

célérité des ultrasons

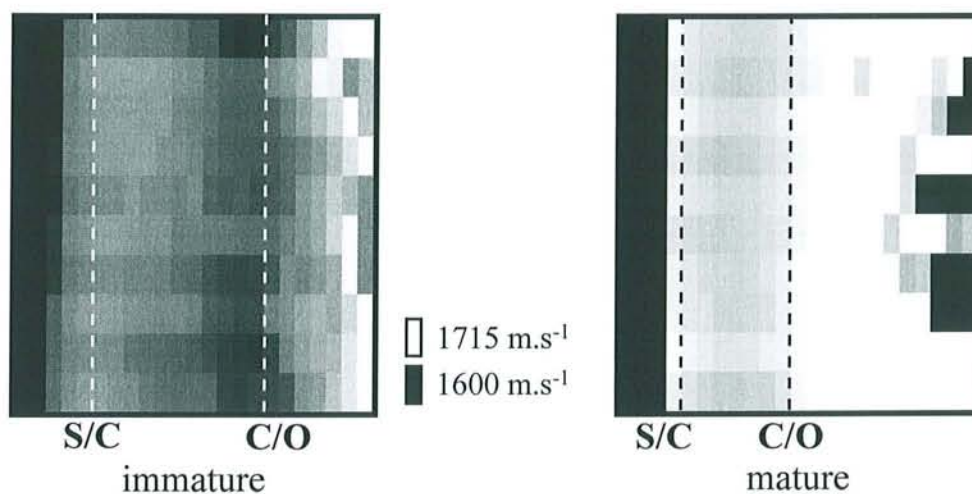


Figure 5 : Images paramétriques de la célérité des ultrasons de cartilages immature (1593-1654 m.s^{-1}) et mature (1650-1699 m.s^{-1})

coefficient intégral d'atténuation

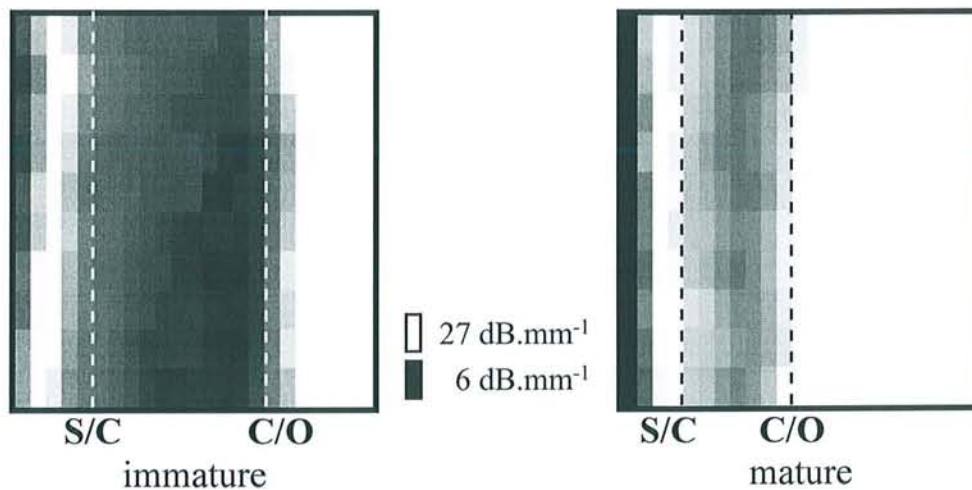


Figure 6 : Images paramétriques du coefficient intégral d'atténuation de cartilages immature (5,3-12,8 dB/mm^{-1}) et mature (9,6-27,2 dB/mm^{-1})

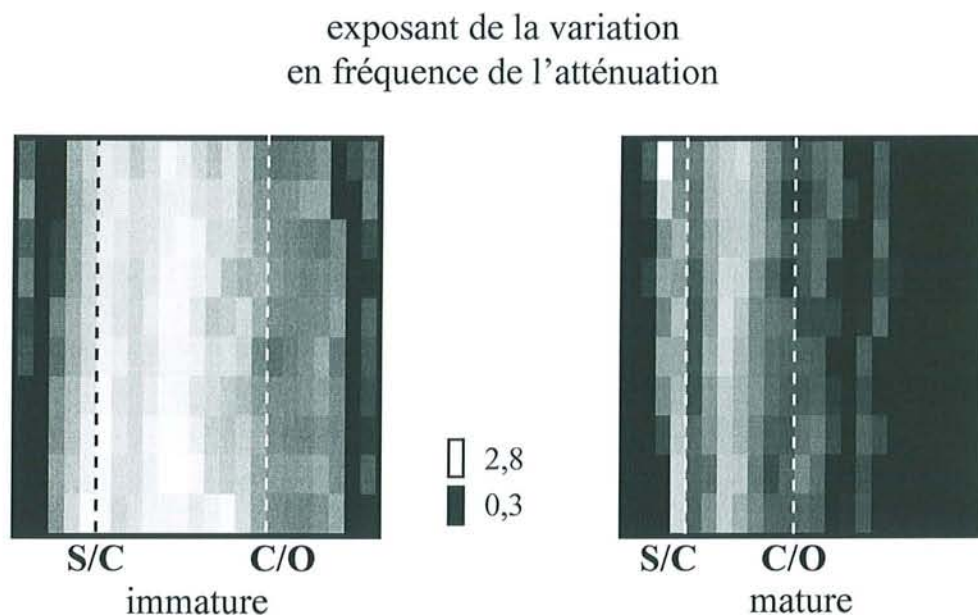


Figure 7 : Images paramétriques de l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation de cartilages immature (1,1-2,9) et mature (0,4-2,2)

A partir de la zone explorée, nous avons calculé un intervalle de variation de chaque paramètre qui correspond à la moyenne sur chaque groupe d'âge des valeurs minimales et maximales des images paramétriques. Les valeurs de la célérité sont situées entre $1582 \pm 16 \text{ m.s}^{-1}$ et $1690 \pm 45 \text{ m.s}^{-1}$ pour l'âge immature et entre $1657 \pm 12 \text{ m.s}^{-1}$ et $1717 \pm 12 \text{ m.s}^{-1}$ pour l'âge mature. Les valeurs du coefficient intégral d'atténuation sont situées entre $3,9 \pm 2,1 \text{ dB/mm}^{-1}$ et $14,1 \pm 2,9 \text{ dB/mm}^{-1}$ pour l'âge immature et entre $12,4 \pm 5,2 \text{ dB/mm}^{-1}$ et $34,5 \pm 4,2 \text{ dB/mm}^{-1}$ pour l'âge mature. Les valeurs de l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation sont situées entre $1,0 \pm 0,5$ et $3,4 \pm 0,7$ pour l'âge immature et entre $0,6 \pm 0,3$ et $2,1 \pm 0,4$ pour l'âge mature.

Sur les images, la zone de gauche correspond à l'ensemble des positions du transducteur où le faisceau ultrasonore se situe sur le bord du cartilage. Dans la zone de l'os sous-chondral, à droite sur les images, les valeurs de la célérité et du coefficient intégral d'atténuation sont généralement plus élevées que celles mesurées dans la zone du cartilage. Les limites entre les zones sont difficiles à déterminer avec précision (de l'ordre du pixel) car la résolution latérale est de l'ordre du quart ou du sixième de l'épaisseur du cartilage selon l'âge des rats. Les valeurs des paramètres dépendent essentiellement de leur position sur l'axe de profondeur du cartilage et sont indépendantes de leur coordonnée selon l'axe parallèle à la surface articulaire.

2. Profils des paramètres en fonction de la profondeur

a. Elaboration des profils

Comme la valeur des paramètres dépend uniquement de sa coordonnée selon l'axe de profondeur, on peut donc construire un profil des paramètres qui correspond à la courbe de la moyenne du paramètre calculée selon l'axe parallèle à la surface articulaire et qui est fonction de la profondeur. Ci-dessous sont présentés, pour chacun des trois paramètres, les profils correspondant à la zone du cartilage des images paramétriques décrites précédemment. Dans chaque cas on présente le profil d'un rat représentatif (Figures 8, 9 et 10).

b. Etude des profils

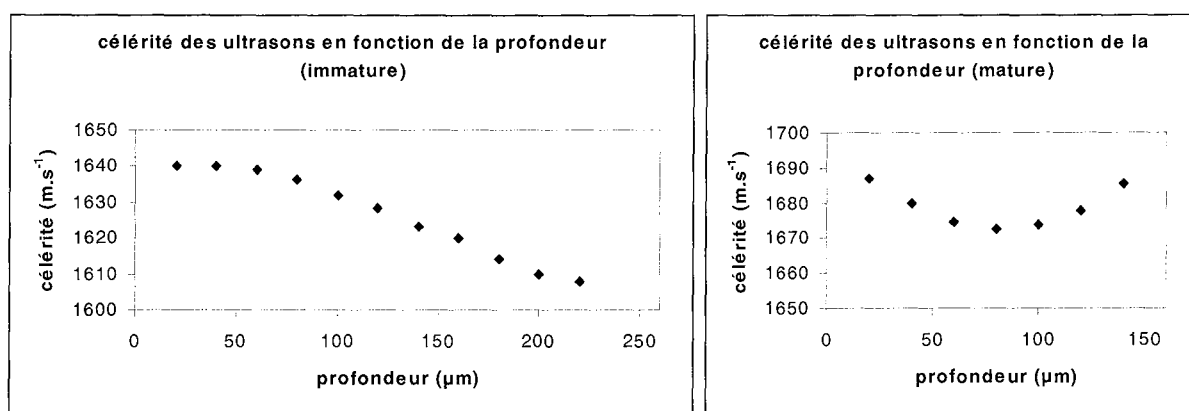


Figure 8 : Variations de la célérité des ultrasons

en fonction de la profondeur de cartilages immature ($p < 0,05$) et mature ($p > 0,05$)

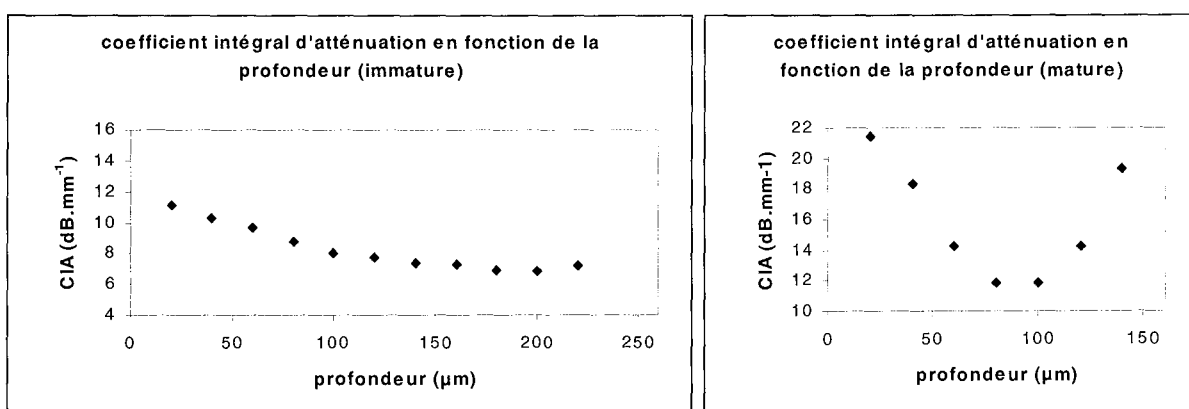


Figure 9 : Variations du coefficient intégral d'atténuation

en fonction de la profondeur de cartilages immature ($p < 0,05$) et mature ($p > 0,05$)

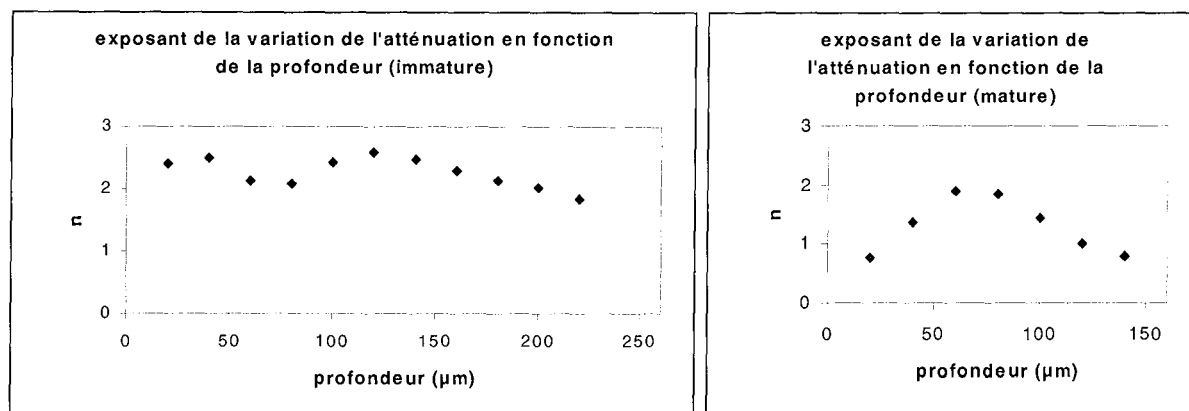


Figure 10 : Variations de l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation en fonction de la profondeur de cartilages immature ($p > 0,05$) et mature ($p > 0,05$)

Pour les rats immatures, la célérité et le coefficient intégral d'atténuation diminuent de façon significative en fonction de la profondeur ($p < 0,05$) alors que l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation ne présente pas de tendance particulière selon la profondeur ($p > 0,05$). Pour les rats matures, les profils présentent un minimum pour la célérité et le coefficient intégral d'atténuation et un maximum pour l'exposant de la variation de l'atténuation.

La difficulté de l'étude réside dans la détermination des points de chaque profil qui correspondent au tissu cartilagineux. N'ayant pas à notre disposition une image optique de la zone explorée, la détermination des limites du cartilage ne peut se faire que par l'étude des signaux échographiques. La limite entre deux tissus biologiques est repérée sur les lignes échographiques par la déformation du signal engendrée par une déviation du faisceau ultrasonore par l'interface entre les tissus biologiques. Cette déformation provoque des valeurs très élevées du coefficient intégral d'atténuation sous la forme de pics au sein des images paramétriques. Ainsi un pic semblable situé au niveau de la surface articulaire permet de repérer le début de la zone correspondant au cartilage sur les profils. En revanche, la détermination de la limite entre le cartilage et l'os sous-chondral est plus difficile. En effet, les coupes histologiques ne présentent pas de changements importants de structure, mais plutôt une modification progressive des tissus entre le cartilage et l'os. Les profils de célérité et du coefficient intégral d'atténuation présentent une augmentation des paramètres en fonction de la profondeur dans la zone proche de l'os sous-chondral (à droite sur les profils). Cette augmentation pourrait être due au fait qu'une partie du faisceau ultrasonore traverse l'os sous-chondral. Si l'on rejette des points correspondant à cette augmentation, les profils présentés

ci-dessus sont constitués de 10 points pour le rat immature et de 4 points pour le rat mature. Les zones explorées par les ultrasons correspondant à ces profils sont larges de 265 μm pour l'âge immature et de 145 μm pour l'âge mature. En moyenne sur l'ensemble des rats, les zones sont larges de 270 μm pour l'âge immature et de 130 μm pour l'âge mature. Or, les épaisseurs du cartilage (de la surface articulaire à l'os sous-chondral) mesurées en histologie sont en moyenne de 390 μm pour l'âge immature et de 225 μm pour l'âge mature. En revanche, si l'on inclut les points correspondant à l'augmentation situés dans la zone proche de l'os sous-chondral, les zones correspondant aux profils sont larges en moyenne de 305 μm pour l'âge immature et de 190 μm pour l'âge mature. L'inclusion des points permet donc d'obtenir une meilleure adéquation entre la largeur de la zone explorée par les ultrasons et l'épaisseur du cartilage mesurée sur les coupes histologiques.

3. Estimation des moyennes des paramètres à partir des profils

a. Principe de mesure

Compte tenu de la résolution latérale du transducteur (65 μm), il est difficile d'évaluer la valeur des paramètres pour les différentes couches : la couche superficielle du cartilage immature, épaisse de 20 μm environ et les couches superficielle, transitionnelle et hypertrophique du cartilage mature dont les épaisseurs sont respectivement de 20 μm , 45 μm et 25 μm environ. Néanmoins, les couches transitionnelle et hypertrophique du cartilage immature et la couche radiale du cartilage mature sont suffisamment épaisses (respectivement de 140 μm , 230 μm et 150 μm environ) pour que nous puissions évaluer la valeur moyenne des paramètres correspondant à ces zones.

Chez le rat mature, l'ensemble des couches superficielle et transitionnelle présente une épaisseur de 65 μm environ et correspond donc à la taille de la résolution latérale. Par ailleurs, l'onde ultrasonore étant proche de la surface articulaire, le signal ultrasonore peut être déformé de façon significative. Le manque de précision des limites du cartilage et la proximité de la surface articulaire empêchent de déterminer la partie du profil correspondant à cet ensemble. Bien que l'épaisseur de la couche radiale du cartilage mature ne représente que 65 % de l'épaisseur du cartilage et non sa totalité, la moyenne des paramètres calculée sur l'ensemble du profil caractérise principalement la couche radiale du cartilage mature.

Pour le rat immature, les épaisseurs des couches transitionnelle et hypertrophique sont bien supérieures à la résolution latérale. La couche superficielle étant trop fine pour être discernée,

les ultrasons caractérisent deux zones au sein du cartilage, la couche hypertrophique et un ensemble composé des couches superficielle et transitionnelle dont les épaisseurs représentent respectivement 60 % et 40 % de l'épaisseur du cartilage. Les moyennes des paramètres sur chaque moitié du profil donne une estimation des valeurs du paramètre correspondant à chacune de ces zones. Pour le rat immature, la moyenne des paramètres est calculée sur l'ensemble du profil et sur chacune de ses moitiés.

Dans les graphes suivants sont représentées les variations des trois paramètres selon la profondeur pour le cartilage immature (à gauche) et selon l'âge (à droite). Pour le cartilage immature, les zones 1 et 2 désignent respectivement les moitiés proches de la surface et de l'os sous-chondral.

Pour la comparaison des moyennes calculées sur les zones 1 et 2 du profil des cartilages immatures est utilisé un test pour valeurs appariées. Pour la comparaison des moyennes calculées sur l'ensemble du profil des cartilages matures et sur une partie (zone 1 ou 2) ou l'ensemble du profil des cartilages immatures est utilisé un test pour variables non appariées.

b. Valeurs des paramètres

(1) Célérité

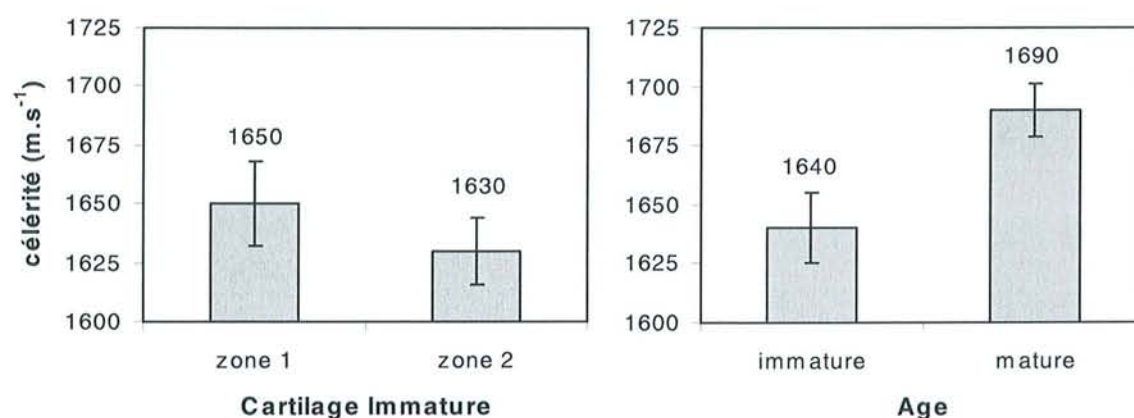


Figure 11 : Variation de la célérité de propagation des ultrasons en fonction de la profondeur chez le rat immature ($p < 0,05$) à gauche et en fonction de l'âge ($p < 0,05$) à droite

En fonction de l'âge, la célérité moyenne sur la totalité de l'épaisseur du cartilage augmente de façon significative ($p < 0,05$). Les valeurs moyennes de la célérité sur l'ensemble du cartilage sont de $1640 \pm 15 \text{ m.s}^{-1}$ pour le cartilage immature et de $1690 \pm 11 \text{ m.s}^{-1}$ pour le

cartilage mature. Chez le rat immature, la célérité diminue en fonction de la profondeur de façon significative ($p < 0,05$). Les valeurs moyennes de la célérité des ultrasons sont respectivement pour les zones 1 et 2 de $1650 \pm 18 \text{ m.s}^{-1}$ et de $1630 \pm 14 \text{ m.s}^{-1}$. Entre l'une des deux zones 1 et 2 et l'ensemble du cartilage mature, le test statistique indique que les valeurs de la célérité sont significativement différentes ($p < 0,05$).

(2) Coefficient intégral d'atténuation

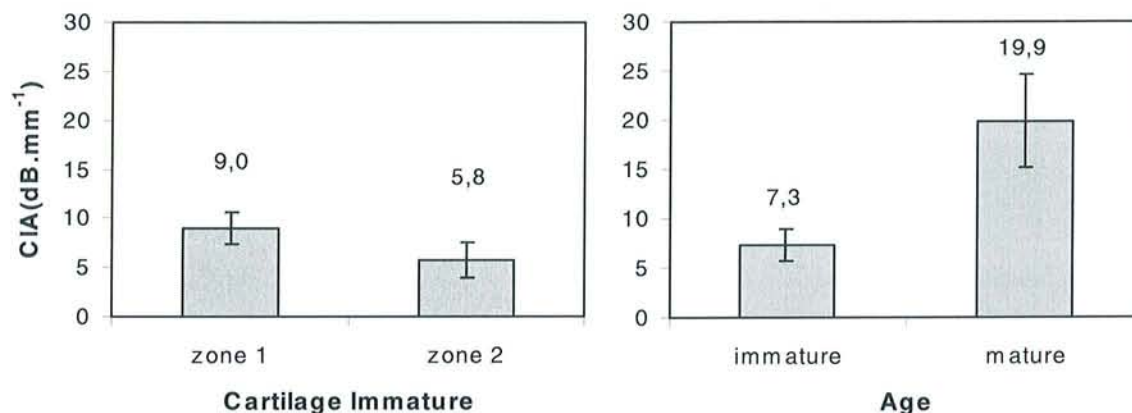


Figure 12 : Variation du coefficient intégral d'atténuation en fonction de la profondeur chez le rat immature ($p < 0,05$) à gauche et en fonction de l'âge ($p < 0,05$) à droite

En fonction de l'âge, le coefficient intégral d'atténuation moyen sur la totalité de l'épaisseur du cartilage augmente de façon significative ($p < 0,05$). Les valeurs moyennes du coefficient intégral d'atténuation sur l'ensemble du cartilage sont de $7,3 \pm 1,7 \text{ dB/mm}^{-1}$ pour le cartilage immature et de $19,9 \pm 4,8 \text{ dB/mm}^{-1}$ pour le cartilage mature. Chez le rat immature, le coefficient intégral d'atténuation diminue en fonction de la profondeur de façon significative ($p < 0,05$). Les valeurs moyennes du coefficient intégral d'atténuation sont respectivement pour les zones 1 et 2 de $9,0 \pm 1,6 \text{ dB/mm}^{-1}$ et de $5,8 \pm 1,8 \text{ dB/mm}^{-1}$. Entre l'une des deux zones 1 et 2 et l'ensemble du cartilage mature, le test statistique indique que les valeurs du coefficient intégral d'atténuation sont significativement différentes ($p < 0,05$).

(3) Exposant de la variation en fréquence de l'atténuation

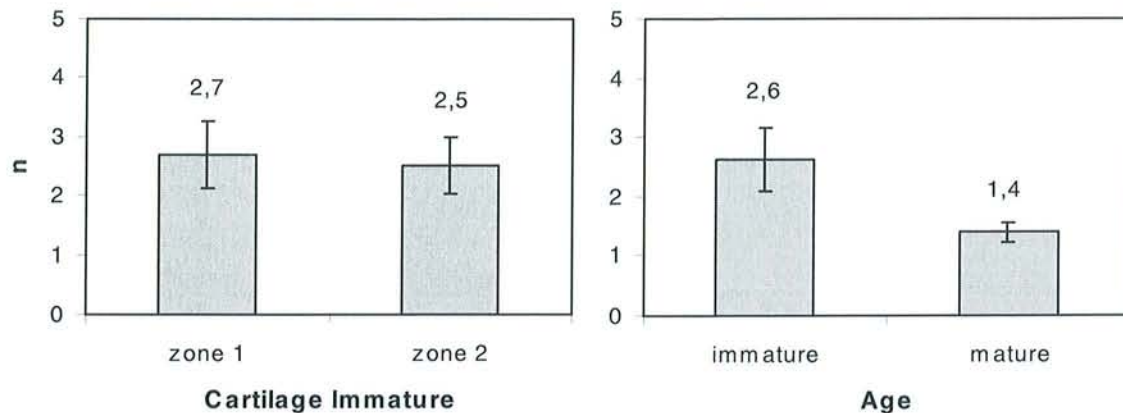


Figure 13 : Variation de l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation en fonction de la profondeur chez le rat immature ($p > 0,05$) à gauche et en fonction de l'âge ($p < 0,05$) à droite

En fonction de l'âge, l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation sur la totalité de l'épaisseur du cartilage diminue de façon significative ($p < 0,05$). Les valeurs moyennes de l'exposant sont de $2,6 \pm 0,5$ pour le cartilage immature et de $1,4 \pm 0,2$ pour le cartilage mature. Chez le rat immature, l'exposant ne varie pas en fonction de la profondeur de façon significative ($p > 0,05$). Les valeurs moyennes sont respectivement pour les zones 1 et 2 de $2,7 \pm 0,6$ et de $2,5 \pm 0,5$. Entre l'une des deux zones 1 et 2 et l'ensemble du cartilage mature, le test statistique indique que les valeurs de l'exposant sont significativement différentes ($p < 0,05$).

C. DISCUSSION

Trois constituants biochimiques, les chondrocytes, le collagène et les PG, sont capables d'influencer la propagation des ultrasons et être à l'origine des modifications des paramètres acoustiques.

Le collagène est caractérisé par quatre paramètres : son type, sa concentration, l'orientation et le diamètre des fibres. Les chondrocytes et les PG sont caractérisés par deux paramètres : leur taille et leur part relative dans le tissu cartilagineux.

En ce qui concerne l'orientation des fibres de collagène, le tir ultrasonore est perpendiculaire au plan de coupe des échantillons et l'orientation des fibres est située globalement dans le plan

de coupe. Les fibres sont donc globalement perpendiculaires au tir ultrasonore en chaque point du balayage pour l'ensemble des échantillons. Dans le cadre de notre étude, l'orientation des fibres de collagène représente certainement une part mineure des variations des paramètres mesurés.

En ce qui concerne le type du collagène, le collagène de type II représente, en quantité, 90 % du collagène du cartilage à l'état mature [Miller, 1969]. Pour le stade immature, d'après l'étude sur la maturation du cartilage chez le lapin par Bland et Ashhurst [Bland, 1996], le type II est déjà présent partout au sein d'un cartilage dont les caractéristiques correspondent à celles d'un cartilage immature de notre étude. Le taux de collagène de type II semble être prépondérant dans chacune des couches du cartilage pour les deux stades immature et mature de notre étude. Le type du collagène ne peut donc pas être responsable des variations des paramètres mesurés.

Comme l'orientation des fibres de collagène et le type de collagène ne peuvent pas expliquer les variations des paramètres, seules la part relative et/ou la taille des différents constituants biochimiques peuvent être à l'origine de ces changements.

En ce qui concerne la concentration du collagène, un certain nombre d'auteurs ont montré que le contenu en collagène a une influence sur la célérité et l'énergie atténuée dans les tissus biologiques riches en collagène aussi bien à basse fréquence [O'brien, 1976] qu'à haute fréquence [Moran, 1995; Ye, 1995]. Dans nos travaux, les coupes colorées au rouge sirius montrent que le contenu en collagène diminue en fonction de la profondeur chez le rat immature. Le contenu en collagène chez le rat immature varie donc dans le même sens que la célérité et le coefficient intégral d'atténuation en fonction de la profondeur. Les résultats biochimiques indiquent que ce contenu augmente lors de la maturation. Le contenu en collagène varie donc dans le même sens que le coefficient intégral d'atténuation et la célérité des ultrasons lors de la maturation. Ces résultats suggèrent une influence prépondérante du contenu en collagène sur les variations de la célérité et de l'énergie atténuée.

L'expression de l'atténuation ultrasonore dans les tissus biologiques peut être décomposée en deux termes, les fonctions d'absorption et de diffusion [Pohlammer, 1981]. Ce deuxième terme englobe alors les fonctions de réflexion, de réfraction et de diffraction. L'absorption

ultrasonore varie en fonction de la fréquence selon une loi plus ou moins linéaire [Goss, 1979]. Sehgal et Greenleaf ont montré que l'atténuation due à la diffusion varie en fonction de la fréquence selon une fonction de type $\alpha(f) = a.f^n$, où n l'exposant de la dépendance en fréquence varie entre 0 et 4 lorsque la taille des diffuseurs diminue par rapport à la longueur d'onde [Sehgal, 1984]. Dans notre étude, l'exposant de la variation de l'atténuation présente des valeurs bien supérieures à l'unité, notamment pour l'âge immature. C'est pourquoi, on peut considérer que l'atténuation mesurée dans notre étude est principalement due à un phénomène de diffusion dû aux fibres de collagène dont le diamètre est petit devant la longueur d'onde. Dans nos travaux, les coupes colorées au rouge sirius et observées en lumière polarisée montrent que la polarisation s'intensifie au cours de la maturation reflétant un épaississement des faisceaux de fibres de collagène. Cet épaississement corrobore la diminution de l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation lors de la maturation. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études publiées précédemment qui montrent une influence prépondérante du collagène sur l'atténuation et la célérité. Agemura a montré chez le bœuf à 100 MHz que la célérité et l'atténuation sont influencées respectivement par l'orientation des fibres de collagène et par la présence de *cross-link* entre les fibres de collagène [Agemura, 1990]. Dans ses travaux, la célérité est plus importante pour des fibres orientées perpendiculairement au faisceau ultrasonore par rapport à des fibres orientées parallèlement et l'atténuation augmente avec la rupture des *cross-link*. Dans des études chez le bœuf à 22 MHz, Töyräs indique qu'entre un cartilage témoin et un cartilage dégradé par la collagénase, enzyme dégradant spécifiquement le collagène, seule la célérité des ultrasons est significativement différente contrairement à l'atténuation [Töyräs, 1999].

Notons que la rétrodiffusion par la matrice interne mesurée en mode échographique, lorsque l'onde se propage de la surface articulaire vers l'os sous-chondral, n'a pas montré clairement une variation en fonction de la fréquence avec un exposant de variation supérieur à l'unité. La non concordance de nos résultats semble provenir du fait que l'orientation des fibres de collagène par rapport à l'onde ultrasonore est différente. Dans le troisième chapitre, nous avons vu que, dans la zone de mesure de rétrodiffusion, les fibres de collagène sont, soit en arcades et obliques à 45° (couche transitionnelle), soit parallèles au faisceau ultrasonore (couche radiale) pour l'âge mature. La situation est différente pour l'âge immature : la zone de mesure se situe dans la couche transitionnelle où les fibres de collagène sont globalement perpendiculaires au faisceau ultrasonore, mais certaines peuvent former des arcades comme dans le cas mature. Nous avons tout de même remarqué que, lorsque l'onde se propage

perpendiculairement aux fibres de collagène, la rétrodiffusion présente une plus forte variation en fonction de la fréquence.

En ce qui concerne les chondrocytes, les coupes colorées au bleu de toluidine indiquent qu'entre les couches transitionnelle et hypertrophique chez le rat immature, la part relative des cellules augmente de façon importante en fonction de la profondeur, alors que le coefficient intégral d'atténuation et la célérité des ultrasons diminuent respectivement de 36 % et de 1,2 %. Entre les couches transitionnelle du cartilage immature et radiale du cartilage mature, la part relative des cellules se modifie peu alors que le coefficient intégral d'atténuation et la célérité des ultrasons augmentent respectivement de 120 % et de 2,4 %. Les variations des deux paramètres acoustiques ne correspondent pas aux variations de la part relative des cellules. Par ailleurs, la taille des cellules augmente en fonction de la profondeur entre les couches alvéolaire et hypertrophique du cartilage immature alors que l'exposant de la variation en fréquence de l'atténuation ne varie pas de façon significative. Entre les couches hypertrophique du cartilage immature et radiale du cartilage mature, la taille des cellules et l'exposant diminuent alors qu'ils devraient évoluer en sens inverse si l'on considère les cellules comme diffuseur. La taille des cellules ne peut pas être responsable des variations de l'exposant. Ces résultats semblent indiquer que les cellules n'ont pas une influence significative sur les paramètres ultrasonores.

En ce qui concerne les protéoglycanes, les coupes colorées au bleu de toluidine montrent que le contenu en PG augmente en fonction de la profondeur chez le rat immature. Les résultats biochimiques indiquent que ce contenu diminue lors de la maturation. Il varie donc en sens opposé par rapport au coefficient intégral d'atténuation et à la célérité des ultrasons aussi bien lors de la maturation qu'en fonction de la profondeur chez le rat immature. En ce qui concerne la taille des PG, certains auteurs [Inerot, 1983; Zirn, 1984; Thonar, 1986] rapportent que la taille des PG décroît au cours de la maturation. L'exposant de la variation de l'atténuation diminue également en fonction de l'âge alors qu'il devrait augmenter si l'on considère les PG comme diffuseur. Ces résultats indiquent que les PG ne semblent pas être responsables des variations des paramètres d'atténuation et de célérité et sont en accord avec les travaux de Töyräs à 22 MHz chez le bœuf. En effet, il est montré que ni l'atténuation ni la célérité des ultrasons ne sont influencées par les PG lors de la dégradation du cartilage par la chondroïtinase ABC, enzyme dégradant spécifiquement les PG [Töyräs, 1999].

CONCLUSION

La mesure des paramètres d'atténuation et de célérité perpendiculairement au plan sagittal de la rotule a permis d'étudier l'influence de différentes couches décrites au sein du cartilage sur les paramètres acoustiques chez le rat immature et mature. Mais la résolution latérale du transducteur ne permet pas de caractériser chacune des couches du cartilage, notamment chez le rat mature. Néanmoins, les différents paramètres acoustiques ont permis de caractériser la maturation. La confrontation aux résultats biochimiques et histologiques conforte l'hypothèse de l'influence prépondérante du collagène sur la propagation de l'onde ultrasonore dans le cartilage articulaire chez le rat. Les variations de la célérité et du CIA reflètent celle de la concentration en collagène et la variation de l'exposant est liée à celle des fibres de collagène. Nos résultats confirment ceux obtenus au chapitre précédent, à savoir que les PG ne semblent pas influencer la propagation de l'onde ultrasonore de haute fréquence dans le cartilage.

Cette étude a fait l'objet d'une publication présentée à la suite du chapitre.

Attenuation coefficient and speed of sound in immature and mature rat cartilage: a study in the 30 - 70 MHz frequency range

B. PELLAUMAIL¹, V. DEWAILLY¹, A. WATRIN², D. LOEUILLE², P. NETTER²,
G. BERGER¹, A. SAÏED¹

¹Lab. Imagerie Paramétrique CNRS/Paris VI UMR 7623, 15 rue de l'Ecole de Médecine 75006 Paris, France

²Lab. Pharmacologie CNRS/UHP UMR 7561, BP 184 Faculté de Médecine 54505 Nancy, France

Abstract - In order to determine the influence of cartilage structural changes on high frequency ultrasound propagation, speed of sound and the frequency variation of attenuation in the 28-70 MHz bandwidth were estimated in immature and mature cartilage of rat patellae. Frozen patellae were cut in the sagittal direction perpendicular to the articular surface and the different layers of the cartilage sections were explored using a 55 MHz backscatter ultrasound microscope. At each scan position, the speed of sound and attenuation coefficient were estimated using substitution method. For immature cartilage, acoustic parameters decreased significantly ($p < 0.05$) from the articular surface to the chondral/bone interface. The parameter mean values averaged over the entire depth of the tissue were significantly lower than those measured in mature cartilage ($p < 0.05$). Correlation with histologic images showed that acoustic parameters are markedly influenced by changes in the collagen fibril density.

INTRODUCTION

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue which contains relatively few cells embedded in a large extracellular matrix rich in proteoglycans, collagen fibers and other proteins that contribute to the tissue structural integrity. The tissue is composed of three main layers characterized by a heterogeneity in cell density, concentration of biochemical constituents and collagen fibril orientation. The degeneration of articular cartilage is one of the predominant characteristics of osteoarthritis (OA) which is the most common joint disease in humans [1]. We have previously demonstrated that 50 MHz ultrasonography coupled with tissue characterization is very sensitive to subtle structural changes induced by a model of OA in rat patellae [2]. The understanding of the physical mechanisms that underly the interaction between high frequency ultrasound (US) propagation and cartilage structure is of a great interest for clinical considerations. Agemura *et al* reported that attenuation coefficient and

speed of sound estimated at 100 MHz in cartilage of adult steers are most influenced by the disruption of intermolecular cross links of collagen and collagen fiber orientation, respectively [3]. Our group reported that apparent integrated backscatter estimated in the 35-70 MHz frequency range is more likely related to changes in collagen fiber orientation of rat patellar cartilage occurring during maturation [4].

The current study assesses the contribution of collagen to the propagation parameters of high frequency US during cartilage maturation. Speed of sound and the frequency dependence of attenuation were estimated in immature and mature cartilage. US data were correlated to histologic findings.

MATERIALS AND METHODS

1 - Tissue processing

Cartilage maturation is characterized mainly by tissue thinning, a decrease of the proteoglycan content, an increase of the collagen content and changes in the collagen fibril network organization [5]. The maturation is a reproducible and well described process that can be used as an ideal model of cartilage structural modifications.

Twelve patellae taken from immature and mature male wistar rats were explored. Two series of rats were studied: immature rats ($n=6$, 150 g in weight, 5-week-old) and mature rats ($n=6$, 300 g in weight, 10-week-old). The patellae were deep-frozen and sectioned in their central part, perpendicular to the articular surface in a direction parallel to the sagittal plane using a sliding cryomicrotome (HM 440 E, Microm France). The mean section thickness was approximately 150 μ m and 300 μ m for immature and mature cartilages, respectively.

2 - Ultrasonic data acquisition

The patellar sections were explored using a 60 MHz scanning backscatter microscope. The system operates

with a 125 MHz nominal resonant frequency focused transducer (Toray PT125, 3mm diameter, 7.5 mm focal length). The transducer was excited by a 200 MHz bandwidth pulser-receiver (Panametrics 5900 PR). The spectrum of the US pulse generated at focus was centered at 55 MHz and the -6 dB axial and lateral resolutions were approximately 25 μm and 65 μm , respectively. For data acquisition, each patella section was placed on a perfect plane reflector (steel plate) in a water tank filled with saline solution. The ultrasound beam focused on the steel plate and the transducer scanned the sample in X and Y directions parallel to the sagittal plane so that the different layers of the cartilage were individually insonified. The transducer displacement intervals were 50 μm in the sagittal direction and 20 μm in the transverse or depth direction i.e. from the articular surface to the cartilage bone interface (stepper motors, Micro-controler, Newport). The radio frequency signal reflected by the steel plate and the cartilage interfaces were digitized at 400 MHz (8-bit digital oscilloscope, Lecroy 9450A).

3 - Estimation of acoustic parameters

At each scan position, the speed of sound and attenuation coefficient were estimated using substitution method [6].

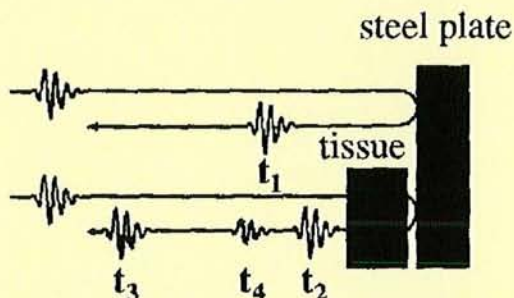


Fig. 1 : A-scan lines showing the echoes used for the calculation of acoustic parameters.

Speed of sound - The speed of sound in cartilage c_t and the cartilage section thickness d_t were calculated using the following relations:

$$c_t = c_\phi \times \left[1 + \frac{t_1 - t_2}{t_4 - t_3} \right]$$

$$d_t = c_\phi \times [(t_1 - t_2) + (t_4 - t_3)] / 2$$

where t_i are the arrival times of the different echoes: (t_1) is from saline/steel interface, (t_2) is from the saline/steel interface with cartilage interposed, (t_3) is from the saline/cartilage interface, (t_4) is from cartilage/saline interface and c_ϕ is the speed of sound in saline.

Attenuation - The frequency variation of the attenuation coefficient was determined from the power transfer function between the echoes from the steel plate with and without the cartilage section interposed using the spectral difference approach. The frequency variation of the attenuation was linear between 28 MHz and 70 MHz. Thus, the normalized attenuation coefficient in dB/mm/MHz was calculated from the slope of the log-spectral difference over the 28-70 MHz bandwidth.

$$\alpha(f) = 10 \times \text{Log}[S(t_1, f) / S(t_2, f)] / 2d_t$$

4 - Statistics

For each parameter, the Wilcoxon signed-rank tests for two-sampled and paired data were performed to evaluate the significance of the parameter variations within the cartilage samples and between the two sample groups. A level of significance $\alpha = 0.05$ was used (NCSS 2000 software, NCSS, Utah, USA).

RESULTS

Acoustic parameters - Images of speed of sound and attenuation coefficient were reconstructed (17 x 36 pixels i.e. 850 μm x 720 μm).

The variations of speed of sound and attenuation coefficient as a function of the cartilage depth were estimated by averaging the parameter values over 17 pixels i.e. 850 μm in the sagittal direction e.g. parallel to the articular surface (fig. 2). For immature rats, speed of sound and attenuation coefficient decreased as a function of the cartilage depth.

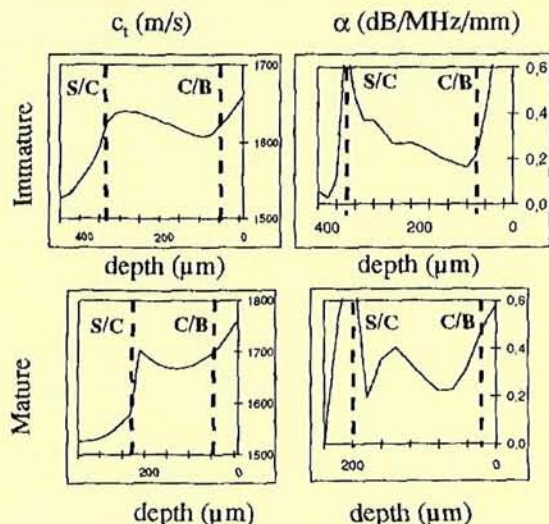


Fig. 2 : Variation from the articular surface (S/C) to the cartilage/bone interface (C/B) of acoustic parameters in immature (a,c) and mature (b,d) cartilages.

The slope of a linear fit between acoustic parameters and cartilage depth were calculated for all the immature cartilages. The mean slope and the standard deviation for speed of sound was (0.15 ± 0.05) m/s per μm depth ($R=0.89$), and for attenuation coefficient it was $(1.34 \pm 0.62)10^{-3}$ dB/mm/MHz per μm depth ($R=0.94$). For mature rats, the parameter mean values did not show a clear variation trend from the articular surface to the cartilage/bone interface.

Comparison with histologic images - Figure 3 displays histologic sections of immature and mature cartilages obtained in the sagittal plane of the patellae. The images show the change in collagen fiber orientation as a function of the tissue maturation. Immature cartilage (approximately 400 μm thick) consists of three layers demarcated by collagen fibers of different patterns. The superficial or *tangential layer* occupies 5 to 10% (40 μm) of the cartilage thickness and contains a high density of collagen fibers which are packed parallel to the articular surface. In the *transitional layer* (40% of the cartilage thickness, 160 μm) the collagen fibers have an alveolar organization and a middle density. The *deep zone* or *hypertrophic layer* (50 % of the cartilage thickness, 200 μm) appears almost dark indicating a low density of collagen fibers which are oriented perpendicular to the articular surface.

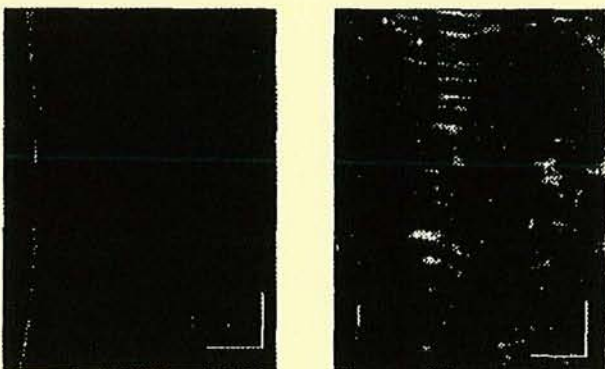


Fig. 3 : Histologic sections of immature (left) and mature (right) cartilages stained with Picrosirius red and viewed with polarized light microscopy.

In mature cartilage which is approximately 290 μm thick, the *transitional* and *hypertrophic* layers are thinner and occupy 18% and 10 % of the cartilage thickness, respectively. The transitional layer remains dark because the collagen fibers are arching. Between these two layers appears the *radial layer* (68 % of the cartilage thickness, 200 μm) in which the collagen fibers are thick, densely packed and oriented perpendicular to the articular surface. For correlation with histologic findings, Table 1 reports the mean values and the standard deviations of speed of

sound and attenuation coefficient measured in regions that should correspond to the transitional and deep layers of immature cartilage, and to the deep layer of mature cartilage. Note that the transitional layer of mature cartilage could not be individually insonified since its thickness was under the lateral resolution of our US system.

For immature cartilage, the difference between the parameter mean values measured in the two zones of the tissue was significant ($p<0.05$) and was of 1.2% and 50 % for speed of sound and attenuation coefficient, respectively.

The parameter mean values averaged over the entire depth of mature cartilage were significantly higher ($p<0.05$) than those obtained in immature cartilage. The variations were approximately 3 % and 64 % for speed of sound and attenuation, respectively.

Table 2 summarizes the influence of collagen fiber characteristics on acoustic parameters. It appears that speed of sound and attenuation coefficient increase as a function of the density of collagen fibers.

Cart.	Immature			Mature
Zone	Trans.	Deep	Whole	Whole
c_t	1650 $\pm$ 16	1630 $\pm$ 14	1640 $\pm$ 15	1690 $\pm$ 10
α	0.33 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.12

Table 1 : Mean values of acoustic parameters in cartilage groups. (c_t is in m/s, α is in dB/MHz/mm).

Cartilage	Zone	Collagen fiber characteristics		Acoustic parameters	
		D	Orientation	c_t	α
Immature	deep	+	across	+	+
Immature	trans.	++	along/across	++	++
Mature	whole	+++	across	+++	+++

Table 2 : Correlation of US parameters with collagen.

D: density, + : low, ++ : middle, +++ : high. Across, along/across refer to the sound beam direction relative to the fibril axis orientation.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In the current study, a high resolution estimation of speed of sound and attenuation coefficient variations was performed throughout articular cartilage as a function of the tissue structural changes during maturation. In immature cartilage, acoustic parameters decreased steadily but significantly from the articular surface to the cartilage/bone interface. In mature cartilage, speed of sound and attenuation coefficient did not significantly change. However, their values estimated within the whole depth of the tissue were significantly higher than those measured within the whole depth of immature cartilage.

These findings indicate that speed of sound and attenuation coefficient are sensitive to cartilage structural changes. Modifications of the collagen fiber density occurring throughout immature cartilage as well as during the tissue maturation are most likely related by the major part of acoustic parameter variations. This finding is in good agreement with results reported on the marked influence of collagen on attenuation coefficient and speed of sound [8], [9].

Although the lateral resolution of our system did not permit to discriminate the three main layers of the cartilage, our results demonstrated a significant difference between the mean values of acoustic parameters measured in the transitional and deep zones of immature cartilage. Agemura *et al* [3] have shown that speed of sound relates changes in collagen fiber orientation in adult steer cartilage. In our study, the effect of the tissue anisotropy may slightly affect the ultrasound wave propagation but cannot be determinant in acoustic parameter variations since the modification of the collagen fiber orientation was in a plane orthogonal to the US beam propagation axis (the fibers were across and/or along/across the US beam axis).

In normal cartilage, the proteoglycan content decreases from the articular surface to the cartilage bone interface and also decreases during the tissue maturation. The variation of this biochemical content cannot be related by the speed of sound and attenuation coefficient and current results confirm those previously reported by our group [7].

Our approach provides a better understanding of the role of articular cartilage structure in the propagation properties of high frequency ultrasound. Further studies are necessary to elucidate the effect of the collagen type in ultrasound propagation which has been shown to vary throughout the cartilage and during the tissue maturation [5]. Nevertheless, current results suggest that high resolution ultrasound could be used as a non destructive alternative to provide valuable and local information on collagen fibrillar network modifications and may be very helpful for the quantitative evaluation of pharmacological treatment effects.

REFERENCES

- [1] J. H. Aubray, L. Sokoloff, « Pathology of osteoarthritis », Arthritis and Allied Conditions, Philadelphia : Lea & Febiger, 1989, pp. 1571-1580.
- [2] A. Saïed, E. Chérin, H. Gaucher, P. Laugier, P. Gillet, J. Floquet, P. Netter, G. Berger, « Assessment of articular cartilage and subchondral bone subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro », *J Bone Miner Res*, vol. 12, pp. 1378-1386, 1997.
- [3] D. H. Agemura, W. D. O'Brien, J. E. Olerud, L. E. Chun, D. E. Eyre, « Ultrasonic Propagation properties of Articular Cartilage at 100 MHz », *J. Acoustic. Soc. Am.*, vol. 87, pp. 1786-1791., 1990.
- [4] E. Chérin, A. Saïed, P. Laugier, P. Netter, G. Berger, « Evaluation of acoustical parameter sensitivity to age-related and osteoarthritic changes in articular cartilage using 50 MHz ultrasound », *Ultrasound in Med. & Biol.*, vol. 24, No. 3, pp. 341-354, 1998.
- [5] Y. S. Bland, D. E. Ashurst, « Development and ageing of the articular cartilage of the rabbit knee joint : distribution of the fibrillar collagens », *Anat. Embryol.*, vol. 194, pp. 607-619, 1996.
- [6] F. T. D'Astous, F. S. Foster, « Frequency dependence of ultrasound attenuation and backscatter in breast tissue », *Ultrasound in Med. & Biol.*, vol. 12, pp. 795-808, 1986.
- [7] B. Pellaumail, D. Loeuille, A. Watrin, P. Netter, G. Berger, A. Saïed, « Correlation of high frequency ultrasound backscatter with cartilage matrix constituents », in 1998 IEEE International Ultrasonics Symposium, vol. 2, pp. 1463-1466.
- [8] M. O'Donnell, J.W. Mims, J.G. Miller, « The relationship between collagen and ultrasound attenuation in myocardial tissue », *J. Acoust. Soc. Am.*, 65, pp.512-517, 1979.
- [9] W.D. O'Brien, Jr., « The role of collagen in determining ultrasonic propagation properties in tissue » Acoustical Holography, Plenum Press, 1976, vol.7, pp. 37-50.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des travaux antérieurs de notre équipe ont montré la capacité de l'échographie de haute fréquence de détecter les lésions précoces et locales au sein du cartilage articulaire dans un modèle d'arthrose expérimentale induite par le mono-iodo-acétate dans le genou de rat. La caractérisation tissulaire au moyen de paramètres acoustiques (coefficients de réflexion et de rétrodiffusion) a permis la quantification des modifications structurales et biochimiques du cartilage. L'objectif des travaux exposés dans cette thèse est de mieux comprendre l'interaction de l'onde ultrasonore avec le tissu cartilagineux. Nous avons étudié le cartilage à différentes étapes de sa maturation et au cours de processus sélectifs de dégradation, afin de déterminer l'influence de ses différents constituants biochimiques sur le signal ultrasonore.

En premier lieu, nous avons étudié la maturation, processus naturel, reproductible et bien connu de modifications structurales et biochimiques du cartilage. La modification de l'échogénicité de la matrice interne sur les images échographiques et du coefficient de rétrodiffusion nous ont amené à supposer que le collagène et les protéoglycanes sont des constituants biochimiques responsables des modifications du signal rétrodiffusé. L'orientation des fibres de collagène semble jouer un rôle important. Dans un deuxième temps, nous avons voulu déterminer l'influence des protéoglycanes sur la propagation des ultrasons en dégradant spécifiquement les constituants non collagéniques du cartilage. La dégradation par la hyaluronidase du cartilage a permis de montrer que les PG n'influencent ni la réflexion à la surface, ni la rétrodiffusion. La difficulté de la mise au point d'une dégradation spécifique et reproductible du réseau collagénique chez le rat n'a pas permis de confirmer directement l'influence prépondérante du collagène dans la propagation de l'onde ultrasonore. Néanmoins, les tests préliminaires sur la dégradation du cartilage par la papaine suggère l'influence prépondérante du collagène, notamment au niveau de la réflexion à la surface. En ce qui concerne la rétrodiffusion, nos études sur la maturation et la dégradation par la hyaluronidase confortent la contribution prépondérante du collagène et tout particulièrement de l'orientation des fibres du réseau collagénique aux variations de ce paramètre. Dans une troisième étude, l'estimation des paramètres d'atténuation et de célérité des ultrasons a permis de confirmer l'hypothèse de l'influence du collagène et de préciser son rôle dans la propagation des ultrasons. En effet, la variation du contenu en collagène semble être responsable de la

variation de la célérité et du coefficient d'atténuation dans le tissu cartilagineux. De même, la diminution de l'exposant de la variation en fréquence est liée à l'augmentation du diamètre des fibres de collagène. Cette dernière expérience a également montré que les variations du contenu en protéoglycane ne sont pas mises en évidence par les variations des paramètres de célérité et d'atténuation.

Le rat se révèle être un modèle expérimental très largement étudié tant pour la caractérisation du cartilage que pour la recherche et l'évaluation de l'effet des thérapeutiques. Néanmoins, les investigations réalisées au cours des études présentées ont été limitées principalement par la taille des échantillons. Etant donné la faible épaisseur du cartilage chez le rat, les couches du cartilage sont de quelques ordres de grandeur de la résolution du transducteur.

Il nous a été donc difficile de caractériser les différentes couches par les paramètres de rétrodiffusion, d'atténuation et de célérité. De même, il n'a pas été possible de mettre en évidence l'influence du diamètre des fibres de collagène sur la variation en fréquence de la rétrodiffusion, du contenu et de l'orientation des fibres de collagène sur l'atténuation et la célérité. Pour la rétrodiffusion, l'influence du contenu local en collagène n'a pas pu être mise directement en évidence, probablement parce qu'elle a été masquée par le changement important de l'orientation des fibres de collagène dans la zone de mesure.

Pour répondre à ces interrogations, deux solutions s'offrent à nous,

(1) l'étude du cartilage chez un animal différent dont l'épaisseur est plus importante, de l'ordre de quelques millimètres

(2) l'exploration du cartilage de rat à une fréquence plus élevée. Dans ce sens, il est envisagé au moyen d'un microscope acoustique d'explorer entre 100 MHz et 2 GHz des sections de tissu très fines coupées selon les différentes orientations du cartilage en vue de déterminer l'influence des constituants biochimiques sur l'onde ultrasonore sous thérapeutique et au cours de pathologies.

Le rat demeure cependant un bon modèle pour la caractérisation du cartilage par les ultrasons de haute fréquence. C'est pourquoi une étude sur les effets de médicaments est déjà en cours dans notre laboratoire dont les premiers résultats ont fait l'objet d'une publication présentée à la suite de la conclusion. Un modèle d'arthrite au zymosan a été induit chez le rat pour évaluer à 50 MHz les effets d'anti-inflammatoires, tels que le naproxène et la dexaméthasone. Par ailleurs, il est envisagé d'étudier chez le rat la biocompatibilité et la biointégration de biomatériaux au sein du cartilage.

Une autre voie pourrait être l'étude d'échantillons de collagène de synthèse en fonction de chaque caractéristique du réseau collagénique (type, concentration, orientation et diamètre des fibres).

Nos résultats sont innovants et pourraient conduire à l'élaboration d'un système d'exploration du cartilage articulaire par les ultrasons de haute fréquence et par voie intra-articulaire. En effet, une exploration externe du genou obligerait à baisser la fréquence d'exploration et donc à diminuer la résolution de l'échographe utilisé. Dans le cadre intra-articulaire, la haute fréquence peut être utilisée pour l'évaluation de l'élasticité du cartilage qui permettrait de fournir aux rhumatologues un index quantitatif de la rigidité du cartilage à la place de la palpation manuelle pratiquée actuellement en arthroscopie.

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF ARTHRITIC CARTILAGE USING HIGH-FREQUENCY ULTRASOUND

A. Saïed¹, E. Bossy¹, A. Watrin², B. Pellaumail¹, D. Loeuille², P. Laugier¹, P. Netter² and G. Berger¹

¹Lab. Imagerie Paramétrique CNRS/Paris VI UMR 7623, 15 rue de l'Ecole de Médecine 75006 Paris, France

²Lab. Pharmacologie CNRS/UHP UMR 7561, BP 184 Faculté de Médecine 54505 Nancy, France

Abstract – The current study aims at evaluating the ability of 55 MHz ultrasound (US) in assessing subtle cartilage changes during the time course of a model of arthritis induced in rat knees (intra-articular injection of Zymosan). Arthritic (n=24) and control (n=24) patellae were explored *in vitro* at 5, 14 and 21 days post-injections, using a 3-D US microscope. Cartilage thickness was measured on B-scan images. Changes in cartilage surface and matrix, and in cartilage/bone interface were characterized by the integrated reflection coefficient (IRC) and apparent integrated backscatter (AIB), respectively. US findings were compared to histologic results. Thickness of arthritic cartilage decreased at D5 ($p<0.05$), then increased at D14 ($p<0.05$), but was similar to that of controls at D21. IRC mean values of Zymosan groups decreased significantly ($p<0.05$) at D5 and D14, but did not vary at D21. IRC decrease was related to cartilage surface fibrillation. AIB from cartilage/bone interface increased significantly at D5 and D21 ($p<0.05$) due probably to changes in the interface morphology and/or structure. No significant change was observed in AIB from cartilage matrix. Current results show that 55 MHz US allows detection of lesions involving both cartilage and subchondral bone, as well as of partial restoration of cartilage.

I. INTRODUCTION

Destruction of articular cartilage is a major consequence of human rheumatic diseases such as osteoarthritis and chronic arthritis. Because of their low spatial resolution, conventional imaging modalities are not able to detect early stage changes in the cartilage. The potential of high-frequency (50 MHz) quantitative ultrasound (US) to assess such changes has been previously demonstrated by our group in a model of experimental osteoarthritis in rats [1],[4]. The purpose of the current work is to

characterize ultrasonically subtle changes in both cartilage and subchondral bone during the time course of an experimental arthritis in rat knees.

Zymosan-induced arthritis (ZIA) is characterized by a persistent synovitis and a depletion of the cartilage proteoglycans [2]. A collagen denaturation was also described in mice [5]. The current study was performed in rats. It included *in vitro* imaging of patellar cartilage and quantitative assessment of the tissue changes using acoustic parameters. US results were compared to qualitative histological analysis.

II. MATERIALS AND METHODS

Biological samples

Institutional guidelines and legal requirements for laboratory procedures and use of animals were adhered to at all times.

48 male Wistar rats, approximately 250 g in weight, were divided in 2 groups, control rats (n=24) and Zymosan rats (n= 24). Arthritis was induced at day zero (D0) in Zymosan group by an intra-articular (IA) injection of Zymosan (2 mg in 50 μ L saline 0.9%) in both knees. Control rats received an IA injection of 50 μ L saline in both knees. To evaluate the progression of the pathology, each group was divided into 3 subgroups of 8 animals which were sacrificed at day 5 (D5), day 14 (D14) and day 21 (D21) after injections. Left patellae were explored by US then by histology, while biochemical study was performed on right patellae.

Acquisition of 55 MHz ultrasound data

US examination was performed within minutes after dissection. The patellae were placed in a degassed saline bath (0.9%) at room temperature and explored using a backscatter acoustic microscope, which has been described in details in previous reports [1]. The system operates with a 125-MHz

PVDF focused transducer (Toray, Japan, 7.5 mm focal length, 3 mm diameter). The central frequency of the spectrum of a pulse signal reflected by a steel plate positioned at focal distance in saline is 55 MHz. The -6 dB axial and lateral resolutions are approximately 20 μm and 65 μm , respectively. For 3-D data acquisition, the transducer focus was positioned below the cartilage surface and the patella was scanned in 2 directions with an interscan interval of 40 μm . Each RF echo data contained 400 samples (400 MHz sampling frequency), which corresponded to a depth of approximately 800 μm .

Cartilage thickness estimation

The cartilage thickness was estimated on B-scan images, in the central part of the tissue using a previously reported method [1]. A speed of sound of 1600 m/s was taken for control and arthritic cartilage.

Acoustical parameters estimation

The integrated reflection coefficient (IRC) from the cartilage surface and apparent integrated backscatter (AIB) from the cartilage internal structure and cartilage/bone interface were estimated using a standard substitution method, which has previously been reported [1],[4].

IRC. For each patella, the integrated reflection coefficient was estimated over a region of interest (ROI) of 120 μm in the transverse direction by 440 μm in the sagittal direction. The 20 first samples of each RF signal reflected by the cartilage surface were selected using a 50-ns-duration rectangular window. The spectrum of the signal was calculated using a FFT and normalized by the system transfer function. At each frequency, the reflection coefficient was spatially averaged over the ROI, then converted into dB. The IRC value was calculated over the 30-75 MHz frequency bandwidth.

AIB from the cartilage. The signal backscattered from the cartilage matrix was selected using a 150-ns-duration Hamming window. The frequency variation of the mean value of apparent backscatter was estimated over a volume (approximately 280- μm -wide x 1-mm-long x 100- μm -thick), which was located at 50 μm beneath the cartilage surface. The AIB value was calculated over the 30-70 MHz frequency bandwidth.

AIB from the cartilage/bone interface. The whole signal backscattered by the cartilage/bone interface

was selected using a 200-ns-duration Hamming window. The AIB was estimated over a ROI of 120 μm in the transverse direction by 440 μm in the sagittal direction, in the 30-70 MHz frequency bandwidth.

Histological and biochemical analysis

The central region of each patellae was serially sectioned (at 5 μm intervals) in the sagittal plane. Sections (5- μm -thick) were stained with Toluidine Blue (TB) for qualitative evaluation of PG content, or with Picrosirius red (PR) and viewed with polarized light for qualitative evaluation of the collagen network organization.

Biochemical analysis included the evaluation of sulfated glycosaminoglycan and hydroxyproline (collagen) content [1]. In each subgroup, 4 patellae were used for each component evaluation.

Statistical analysis

A Wilcoxon signed rank test was used to evaluate the parameter variations between control and Zymosan groups. A p value <0.05 was considered statistically significant.

III. RESULTS

Echographic images

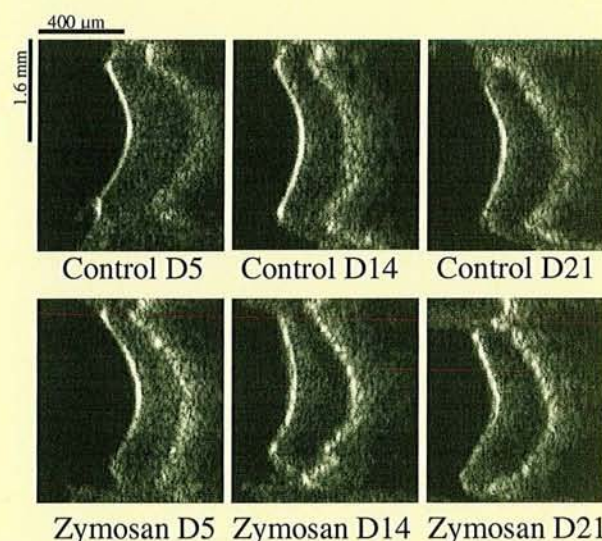


Fig. 1: 55 MHz B-scan images of cartilage

55 MHz B-scans of arthritic cartilage (Fig. 1) did not display focal lesions. Marked changes involved cartilage thickness and cartilage/bone interface.

Cartilage thickness - Control groups showed a 10 % thickness decrease ($p<0.05$) between D5 and D14, and no difference between D14 and D21. Thickness variation is due to cartilage maturation [1]. Comparison between control and Zymosan groups indicated that Zymosan induced a 25% thickness decrease ($p<0.05$) at D5, and a 15% thickness increase ($p<0.05$) at D14. However, no difference was seen between controls and Zymosan cartilages at D21.

Cartilage/bone interface - At D5, the cartilage/bone interface of Zymosan groups displayed higher echogenicity level than that of controls. This difference was less marked at D14 and D21.

Analysis of acoustic parameters

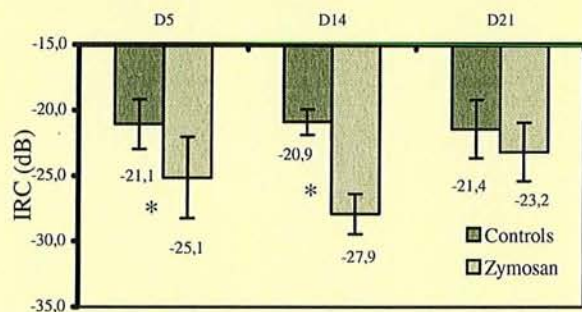


Fig. 2: Integrated reflection coefficient. (* marks a significant difference between two groups, $p<0.05$)

Integrated reflection coefficient - The IRC mean values of controls did not vary over time and were about -21 dB (Fig. 2). The IRC mean values of Zymosan groups were lower than those obtained from control groups. IRC decrease was of -4 dB ($p<0.05$) at D5 and -7 dB ($p<0.05$) at D14, but was not significant at D21.

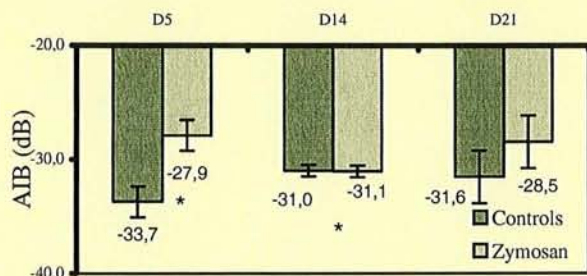


Fig. 3: AIB from cartilage/bone interface (* marks a significant difference between two groups, $p<0.05$)

AIB from cartilage/bone interface - At D5, the signal backscattered from the interface of Zymosan group was 6 dB higher ($p<0.05$) than that obtained from control group. The AIB mean value did not significantly change at D14, but was again 3 dB higher ($p<0.05$) for the Zymosan group at D21.

AIB from cartilage matrix - The AIB mean values of controls decreased over time, as a result of change in collagen organization with cartilage maturation. However, no significant difference was detected between AIB values of controls and Zymosan groups over time.

Histological images

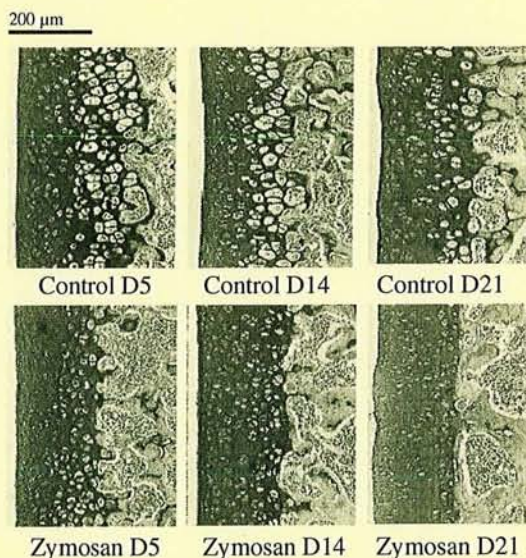


Fig. 4: Images of histologic sections stained with TB

TB staining - Sections of control groups showed a decrease in hypertrophic cell content with time, which is due to maturation. The most obvious effect of ZIA is a nearly total disappearance of hypertrophic cells. On all sections of Zymosan groups, the cartilage/bone interface was more regular, e.g. less sinuous, compared to that of control groups (Fig. 4). Subtle alterations involved the cartilage surface of most of the Zymosan samples and were clearly visible at a higher magnification (x40). These alterations which were 1 to 10 µm in size corresponded more likely to surface roughness and/or fibrillation. They were more marked at D14. At D5 and D21, the cartilage surface was slightly altered and appeared, therefore, more regular than that

explored at D14. It is important to note that sections of the same patella exhibited an important variability.

PR staining, observed with polarized light – Sections of control groups displayed changes in the collagen network organization with time which are due to maturation [1]. The collagen network of Zymosan groups appeared slightly disorganized at D5 and D14, compared to control groups. At D14, most of the images of Zymosan group showed surface irregularities, on the order of few microns.

Biochemical results

The PG and collagen contents of control and Zymosan groups were not significantly different at D5 and D14. At D21, the PG content of the Zymosan group was 25% lower than that of the control group.

IV. DISCUSSION AND CONCLUSION

The current study reports, for the first time, high-resolution US images and quantitative evaluation of cartilage changes during the time course of an experimental arthritis induced in rat knee.

Our histologic observations showed that early lesions induced by Zymosan are cartilage thinning, surface fibrillation, partial loss of the hypertrophic cells, slight disorganization of the collagen fiber network and changes in the cartilage/bone interface. However, no change was found in PG and collagen contents. Three weeks post injections, a partial restoration of the cartilage surface and thickness was observed. However, biochemical analysis indicated a 25 % loss in PG content. Histologic sections showed that the cartilage/bone interface and the deep layer of hypertrophic cells remained altered.

55 MHz US images of arthritic patellae displayed the progressive changes in cartilage thickness and cartilage/bone interface.

Quantitative acoustic parameters allowed detection of subtle changes in cartilage surface and cartilage/bone interface. Indeed, significant decrease in IRC values of Zymosan injected rats at D5 and D14 were related to surface irregularities (roughness and/or fibrillation, approximately between $\lambda/30$ and $\lambda/3$ in size). The non-significant change in IRC values at D21 may indicate a partial restoration of the cartilage surface.

With regard to the cartilage matrix, apparent integrated backscatter from Zymosan groups appeared to be not sensitive to the slight changes in

collagen fiber organization. However, AIB results were consistent with biochemical findings and confirmed the non-influence of the change in PG content on backscattered signal [3].

Variations in AIB from cartilage/bone interface of Zymosan groups at D5 and D21 are probably caused by the disappearance of hypertrophic cells and a change in the adjacent osseous boundary that appeared more regular than in controls. At D5, the decrease in US signal attenuation due to cartilage thinning may also contribute to the increase in backscatter from the cartilage/bone interface. At D14, the apparent changes in the cartilage/bone interface displayed by most of the histologic sections were not reflected by a variation in the AIB mean value.

Although histologic images displayed an important variability and acoustic parameters were obtained from a large volume compared with the thickness of the histologic sections (analysis of 2-3 sections, per patella), quantitative ultrasound results are consistent with histologic observations. Analysis of bone structural remodeling and collagen changes (structure, fiber organization) require further quantitative techniques.

The current results demonstrate the sensitivity of high-frequency ultrasound to acute lesions and partial restoration of cartilage during ZIA. We are currently investigating the effects of anti-inflammatory drugs on cartilage using this model of arthritis.

V. REFERENCES

- [1] Chérin et al., "Evaluation of acoustical parameter sensitivity to age-related and osteoarthritic changes in articular cartilage using 50-MHz ultrasound," *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol 24, No. 3, pp. 341-354, 1998.
- [2] Gegout et al., "Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism," *Life Science*, Vol. 55, No. 17, pp. 321-326, 1994.
- [3] Pellaumail et al., "Correlation of high frequency ultrasound backscatter with cartilage matrix constituents." In *Proc. 1998 IEEE Ultrasonics Symposium*, Vol. 2, pp. 1463-1466, 1998.
- [4] Saïed et al., "Assesment of articular cartilage and subchondral bone: subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50-MHz echography in vitro." *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 12, No. 9, 1997.
- [5] Stoop et al. "Denaturation of type II collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis. Evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage." *J. Pathol.* 188: pp. 329-337, 1999.

Arthritis & Rheumatism

ABSTRACT SUPPLEMENT

1997

NATIONAL SCIENTIFIC MEETING

November 8 - 12, 1997

Washington, DC



AMERICAN COLLEGE OF
RHEUMATOLOGY

Volume 40, No. 9 (Supplement) September 1997

CHARACTERIZATION OF A CD95 SIGNAL TRANSDUCTION MUTANT. *El Peterson, GM Latinis, and GA Koretzky.* Dept. of Internal Medicine, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242.

Interaction of the surface receptor CD95 (fas/APO-1) with its cognate ligand mediates apoptosis in numerous cell types. The molecular underpinnings of CD95 signal transduction are not completely understood. To investigate CD95 signaling requirements, we created mutants incapable of transmitting apoptotic signals through CD95. Jurkat T cells were treated with a chemical mutagen, then cultured with anti-CD95 antibody, at concentrations which kill wild type Jurkat. Apoptosis resistant mutants were cloned by limiting dilution. We studied signaling in one such clone, DD3. Unlike Jurkat, DD3 fails to undergo apoptosis after prolonged treatment with anti-CD95 antibody. However, like Jurkat, DD3 proved susceptible to apoptosis induced by C2-ceramide and UV irradiation. By flow cytometry, CD95 surface expression is equivalent in DD3 and Jurkat. However, when CD95 cDNA was cloned from DD3, sequence analysis revealed a single adenine deletion in the cytoplasmic domain. The protein product predicted by the mutant cDNA is truncated 100 residues amino terminal to the wild-type stop codon. We hypothesize that the truncated CD95 prevents apoptosis in DD3 by interfering with CD95 recruitment of downstream signaling molecules. CD95-mediated apoptosis in parental Jurkats transfected with the mutant CD95 molecule cloned from DD3 is markedly inhibited, suggesting that the mutant CD95 protein can act as a dominant negative in CD95 signaling. Interestingly, while CD95 engagement on DD3 fails to induce apoptosis, anti-CD95 treatment does activate c-jun kinase (JNK), a MAP kinase family member recently implicated as a required element in stress-induced apoptosis. Our finding suggests that CD95-induced activation of JNK is not sufficient to signal apoptosis.

SYNOVIAL FLUID T-CELLS FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY JOINT DISEASE HAVE ALTERED INTRACELLULAR Ca^{2+} POOLS. *D.M. Carruthers, S.P. Young and A. Bacon.* Dept. of Rheumatology, University of Birmingham, UK. B15 2TT.

Intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) stores are involved in the control of T-cell migration, proliferation and apoptosis. These latter processes have all been found to be abnormal in synovial fluid (SF) T-cells from patients with rheumatoid arthritis (RA). We therefore examined, in RA T-cells, the three pools into which $[Ca^{2+}]_i$ stores can be divided:

- i) IP_3 pool - Ca^{2+} mobilised from inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) sensitive stores by PHA.
- ii) Tg pool - Ca^{2+} mobilised from the ER by thapsigargin (Tg) after release of the IP_3 pool.
- iii) $lono$ pool - Ca^{2+} mobilised by ionomycin after the release of IP_3 and Tg pools.

CD4⁺CD45RO⁺ peripheral blood (PB) and SF T-cells, purified by negative selection, were loaded with indo-1 and stimulated sequentially with PHA (100µg), Tg (500nM) and ionomycin (5.6µM) in Ca^{2+} free medium (+0.6mM EGTA) in a fluorimeter. Ca^{2+} pools were assessed by measuring the rise in $[Ca^{2+}]_i$ from baseline to peak for each stimulus.

Results for SF and RA PB are presented as individual pools as well as estimates of $ER Ca^{2+}$ ($IP_3 + Tg$ pool) and Total $[Ca^{2+}]_i$ ($IP_3 + Tg + lono$ pool). In a PB study (n=6) there was a trend towards smaller IP_3 and $lono$ pools in RA PB compared with normal control PB but no difference in Tg pools. In contrast, SF from inflammatory arthritis compared to autologous PB demonstrated a larger Tg pool which was not fully released by maximum dose PHA.

Sample n=5	IP_3 pool	Tg pool	$lono$ pool	$ER Ca^{2+}$	Total $[Ca^{2+}]_i$
SF	24 nM	20 nM	16 nM	44 nM	61 nM
PB	22 nM	8 nM	16 nM	30 nM	45 nM
		(p<0.05)		(p<0.05)	(p<0.05)

These data show an alteration in Ca^{2+} stores within SF T-cells, mainly within the Tg pool. Only a proportion of this pool is accessible to IP_3 , suggesting possible compartmentalisation of the ER or novel Ca^{2+} stores which may play a role in abnormal SF cell responses.

ROLE OF CD70/CD27 COSTIMULATORY PATHWAY IN THE DEVELOPMENT OF TH1-MEDIATED AUTOIMMUNITY

Ichiko Nakajima^{1,2}, Atsuo Nakajima^{2,3}, Shinji Morimoto³, Shin-ichi Oshino², Tetsuji Kobata³, Hideo Yagita³ and Ko Okumura³.
National Children's Hospital, Tokyo154, ²Nippon Medical School, Tokyo102, ³Juntendo University, Tokyo113, Japan.

CD70/CD27 is a cell surface molecule pair belonging to the NF/TNF-receptor family. Ligand of CD70 to its receptor CD27 is thought to be important in T cell activation and T-B interaction. However, the *in vivo* function of these molecules remains unclear. To examine the role of CD70/CD27 costimulatory pathway for autoimmunity, we generated anti-mouse CD70 mAb. This newly established mAb could inhibit anti-CD27-induced T cell proliferation costimulated by CD70 transfectant *in vitro*.

Proteolipid protein (PLP)-induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE) which is mediated by Th1 and serves as a model for the human multiple sclerosis was used to elucidate the role of CD70/CD27 *in vivo*. Long-term administration of anti-CD70 mAb into L/J mice which were actively immunized with PLP139-151 dramatically ameliorated the disease severity. *In vivo* or *in vitro* treatment of anti-CD70 mAb could partially inhibit PLP-induced proliferative response of T cells but dramatically modulate cytokine production. Thus, these results indicated that CD70/CD27 interaction is involved in the development of Th1-mediated autoimmunity in EAE.

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture and the Ministry of Health, Japan.

GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE (GGT), A REGULATOR OF INTRACELLULAR REDOX POTENTIAL, IS PHYSICALLY ASSOCIATED WITH THE B LYMPHOCYTE CD21/CD19/TM4 SIGNAL TRANSDUCTION COMPLEX. *Y. Michael Holers, David R. Karp, Joel M. Guthridge, and Timothy C. Nichols.* University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO 80262; University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX 75235.

CD21 (Complement Receptor type 2, CR2) is a member of a B cell signaling complex that contains CD19, Leu 13 and the transmembrane 4 (TM4) superfamily protein CD81 in addition to other TM4 proteins. We have created a new mAb (3A8) that was selected based on its ability to inhibit homotypic adhesion induced through ligation of CD21. We have now determined that mAb 3A8 specifically recognizes the cell membrane ecto-enzyme gamma-glutamyl transpeptidase (GGT). Mice in which GGT expression has been eliminated by homologous recombination demonstrate a profound decrease in intracellular glutathione (GSH) levels in all tissues; therefore, this enzyme plays an essential role in regulating intracellular GSH levels. Altered GSH levels have recently been shown to substantially modulate signal transduction through antigen-specific lymphocyte receptors in addition to TNF receptors and Fas. In order to determine how GGT interacts with the CD21/CD19 complex, we have examined molecular interactions between GGT and members of this complex. These experiments have shown that GGT is specifically detected in immunoprecipitates with the TM4 proteins CD81, CD82 and CD53 but not other TM4 proteins CD9, CD37 and CD63, or with CD19, CD21 and Leu 13. However, in co-capping experiments we have found that GGT is physically associated in the cell membrane with CD21 and CD19 as well as confirming the CD81, CD82 and CD53 association. Expression of GGT is not dependent on the expression of CD21 on lymphocytes, and we have also detected the physical association of GGT with CD82 and CD81 in CD21-negative T lymphocytes by co-precipitation analysis. In summary, we have found that the CD21/CD19/TM4 signaling complex also contains a more widely distributed ecto-enzyme that regulates intracellular GSH levels. Our results suggest that CD21/CD19/TM4 signaling complex activity is linked to regulation of GSH levels or other GGT enzymatic activities.

ACR Poster Session E

Osteoarthritis—Outcome Measures and Epidemiology

1214 Tuesday, November 11, 1997, 8:00 AM–9:30 AM

ULTRAHIGH RESOLUTION IMAGING OF NORMAL AND OSTEOARTHRITIC CARTILAGE MICROSTRUCTURE. *Mark E. Brezinski, Hermann Costas, Pitis, Brett Bouma, Stephen A. Boppart, James F. Southern, and James G. Fujimoto.* Dept. of Medicine, Mass. General Hospital/Harvard Medical School, Boston, Mass. 02114 and Dept. of Electrical Engineering at MIT, Cambridge, Mass. 02139.

Although all tissue within the osteoarthritic joint show morphologic changes, the hallmark of OA is the degeneration of cartilage. There has recently been heightened interest in methods for assessing early osteoarthritic cartilage changes after multiple investigators have demonstrated that the progression of articular damage may be modified either by medical or surgical intervention. A variety of imaging modalities have been applied to the assessment of articular abnormalities with limited results. In this work, we introduce optical coherence tomography (OCT), a recently developed *micron scale* imaging technology, for high resolution imaging of articular cartilage microstructure (Science 254: 1178, Circulation 93:1206). OCT is analogous to ultrasound, measuring the intensity of backreflected infrared light rather than acoustical waves. OCT is attractive for intraarticular imaging due to its extremely high resolution (3 to 16 µm), ability to be integrated into small arthroscopes, compact portable design, and relatively low cost. OCT imaging was performed on over 50 *in vitro* normal and osteoarthritic joints obtained post surgical resection. Axial resolutions between 10 and 16 microns were achieved, depending on the source utilized. This represents an improvement of resolution by greater than a factor of 10 over any clinically available imaging technology. Microstructures within the joint which were identified include fibrillations, fibrosis, and new bone growth. The accuracy of cartilage width measurements were confirmed with stereomicroscopy. In addition, imaging was demonstrated to be sensitive to the polarization of incident light, suggesting that OCT imaging may allow assessments of changes in collagen orientation and concentration, which are among the earliest changes in osteoarthritis. In conclusion, OCT represents an attractive new technology for ultrahigh resolution intraarticular office-based imaging.

HIGH FREQUENCY ECHOGRAPHY QUANTITATIVE ANALYSIS OF PATELLAR RAT CARTILAGE DEVELOPMENT. *E. Chérin¹, A. Sated¹, B. Pellaumail¹, D. Loeuille², P. Laugier¹, P. Netter², and G. Berger¹.* Lab Imagerie Paramétrique¹ URA CNRS 1458, 15 rue Ecole de Médecine F75006 Paris, & Lab Pharmacologie² URA CNRS 1288, BP184 Faculté Médecine F54505 Nancy

Previous work has shown that high frequency echography was sensitive to the early and progressive characteristic lesions of rat patellar cartilage and subchondral bone induced in an experimental model of osteoarthritis. The goal of the current study was to demonstrate the potential of 60 MHz echography for quantitative assessment of the progressive changes related to normal cartilage development.

A three-dimensional (3D) 60 MHz backscatter ultrasound (US) scanner (axial resolution better than 30 microns at transducer focus) was used to explore *in vitro* patellar cartilage of 48 male wistar rats from 6 to 11 week-old (180 to 450 g in weight). The animals were divided into 8 groups (8 rats per group) which were examined at regular time intervals corresponding to the various stages of the animal development. US investigations were followed by histologic assessment. The radio frequency signals backscattered by cartilage and subchondral bone were acquired at 400 MHz sampling frequency to produce B-scan images and perform quantitative characterization of the cartilage structural changes using the analysis of the frequency dependence of US apparent backscatter. For all the specimens US images showed an excellent discrimination between the cartilage articular surface and cartilage-calcified cartilage/bone interface. The cartilage internal structure consisting of the transitional and the deep layers exhibited a hyperechoic zone which involved mainly the first two third part of the tissue. The system-independent backscattered US signal from the cartilage internal structure was quantified. It was high for rats of group 1 and decreased significantly and progressively for the rats of the other groups. Moreover, 3D US images showed a significant variation of the cartilage thickness as a function of the tissue development. Preliminary correlation to histologic data revealed a modification of the cartilage matrix and cell organization.

These results demonstrate that 3D 60 MHz echography coupled with quantitative characterization depict early and progressive morphological and structural changes with age of cartilage. This technique have strong potential to contribute to the experimental non destructive evaluation of pharmacologic treatments using animal models.

RELIABILITY OF RADIOGRAPHIC SCORING OF DEGENERATIVE CHANGES IN THE LUMBAR SPINE (DCLS).

Tassos P. Anastasiadis, Edwin Chan, Paul Fenton, Parvathy Nair, Benny Zee, RDU, Queen's University, Kingston, ON, K7L 3N6, Canada.

DCLS is common and may affect bone mineral density (BMD) measurements at the lumbar spine. Previous attempts at the quantification of such changes have not included all the relevant features and the use of highly selected radiographs, consensus and atlases in some of these have resulted in skewed kappa statistics. The present study seeks to establish a scoring system for DCLS in randomly selected radiographs which we may reliably use in clinical practice in addition to ascertaining its contribution to BMD measurements.

Three readers have scored 30 randomly selected antero-posterior (AP) and lateral lumbar spine radiographs for facet joint density, sclerosis, osteophytosis, disc space narrowing and aortic calcification. Subjects were part of CAMOS (The Canadian Multicentre Osteoporosis Study), a database with over 9,000 subjects randomly chosen from telephone directories. We found the inter-rater reliability for each of the above categories to vary between each lumbar spine level and between AP and lateral views. On lateral view, reliability for sclerotic changes was highest at L1 (Kappa statistic 0.39; 95% C.I. 0.20, 0.79) while disc space narrowing was more reliable at L4 (Kappa statistic 0.41; 95% C.I. 0.27, 0.55). On AP view, only osteophytosis and disc space narrowing at L4 were found to be reliable (Kappa statistics 0.43 and 0.42; 95% C.I. 0.28, 0.59 and 0.27, 0.57, respectively). Using these parameters, we present a reliable method for scoring degenerative changes in the lumbar spine and suggest such a quantification method may be used to correct for the contribution of degenerative changes to BMD measurements at this site.

We further introduce the concept of a radiological clear space, the radiological boneless inter-laminar region partly superimposed upon vertebral bodies, which may impact on BMD calculations resulting in falsely low estimates. The potential for digitization of the clear space may allow the easy deduction of its contribution to BMD measurements made in the AP projection.

Disclosure: work reported in this abstract was supported by:

CAMOS (The Canadian Multicentre Osteoporosis Study)

680

HIGH FREQUENCY ECHOGRAPHY (50MHz) OF RAT PATELLAR CARTILAGE MATURATION: CORRELATION WITH HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL DATA.

Bernard Pellaumail, Natacha Guingamp, Damien Loeuille, Patrick Neller, Geneviève Berger and Amena Sated. Lab. Imagerie Paramétrique CNRS UMR 7623, 15 rue de l'École de Médecine F75006 Paris, UMR 7581, CNRS University Nancy I, BP 184 F 54505 Vandœuvre.

Purpose: the aim of this study was to detect the modifications related to maturation of rat patellar cartilage using a 50 MHz backscatter ultrasound (US) scanner. The results were compared to histological and biochemical data.

Materials and methods: 8 Wistar rats 4 weeks, 10 weeks and 4 months old (100g, 300g, 450g in weight, respectively) were explored with a three-dimensional 50 MHz backscatter US scanner (axial resolution better than 30 microns at transducer focus). After the US study, the patellae were prepared for histology (collagen and proteoglycan stainings). The collagen network was explored using a polarized light microscopy. The biochemical study was performed on six patellae per group. The measurements were made by Goldberg's and Woessner's methods for proteoglycan (PGs) and collagen (Col) evaluation, respectively. The variation of PGs and Col content was appreciated by PGs/Col ratio.

Results: For all the specimens, US images showed an excellent discrimination between the cartilage articular surface and cartilage calcified cartilage/bone interface. In 100g rats, the internal structure consisting of the transitional and the deep layers exhibited a hyperechoic zone which involved mainly the first two thirds part of the tissue. However, the cartilage internal structure of the 300g and 450g rats was hypoechoic. The cartilage thickness decreased as a function of the animal aging. On histological sections, a decrease in cartilage thickness and in Toluidine blue staining intensity was observed from 100g to 450g. Images in polarized light showed changes in the collagen fiber orientation. Biochemical data showed a diminution in PGs content from 150µg to 50µg per mg of cartilage. The Col content increases from 50 µg to 75µg per mg of cartilage due to age related modifications. The PGs/Col ratio of the 3 groups were 0.89, 1.4 and 0.68, respectively.

Conclusion: These results show that US is sensitive to cartilage matrix components and the hyperechoic internal structure seems to be dependent on fiber collagen organization.

Disclosure: work reported in this abstract was supported by:

Centre National de la Recherche Scientifique, Université Nancy.

681

HIGH RESOLUTION ULTRASOUND (HRUS) DETECTS SYNOVITIS IN THE MAJORITY OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS (OA) R.J. Wakefield, P.G. Conaghan, W.W. Gibbon, P.O'Connor, M. Roberts, H. Marzo, S.H. Drysdale, M.J. Green, P. Emery.

Rheum. and Rehab. Unit, University of Leeds, 36 Clarendon Rd., Leeds, UK.

Background: Synovitis is well recognized in OA but its role in progression/symptomatology is unknown. HRUS has been used to detect synovitis in inflammatory arthropathies but there are limited data in OA.

Aim: To identify the location and severity of synovitis in OA of the knee and to compare these findings with plain radiographs using the latter as a marker of compartmental disease severity.

Methods: Patients with symptomatic OA (ACR defined) knees were evaluated using an ATL HDI 3000 machine (Seattle, USA) with a 10-5 MHz 'hockey-stick' linear transducer. The HRUS was performed by an experienced musculoskeletal ultrasonographer blinded to X-ray findings. Synovitis was graded using a semi-quantitative score (0-3). Plain radiography was performed (using antero-posterior, weightbearing, lateral and skyline views) and the severity of the OA in each knee compartment was graded on a similar 0-3 scale by a blinded rheumatologist.

Results: 40 symptomatic knees were evaluated by HRUS in 23 consecutive patients (mean age 67, range 54-81 yrs) with OA (mean duration of symptoms 5 yrs, range 2-25 yrs). 15 patients were currently taking a NSAID but none had had corticosteroids within the last 3 months. 29/40 knees (73%) had evidence of synovitis in at least one compartment. Subanalysis of these demonstrated that 16 had supra-patellar pouch (SPP) synovitis alone (55.2%), 9 had both SPP and lateral joint space synovitis (31%), 2 had both SPP and medial joint space synovitis (6.9%) and 2 had synovitis in all 3 compartments (6.9%). The intra-observer kappa value for the ultrasonographer was 0.75. The commonest and most severe radiological site of damage was the medial compartment followed by the patellar-femoral compartment.

Summary: The majority of patients with symptomatic knee OA have synovitis detectable on HRUS, the most common site being the SPP. The correlation with X-ray change was poor.

Conclusions: The presence of synovitis may explain the discrepancy between symptoms/radiological change in OA and also account for the raised CRP found in this disorder.

Did not disclose.

682

PROTON NMR SPECTROSCOPY STUDIES OF OSTEOARTHRITIC (OA) SYNOVIAL FLUIDS (SF) SHOW CHANGES AFTER INTRA-ARTICULAR HYALURONIC ACID (HA) THERAPY. G.B. Paul, David Brower, Robert E. Lankford, Gregory Keenan, S. Wherli, H. Ralph Schumacher. U of PA, CHOP, and VAMC, Philadelphia, PA

NMR spectroscopy allows sensitive detection of many small molecules. Most interestingly it can detect N-acetyl groups of short oligomeric breakdown products of proteoglycans but not intact polysaccharide molecules (MRM 35: 848-853, 1996). Intra-articular injection of HA is commonly used for symptomatic treatment of patients with OA. Here we begin to examine the mechanisms involved in the knee joint in HA treated OA patients using NMR. Synovial fluids taken from knee joints before any treatment and one week after each of 5 weekly treatments were examined with high-resolution proton NMR (300 MHz, wide bore) spectroscopy at ambient temperature. This pilot study was conducted on four patients (3 males and 1 female; age ranges from 40-81 years). Knee joints with effusions were injected at weekly intervals x 5 with 2 cc of 10 mg per ml of hyalgan (sodium hyaluronate, MW 6000 kDa) Sanofi. Leukocyte counts, and in 1 case, viscosity of SF were also examined before and after HA injection.

Leukocyte counts did not change in post-treated patients (pre 200±83/mm³; post 195±105/mm³). In a single case the viscosity of synovial fluid increased from the pretreated level of 21.9±3 to 46.3±1 centipoise. Proton NMR studies before treatment identified metabolites such as lactate (1.33 ppm), glucose (3.4 ppm), alanine (1.5 ppm), glutamine (2.14-2.45 ppm), valine (1.05 ppm), lysine (3.02 ppm), citrate (2.65 ppm), 3-hydroxy butyrate (1.22 ppm), and acetate (1.92 ppm). No significant changes were observed before and after HA injection. However, the N-acetyl groups (2.04 ppm) decreased in 3 of 4 patients studied. The ratios of N-acetyl signal intensities in post vs pre injected patients were 52, 57, 72, and 125% for the 4 patients.

Proton NMR spectroscopy is a sensitive tool for investigating biochemical changes in joints. These initial studies suggest that some patients have decreased breakdown of articular polysaccharides, a potentially important effect of HA.

Disclosure: work reported in this abstract was supported by:

This work was supported by an unrestricted grant from Sanofi.

683

RESURFACING OF ARTICULAR CARTILAGE BY GENETICALLY-MODIFIED CHONDROCYTES Paul J. Doherty, Hongwei Zhang, Y. Maniopoulos, K. Wayne Marshall, Toronto Hospital, Toronto, M5T 2S8

Our objective is to resurface articular cartilage with normal chondrocytes. We explored with rat, canine and bovine chondrocytes and cartilage, the distribution and the duration of binding of chondrocytes to cartilage and the expression of genes introduced into the transplanted chondrocytes.

Chondrocytes injected *in vivo* into the joint space will home to the cartilage. Analysis with confocal microscopy of the femoral and tibial cartilage from rat knees given a single injection of fluorescent cells showed an uneven distribution of labeled chondrocytes. Similarly analysis with confocal microscopy of canine tibial cartilage after three injections of fluorescent cells over a 27 day period revealed on day 35 large clusters of cells distributed in pockets over the surface of the cartilage. Although there is no ready explanation for the pattern of distribution of chondrocytes *in vivo*, we observed the same distribution *in vitro* with bovine explants.

Canine chondrocytes labeled with the intracellular green fluorescent dye, C-2925, and transplanted *in vitro* to cartilage explants 10 days prior to the transplant of chondrocytes labeled with the red fluorescent membrane dye Fm DiI were found by confocal microscopy to be as much as 1.6 mm below the Fm DiI labeled cells. This suggests that the transplanted chondrocytes were active in producing extracellular matrix within the cartilage.

We have shown that the transplanted chondrocytes continue to express β-galactosidase, the product of the gene introduced into the chondrocytes by adenoviral infection. Chondrocytes infected with AdlacZ two days after being transplanted to organ culture continued to express β-galactosidase sixty days after transplant. We have also shown that the transplanted chondrocytes can be efficiently infected well after the transplant. We can infect the chondrocytes as late as fifty-eight days after transplant. Because transplanted chondrocytes retain the ability to be infected by adenoviral vectors, repeat infection may restore expression if gene expression wanes over time. This may be an alternative to repeated injections of chondrocytes into the joint space.

Disclosure: work reported in this abstract was supported by:

the Arthritis Society of Canada

684

NEUROGENIC INVOLVEMENT IN DEGENERATIVE DAMAGE OF ARTICULAR CARTILAGE. E. Decaris, C. Guingamp, M. Chat, A. Minn, P. Gillet, P. Neller, and B. Terlain.

UMR 7581 CNRS, Université Henri Poincaré Nancy I, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

A local inflammation induces local modifications such as plasma extravasation, vasodilatation, or pain. However, pain promotes distal mechanisms resulting from nerve terminals excitation. Such a stimulus, due to local inflammation, induces the production of pro-inflammatory cytokines like IL-1b at the inflammatory site. The aim of this study was to characterize the implication of the nervous system in a degenerative process leading to articular cartilage damage following a focal inflammation.

Several inflammation models, in which systemic effects as fever, assessed by biotlemetry, were minimized or suppressed, were chosen to analyze the inflammatory message (i) from the hindpaw to the ipsilateral and contralateral knees, (ii) from one knee to the contralateral knee, (iii) and both with or without spinal cord injury, so that the nervous system might be interrupted. Proteoglycan synthesis was assessed in cartilage patellae to inform on its anabolism.

Subcutaneous injection of 1 mg CFA (Complete Freund's Adjuvant) lead to a decrease in proteoglycan synthesis transmitted by neurogenic pathway from the hind paw to the contralateral knee, whereas ipsilateral effects were systemic since they were not erased after spinal cord compression. Spinal cord injury totally abolished the decrease of anabolism observed in both patellae after subcutaneous injection of 1 µg CFA, so that at this dose, CFA induced only neurogenic mechanisms damaging articular cartilage. The injection of substance P into the knee induced a neurogenic-dependent contralateral decrease in anabolism, erased after spinal cord compression. In the opposite, turpentine induced major degenerative effects mediated systemically with no influence of spinal cord compression.

Finally, a local inflammation can induce deleterious mechanisms at a distance leading to degenerative consequences damaging articular cartilage, probably through IL1 secretion by synovium. This study provides evidences that proteoglycan synthesis can be regulated by the nervous system and that substance P may be implicated, as probably other neuropeptides, thus supporting experimentally the concept of neurogenic arthropathy.

Disclosure: work reported in this abstract was supported by:

Centre National de la Recherche Scientifique, Université Nancy.

VOL. 7, SUPPL. NO. 1

FEBRUARY 1998

ISSN 0929-8266
EJUL8 7 (SUPPL. 1) 1-64 (1998)

EUROPEAN JOURNAL OF ULTRASOUND

Official Journal of
the European Federation
of Societies for Ultrasound
in Medicine and Biology

Our Home Page
on INTERNET

<http://www.elsevier.nl/locate/ejulasou>

Supplement:

EUROSON 98 — SFAUMB 98
10th CONGRESS OF EFSUMB – 19th CONGRESS OF SFAUMB
March 26–30, 1998, Tours, France

Elsevier

ULTRASOUND IN DIAGNOSIS OF FOCAL SPLENIC LESIONS

M. Szántová, V. Kupčová

3rd Department of Medicine, Medical School of Comenius University, Bratislava, Slovakia

Focal splenic lesions are commonly a rare condition. Ultrasound is the first method of noninvasive screening in the most inpatient or outpatient with abdominal symptomatology or any internal disease. It gives the possibility for detection of any asymptomatic splenic lesions. During the 2 years of routine ultrasonography at our Department, the following splenic lesions were detected: hemangioma /1/, cyst /1/, calcifications /2/, metastases /4/, abscess /1/, infarction /1/. Toshiba Sonolayer SSA 270 with 3.75 MHz linear probe was used. Hemangioma was in ultrasound described as a round sharply defined solid hyperechogenic lesion in central part of the spleen. Within 2 years it increased in 3 cm in diameter. It was confirmed by surgery and histology. Hemangioma is most often benign splenic tumor. Cyst have a typical ultrasound image: it is the round or oval anechogenic lesion. Its origin may be congenital, posttraumatic or parasitic. About 70 % of patients have no clinical symptoms. Sensitivity of ultrasound in diagnosis of cysts is very high - 98 %, specificity is higher than 90 %. On ultrasound they are seen from the size of 1.5 cm higher. If there are present septa and calcifications inside, they are suspected from parasitic origin. Abscess was found in patient with hydrops of gallbladder. On ultrasonography, a slightly hyperechogenic lesion with non regular margins and hyperechogenic rim with levels inside the lesion and splenomegaly were found. Antibiotic treatment was successful and the abscess diminished in size. Metastases may have solid, hypoechogenic or hyperechogenic character in ultrasound. Multifocal hyperechogenic, hypoechogenic, or cockade round or oval splenic lesions were found in patients with chronic lymphatic leukemia, colorectal carcinoma /2/ and bronchogenic carcinoma. Calcifications were found in 2 patients with history of tuberculosis and hepatitis C. Strong hyperechogenic lesions with acoustic shadow were found on ultrasonography. Infarction is a solid lesion with echogenicity similar to surrounding parenchyma. It was found in patient with incipient myeloproliferative disease.

ASSESSMENT OF ARTICULAR CARTILAGE DEVELOPMENT WITH HIGH RESOLUTION ECHOGRAPHY

CARACTÉRISATION PAR ÉCHOGRAPHIE DE HAUTE RÉOLUTION DE LA CROISSANCE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

A. Saled¹, E. Chérin¹, B. Pellaumail¹, D. Loeuille², P. Netter², G. Berger¹¹ Laboratoire d'Imagerie Paramétrique URA CNRS 1458, 15 rue de l'École de Médecine 75006 Paris.² Laboratoire de Pharmacologie URA CNRS 1288, BP 184 Faculté de Médecine F54505 Nancy, France.

Nous avons montré dans des études précédentes que l'échographie à 60 MHz et la caractérisation tissulaire permettent la détection et le suivi des altérations morphologiques et structurales du cartilage et de l'os sous chondral induites par un modèle d'arthrose expérimentale chez le rat. L'objectif de cette étude est de montrer l'apport des ultrasons de haute résolution pour la caractérisation quantitative des modifications structurales du cartilage pendant la croissance. Nous avons utilisé un microscope acoustique opérant à 60 MHz (30 microns de résolution à la focale) pour examiner *in vitro* des rotules de rats (n=48) âgés de 6 à 11 semaines. L'étude a inclus l'exploration des images échographiques et l'analyse en fréquence du signal ultrasonore numérisé pour la mesure du coefficient intégral de rétrodiffusion apparente. Les résultats montrent que l'épaisseur du cartilage patellaire et le signal rétrodiffusé par sa structure interne diminuent avec l'âge. La comparaison avec les données histologiques obtenues sur des coupes colorées au rouge picrosirius et explorées en lumière polarisée montre que les ultrasons donnent des informations liées très probablement à la modification de l'organisation du réseau de collagène. Ces résultats montrent l'intérêt potentiel de l'échographie quantitative de très haute résolution pour l'exploration des modifications ultrastructurales du cartilage et l'évaluation des traitements pharmacologiques.

HEPATOCELLULAR CARCINOMA-ULTRASONOGRAPHIC AND PATHOLOGIC CORRELATION

Djoraski K., MD, PhD, Djoreska L., Jordanoski J., Faculty of Medicine, Institute for Radiology 55000 Skopje, Macedonia

PURPOSE: to understand the acoustic properties of different tissues components of HCC, using correlation between US pattern and histopathologic finding of each tumour.

MATERIALS AND METHODS: 36 HCC nodules measured from less than 1 cm-5cm. The grade of intensity was determined as anechoic, low, iso and hyperechoic. We use Toshiba equipment, with convex probe, 3.75 MHz. US examination was performed preoperatively and on the resected specimen in the water bath. Pathologic examination was made on the same surfaces.

RESULTS: Echogenicity depends on the amount and fatty droplet size, as well as association with other changes inside the tumour or in the surrounding liver parenchyma. Fatty changes, tubular structure and clear cell formation produce hyperechoic pattern. Glandular, follicular or cystic type of HCC with tubular pattern didn't show different echogenicity. Sinusoidal dilatation shows hyperechoic pattern. Necrosis, bleeding and fibrosis also didn't reveal distinguishable different acoustic properties.

CONCLUSION: HCC shows variety of histomorphological appearances. Texture of an image can often be related to the histological component.

A NEW APPROACH CONCERNING HUMAN CALCIS BONE CHARACTERIZATION. BIOT'S THEORY IMPLEMENTATION.

M.-L. TERIEROOITERAI*, M. DEFONTAINE*, C. DEPOLIER*, F. PATAT*, L. POURCELOT*.

*GIP Ultrasons, EA 2102 LUSSI, CHU Tours, France.

**LAUM UMR CNRS 6613 Le Mans, France.

During the past twenty years, ultrasonic diagnosis for osteoporosis has been investigated. Numerous studies concerning ultrasonic trabecular bone tissue characterization have already been performed. Two parameters are commonly used: speed of sound (SOS) and broadband ultrasonic attenuation (BUA). They are connected to both bone mineral density and trabecular structure, therefore they don't enough discriminate for a good medical diagnosis.

We present a new approach based on methods applied in geophysics. We consider the trabecular bone as a simple porous medium and the best physical theoretical tool for such media is Biot theory. Our study consists in establishing new ultrasonic parameters, characterizing the trabecular architecture (porosity, pore sizes). Therefore, we have chosen to measure a characteristic frequency, previously defined by Biot, this characteristic frequency corresponding to a transition in the hydrodynamic behavior.

For this purpose, ultrasonic speed and attenuation measurements have been performed, in a large frequency range (60kHz - 1.2MHz) with pairs of immersion transducers. Direct measurements of porosity, permeability and pore sizes have been obtained by independent ways. In order to validate this method, ultrasonic measurements have been performed on hydroxyapatite ceramics. These porous ceramics have been manufactured with calibrated pore sizes (ceramics used for bone prosthesis). Several pore sizes are tested and standard Biot model is applied since the samples are homogeneous.

Finally, bovine calcaneus slices are characterized *in vitro* with these new parameters and results compared to the direct measurements.



Université de Tours



Laboratoire d'Ultrasons
Signaux et Instrumentation
(USSIUE 2102)



GIP Ultrasons

VIèmes Journées d'Acoustique Physique Sous-Marine et Ultrasonore

VIèmes JAPSUS
Blois

5 et 6 Mai 1999

École d'Ingénieur du Val de Loire
3 Rue de la Chocolaterie BP 3410 41031 Blois Cedex

réalisée avec le concours du Centre de Promotion de l'Enseignement Supérieur Blois



CARACTERISATION PAR ULTRASON A 50 MHz DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Bernard Pellaumail, Amena Saïed et Geneviève Berger

LIP, UMR CNRS 7623 Université Paris 6, 15 rue de l'école de Médecine, 75006 PARIS

L'arthrose est une des pathologies articulaires les plus répandues qui se caractérise par une dégénérescence du cartilage articulaire. Ce tissu est un milieu anisotrope particulièrement complexe, composé de cellules noyées dans une matrice de protéines constituée en partie de fibres de collagène dont l'organisation varie au sein du tissu. Les moyens actuels de dépistage de l'arthrose utilisés en routine clinique (rayons X, échographie à 7.5 MHz et IRM) ne sont pas capables de détecter les lésions précoces du cartilage avant l'apparition des douleurs et de l'irréversibilité de la pathologie. Les rhumatologues souhaiteraient donc disposer d'un outil non-destructif qui permette de distinguer à temps un cartilage articulaire pathologique d'un sain et d'évaluer l'effet des différentes thérapies employées. L'échographie à haute fréquence possède les atouts nécessaires pour répondre à ce double défi. En effet, les ultrasons, sensibles aux changements mécaniques permettent de détecter les modifications morphologiques et structurales du cartilage induites par l'arthrose. Par ailleurs, cette technique détecte des changements locaux dans le cartilage de l'ordre de la résolution axiale (25 μ m à 50 MHz). L'acquisition 3-D et la numérisation du signal radio fréquence permettent, en plus de l'imagerie 2-D qualitative, la représentation de volume ou d'épaisseur et la mesure de paramètres acoustiques en vue d'une discrimination objective entre les tissus sains et pathologiques. A ces fins, nous avons étudié deux processus de modification du cartilage chez le rat: un modèle d'arthrose (induite par l'injection d'un agent chimique) et la maturation naturelle du tissu. Dans les deux projets, la mesure d'épaisseur par reconstruction 3-D et de la variation en fréquence des coefficients de réflexion et de rétrodiffusion ont permis une évaluation quantitative et objective (indépendante de l'appareil de mesure) des modifications débutantes et progressives du cartilage. Afin de mieux comprendre l'interaction onde/cartilage, des mesures de la vitesse ultrasonore et de la variation en fréquence de l'atténuation entre 25 et 70 MHz ont souligné que les ultrasons sont particulièrement sensibles au contenu en collagène et à l'orientation de ses fibres au sein du tissu. Nos résultats montrent la capacité des ultrasons à 50 MHz pour détecter des lésions dégénératives précoces du cartilage et permettent d'envisager l'évaluation de traitements pharmacologiques adéquats. A terme, la haute fréquence nécessitera le développement d'un outil d'investigation par voie intra-articulaire.

Bernard Pellaumail
Laboratoire d'Imagerie Paramétrique UMR CNRS 7623
15 rue de l'Ecole de Médecine
75006 PARIS
Tél : 01 44 41 49 72
Fax : 01 46 33 56 73
email: pellauma@idf.ext.jussieu.fr

BIBLIOGRAPHIE

- AGEMURA D.H., O'BRIEN W.D., Jr.

Ultrasonic propagation properties of articular cartilage at 100 MHz.

The Journal of the acoustical society of america, 1990, 87, 4, 1786-1791

- ALTMAN R.D.

Overview of osteoarthritis.

American journal of medicine, 1987, 83, sup. 4B, 65-69

- AYRAL X., DOUGADOS M.

Viability of chondroscopy as a mean of cartilage assessment.

Annals of the rheumatic diseases, 1995, 54, 8, 613-614

- AYRAL X., DOUGADOS M., LISTRAT V., et al.

Arthroscopic Evaluation of Chondropathy in Osteoarthritis of the Knee.

The Journal of rheumatology, 1996, 23, 4, 698-706

- AYRAL X., DOUGADOS M., LISTRAT V., et al.

Chondroscopy: a new method for scoring chondropathy.

Seminars in arthritis and rheumatism, 1993, 22, 5, 289-297

- BLAND Y.S., ASHURST D.E.

Development and ageing of the articular cartilage of the rabbit knee joint : distribution of the fibrillar collagens.

Anatomy and embryology, 1996, 194, 607-619

- BOEGARD T., JONSSON K.

Radiography in osteoarthritis of the knee.

Skeletal radiology, 1999, 28, 605-615

- BORTHAKUR A., HANCU I., BOADA F.E., et al.

In vivo triple quantum filtered twisted projection sodium MRI of human articular cartilage.

Journal of magnetic resonance, 1999, 141, 2, 286-290

- BORTHAKUR A., SHAPIRO E.M., BEERS J., et al.

Sensitivity of MRI to proteoglycan depletion in cartilage: comparison of sodium and proton MRI.

Osteoarthritis and cartilage, 2000, 8, 4, 288-293



- BUCKLAND-WRIGHT J.C., LYNCH J.A., DAVE B.

Early radiographic features in patients with anterior crucia ligament rupture.

Annals of the rheumatic diseases, 2000, 59, 8, 641-646

- BUCKLAND-WRIGHT J.C., WOLFE F., WARD R.J., et al.

Substantial superiority of semiflexed (MTP) views in knee osteoarthritis: a comparative radiographic study, without fluoroscopy, of standing extended, semiflexed (MTP), and schuss views.

The Journal of rheumatology, 1999, 26, 12, 2664-2674

- CASTANO OREJA M.T., QUINTANS RODRIGEZ M., CRESPO ABELLEIRA A., et al.

Variation in Articular Cartilage in Rabbits Between Weeks Six and Eight.

The Anatomical record, 1995, 241, 1, 34-38

- CHERIN E., SAÏED A., LAUGIER P., et al.

Evaluation of Acoustical Parameter Sensitivity to Age-Related and Osteoarthritic Changes in Articular Cartilage using 50-MHz Ultrasound.

Ultrasound in medicine & biology, 1998, 24, 3, 341-354

- CHEVRIER D.

Apport de la télémétrie à l'étude de l'arthrose expérimentale au mono-iodo-acétate chez le rat.-247p

Th. Méd.: Nancy I: 1993

- CHIANG E.H., LAING T.J., MEYER C.R., et al.

Ultrasonic Characterization of in vitro Osteoarthritic Articular Cartilage with Validation by Confocal Microscopy.

Ultrasound in medicine & biology, 1997, 23, 2, 205-213

- CLARK J.M.

The Organization of Collagen in Cryofractured Rabbit Articular Cartilage : A Scanning Electron Microscopic Study.

Journal of orthopaedic research, 1985, 3, 17-29

- DARDZINSKI B.J., MOSHER T.J., LI S., et al.

Spatial variation of T2 in human articular cartilage.

Radiology, 1997, 205, 2, 546-550

- D'ASTOUS F.T., FOSTER F.S.

Frequency Dependence of Ultrasound Attenuation and Backscatter in Breast Tissue.

Ultrasound in medicine & biology, 1986, 12, 10, 795-808

- DAYAN D., HISS Y., HIRSBERG A.

Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers?

Histochemistry, 1989, 93, 27-29

- DE PELLEGRIN M.P., MACKENZIE W.G., HARCKE H.T.

Ultrasonographic evaluation of hip morphology in osteochondrodysplasias.

Journal of pediatric orthopedics, 2000, 20, 5, 588-593

- DICHFIELD A., SAMPSON M.A., TAYLOR G.R.

Case reports. Ultrasound diagnosis of sleeve fracture of the patella.

Clinical radiology, 2000, 55, 9, 721-722

- DISLER D.G., RAYMOND E., MAY D.A., et al.

Articular cartilage defects: in vitro evaluation of accuracy a interobserver reliability for detection and grading with US.

Radiology, 2000, 215, 846-851

- ECKSTEIN F., SCHNIER M., HAUBNER M., et al.

Accuracy of cartilage volume and thickness measurements with magnetic resonance imaging.

Clinical orthopaedics and related research, 1998, 352, 137-148

- ERICKSON S.J., WALDSCHMIDT J.G., CZERVIONKE L.F., et al.

Hyaline cartilage : truncation artifact as a cause of trilaminar appearance with fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient-recalled sequences.

Radiology, 1997, 201, 260-264

- FRANCK L.R., BROSSMANN J., BUXTON R.B., et al.

Imaging truncation artifacts can create a false laminar appearance in cartilage.

American Journal of roentgenology, 1997, 168, 547-554

- GAGLIARDI J.A., CHUNG E.M., CHANDNANI V.P., et al.

Detection and staging of chondromalacia patellae : Relative efficacies of conventional MR imaging, MR arthrography, and CT arthrography.

American Journal of roentgenology, 1994, 163, 629-636

- GOLDBERG R.L., KOLIBAS L.M.

An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture.

Connective tissue research, 1980, 3-4, 265-275

- GOSS S.A., FRIZZELL L.A., DUNN F.

Ultrasonic Absorption and Attenuation in Mammalian Tissues.

Ultrasound in medicine & biology, 1979, 5, 2, 181-186

- GRAICHEN H., SPRINGER V., FLAMAN T., et al.

Validation of high-resolution water excitation magnetic resonance imaging for quantitative assessment of thin cartilages layers.

Osteoarthritis and cartilage, 2000, 8, 2, 106-114

- GREVENSTEIN J., MICHIELS I., ARENS-CORELL M.

Cartilage changes in rats induced by papain and the influence of treatment with N-acetylglucosamine.

Acta orthopaedica belgica, 1991, 57, 2, 157-161

- GROBBELAAR N., BOUFFARD J.A.

Sonography of the knee, a pictorial review.

Seminars in ultrasound, CT and MR, 2000, 21, 3, 231-274

- HALL C.S., SCOTT M.J., LANZA G.M., et al.

The extracellular matrix is an important source of ultrasound backscatter from myocardium.

The Journal of the acoustical society of america, 2000, 107, 1, 612-619

- HARTFORD J.M., BANIT D., HALL K., et al.

Radiographic analysis of low contact stress meniscal bearing total knee replacements.

The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2001, 83, 2, 229-234

- HASSLER G.B., RHYNE T.L., KOMOROWSKI R.

The lack of effect of hemodilution, myocardial water content, and increased coronary artery blood flow on integrated myocardial ultrasonic backscatter in the beating canine heart.

Ultrasonic imaging, 1993, 15, 1, 25-35

- HERRMANN J.M., PITRIS C., BOUMA B.E., et al.

High Resolution Imaging of Normal and Osteoarthritic Cartilage with Optical Coherence Tomography.

The Journal of rheumatology, 1999, 26, 627-635

- HOUGH A.J., jr.

Pathology of Rheumatoid Arthritis and allied Disorders

In: Arthritis and Allied Conditions / ed. par D. J. MCCARTY

Philadelphia: Lea & Febiger, 1989a.- p. 737-760

- HOUGH A.J., jr., SOKOLOFF L.

Pathology of Osteoarthritis

In: Arthritis and Allied Conditions / ed. par D. J. MCCARTY

Philadelphia: Lea & Febiger, 1989b.- p. 1571-1580

- HUNT J.W., ARDITI M., FOSTER F.S.

Ultrasound transducers for pulse-echo medical imaging.

IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 1983, 30, 8, 453-481

- HUNZIKER E.B.

Articular cartilage structure in humans and experimental animals

In: Articular Cartilage and Osteoarthritis / ed. par K. E. KUETTNER, R. SCHLEYERBACH, J. G. PEYRON and V. C. HASCALL

New York: Raven Press, 1982.- p. 183-199

- INEROT S., HEINEGARD D.

Bovine Tracheal Cartilage Proteoglycans. Variations in Structure and Composition with Age.

Collagen and related research, 1983, 3, 245-262

- KIM H.K.W., BABYN P.S., HARASIEWICZ K.A., et al.

Imaging of Immature Articular Cartilage Using Ultrasound Backscatter Microscopy at 50 MHz.

Journal of orthopaedic research, 1995, 13, 963-970

- KLDNY B., BAIL H., SWOBODA B., et al.

Cartilage thickness measurement in magnetic resonance imaging.

Osteoarthritis and cartilage, 1996, 4, 3, 181-186

- LEFEBVRE F., GRAILLAT N., CHERIN E., et al.

Automatic Three-Dimensional Reconstruction and Characterization of Articular Cartilage from High-Resolution Ultrasound Acquisitions.

Ultrasound in medicine & biology, 1998, 24, 9, 1369-1381

- LEHNER K.B., RECHL H.P., GMEINWIESE J.K.

Structure, function, and degeneration of bovine hyaline cartilage : assessment with MR imaging.

Radiology, 1989, 170, 2, 495-499

- LOEUILLE D., GONORD P., GUINCAMP C., et al.

In vitromagnetic resonance microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee joint.

The Journal of rheumatology, 1997, 24, 1, 133-139

- LOEUILLE D., OLIVIER P., MAINARD D., et al.

Magnetic resonance imaging of normal and osteoarthritic cartilage.

Arthritis and rheumatism, 1998, 41, 6, 963-975

- MANKIN H.J., BRANDT K.D.

Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis

In: Diagnosis and Medical/Surgical Management / ed. par R. W. MOSKOWITZ, D. S.

HOWEL, V. M. GOLDBERG and H. J. MANKIN

Philadelphia: WB Saunders, 1992.- p. 109-154

- MARTEL W., ADLER R.S., CHAN K., et al.

Overview: new methods in imaging osteoarthritis.

The Journal of rheumatology, 1991, 18, 27, 32-37

- MAYNE R.

Cartilage collagens What is their function, and are they involved in articular disease?

Arthritis and rheumatism, 1989, 32, 241-246

- MAZIERES B.

Les chondrocytes du cartilage de la rotule de lapin adulte

In: Osteoarthritis / ed. par J. G. PEYRON

1985.- p. 254

- MCDEVITT C.A.

Biochemistry of articular cartilage. Natural of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthrosis.

Annals of the rheumatic diseases, 1973, 32, 4, 364-378

- MEYER P., BURKHARDT H., PALOMBO-KINNE E., et al.

¹²³I-antileukoproteinase scintigraphy reveals microscopic cartilage alterations in the contralateral knee joint of rats with "monarticular" antigen-induced arthritis.

Arthritis and rheumatism, 2000, 43, 2, 298-310

- MILLER E.J., MATUKAS V.J.

Chick cartilage collagen : a new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species.

Proceedings of the Nation Academy Science, 1969, 64, 1264-1268

- MLYNARIK V., DEGRASSI A., TOFFANIN R., et al.

Investigation of laminiar appearance of articular cartilage by means of magnetic resonance microscopy.

Magnetic resonance imaging, 1996, 14, 4, 435-442

- MORAN C.M., BUSH N.L., BAMBER J.C.

Ultrasonic propagation properties of excised human skin.

Ultrasound in medicine & biology, 1995, 21, 9, 1177-1190

- MUIR H., BULLOUGH P., MAROUDAS A.

The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications.

The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1970, 52 B, 3, 554-563

- MYERS S.I., DINES K., BRANDT D.A., et al.

Experimental Assessment by High Frequency Ultrasound of Articular Cartilage Thickness and Osteoarthritic Changes.

The Journal of rheumatology, 1995, 22, 109-116

- O'BRIEN W.D., Jr.

The role of collagen in determining ultrasonic propagation properties in tissue

In: Acoustical Holography / ed. par L. KESSLER

New York: Plenum Press, 1976. 7,- p. 37-50

- O'CONNOR P., BRERETON J.D., GARDNER D.L.

Hyaline articular cartilage dissected by papain : light and scanning electron microscopy and micromechanical studies.

Annals of the rheumatic diseases, 1984, 43, 2, 320-326

- O'DONNELL M., MIMBS J.W., MILLER J.G., et al.

Relationship between collagen and ultrasonic backscatter in myocardial tissue.

The Journal of the acoustical society of america, 1981, 69, 2, 580-588

- PETIT B., JULLIARD A.K., HERBAGE D., et al.

Composition et organisation du réseau fibreux collagène du cartilage articulaire

In: Actualités en physiopathologie et pharmacologie articulaires 1 / ed. par A. GAUCHER,

J. POUREL, P. NETTER and M. KESSLER

Masson, 1989.

- POHLAMMER J., O'BRIEN W.D., Jr.

Dependence of the ultrasonic scatter coefficient on collagen concentration in mammalian tissues.

The Journal of the acoustical society of america, 1981, 69, 1, 283-285

- RAUM K., O'BRIEN W.D., Jr.

Pulse-Echo Field Distribution Measurement Technique for High-Frequency Ultrasound Sources.

IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, 1997, 44, 810-815

- RAVAUD P., DOUGADOS M.

Radiography Assessment in Osteoarthritis.

The Journal of rheumatology, 1997, 24, 4, 786-791

- RECHT M.P., PIRAINO D.W., PALETTA G.A., et al.

Accuracy of fat-suppressed three-dimensional spoiled grass echo FLASH MR imaging in the detection of patellofemoral articular cartilage abnormalities.

Radiology, 1996, 198, 1, 209-212

- RECHT M.P., RESNICK D.

MR imaging of articular cartilage : current status and futur directions.

American Journal of roentgenology, 1994, 163, 283-290

- ROBERJOT V., LAUGIER P., BERGER G.

Anisotropy in bovine skeletal muscle in vitro: Frequency dependent attenuation and backscatter coefficient over a wide range of frequencies.

IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings, 1994, 3, 1467-1470

- SAÏED A., CHERIN E., GAUCHER H., et al.

Assessment of Articular Cartilage and Subchondral Bone : Subtle and Progressive Changes in Experimental Osteoarthritis Using 50 MHz Echography in vitro.

Journal of bone and mineral research, 1997, 12, 9, 1378-1386

- SCIULLI R.L., BOUTIN R.D., BROWN R.R., et al.

Evaluation of the postoperative meniscus of the knee: a study comparing conventional arthrography, conventional MR imaging, MR arthrography with iodinated constrast material and MR arthrography with gadolinium-based constrast material.

Skeletal radiology, 1999, 28, 9, 508-514

- SEHGAL C.M., GREENLEAF J.F.

Scattering of Ultrasound by Tissues.

Ultrasonic imaging, 1984, 6, 60-80

- SENZIG D.A., FORSTER F.K.

Ultrasonic attenuation in articular cartilage.

The Journal of the acoustical society of america, 1992, 92, 2, 676-681

- SIMON L., BLOTMAN F., CLAUSTRE J.

Rhumatologie.-2 ed.

Paris: Masson, 1977.- 569p.

- SIMON W.H., WOHL D.L.

Water content of equine articular cartilage : effects of enzymatic degradation and 'artificial fibrillation'.

Connective tissue research, 1982, 9, 4, 227-232

- STOCKWELL R.A., MEACHIM G.

The chondrocytes

In: Adult Articular Cartilage / ed. par M. A. R. FREEMAN

London: Pitman Medical, 1979.- p. 69-145

- TAYLOR B.N., PARKER W.H., LANGENBERG D.N.

American Institute of Physics handbook.-ed.

New York: McGraw-Hill, 1972.-

- THONAR E.J., BUCKWALTER J.A., KUETTNER K.E.

Maturation-related differences in the structure and composition of proteoglycans synthesized by chondrocytes from bovine articular cartilage.

The Journal of biological chemistry, 1986, 261, 5, 2467-2474

- TOMLINSON J.E., REDDING W.R., SAGE A.

Ultrasonographic evaluation of tarsocrural joint cartilage in normal adult horses.

Veterinary radiology & ultrasound, 2000, 41, 5, 457-460

- TÖYRÄS J., RIEPPO J., NIEMINEN M.T., et al.

Characterization of enzymatically induced degradation of articular cartilage using high frequency ultrasound.

Physics in medicine and biology, 1999, 44, 2723-2733

- TUTHILL T.A., BAGGS R.B., VIOLANTE M.R.

Ultrasound properties of liver with and without particulate contrast agents.

Ultrasound in medicine & biology, 1991, 17, 3, 231-237

- VAN DER STEEN A.F.W., CUYPERS M.H.M., THIJSSSEN J.M., et al.

Influence of Histochemical Preparation on Acoustic Parameters of Liver Tissue : A 5-MHz Study.

Ultrasound in medicine & biology, 1991, 17, 9, 879-891

- VANDE BERG B.C., LECOUVET F.E., POILVACHE P., et al.

Dual-detector spiral CT arthrography of the knee: accuracy for detection of meniscal abnormalities and unstable meniscal tears.

Radiology, 2000, 216, 3, 851-857

- VENN M.F.

Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage.

Annals of the rheumatic diseases, 1978, 37, 2, 168-174

- VIGNON E., MAZIERES B.

Le chondrocyte

In: L'arthrose: perspectives et réalités / ed. par L. SIMON and G. LOYAU

Paris: Masson, 1987.- p.

- WATRIN A.

Influence des constituants matriciels non collagéniques du cartilage rotulien dans la genèse du signal RMN et ultrasonore : Etude d'un modèle de dégradation in vitro par la hyaluronidase chez le rat.-34p

D.E.A. de Biologie Ostéoarticulaire, Biomécanique et Biomatériaux: Nancy I: 1998

- WOESSNER J.F.

The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of the imino acid.

Archives of Biochemistry and biophysics, 1961, 93, 440-447

- YAMADA K.

Effects of Streptomyces hyaluronidase digestion on the histochemical reactions of proteoglycans in cartilage compared with its effects on certain non-cartilaginous tissues.

1982, 14, 149-160

- YE S.G., HARASIEWICZ K.A., PAVLIN C.J., et al.

Ultrasound characterization of normal ocular tissue in the frequency range from 50 MHz to 100 MHz.

IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, 1995, 42, 1, 8-14

- YU S.W.K., SHAW S.M., VAN SICKLE D.C.

Radionuclide Studies of Articular Cartilage in the Early Diagnosis of Arthritis in the Rabbit.

Annals of the Academy of Medicine, Singapore, 1999, 28, 44-48

- ZHU W., MOW V.C., KOOB T.J., et al.

Viscoelastic Shear Properties of Articular Cartilage and the Effects of Glycosidase Treatments.

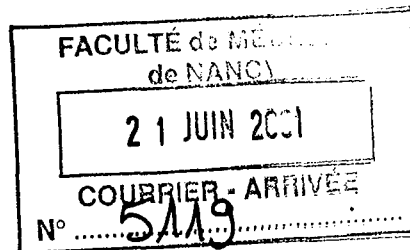
Journal of Orthopaedic Research, 1993, 11, 6, 771-781

- ZIRN J.R., SCHURMAN D.J., SMITH R.L.

Keratan sulfate content and articular cartilage maturation during postnatal rabbit growth.

Journal of Orthopaedic Research, 1984, 2, 143-150





Nom : Monsieur PELLAUMAIL
Prénom : Bernard

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

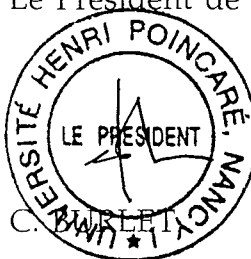
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 20 juin 2001 n° 532

Le Président de l'Université



RÉSUMÉ en français

OBJECTIF : Les moyens actuels d'imagerie utilisés en clinique ne permettent de détecter que les stades tardifs de la dégénérescence du cartilage induite par les pathologies articulaires. Notre équipe a montré les capacités de l'échographie quantitative à 50 MHz (25 µm de résolution) de détecter les lésions précoces et locales induites par un modèle d'arthropathie chez le rat. Le but du présent travail de thèse est de comprendre l'interaction de l'onde ultrasonore avec le cartilage et de déterminer l'influence des constituants matriciels sur la propagation de l'onde ultrasonore à haute fréquence.

MATERIEL ET METHODES : Les moyens utilisés sont l'étude à 50 MHz du cartilage rotulien de rat à différents stades de sa maturation et après des processus de dégradation sélective des constituants. Les données ultrasonores quantitatives (paramètres acoustiques estimés dans la bande passante 30-80 MHz) sont confrontées aux résultats histologiques et biochimiques.

RESULTATS : Le collagène semble influencer de façon prépondérante la propagation ultrasonore. On a pu mettre en évidence l'influence de l'orientation des fibres de collagène sur la rétrodiffusion, du contenu en collagène sur la célérité et le coefficient intégral d'atténuation et du changement du diamètre des fibres sur la variation de la dépendance en fréquence de l'atténuation. Nous avons montré que la variation du contenu en protéoglycane n'induit pas de modifications du signal ultrasonore à haute fréquence.

CONCLUSION : Ces résultats innovants sont d'un grand intérêt pour l'imagerie quantitative de haute résolution du cartilage articulaire et permettent d'envisager l'utilisation de cette technique pour évaluer l'effet de molécules thérapeutiques sur le cartilage et la biointégration de biomatériaux de réparation du cartilage.

TITRE en anglais

ULTRASOUND CHARACTERIZATION (50 MHz) OF RAT PATELLAR CARTILAGE :
INFLUENCE OF MATRIX CONSTITUENTS ON ULTRASOUND WAVE PROPAGATION

RÉSUMÉ en anglais

PURPOSE: Current clinical non-invasive imaging modalities allow the detection of advanced cartilage degeneration stages induced by articular pathologies. Our group has shown that 50 MHz ultrasonography (25-µm-axial resolution) coupled with tissue characterization was sensitive to early and local lesions induced by a experimental osteoarthritis in rat. The goal of the current work is to understand the interaction between ultrasound (US) and cartilage and determine the influence of the tissue matrix constituents on US wave propagation.

MATERIALS AND METHODS: To this end, samples of rat patellar cartilage were explored at 50 MHz during maturation process and after selective degradation of matrix constituents. US quantitative data (acoustic parameters estimated in the 30-80 MHz bandwidth) were compared to histologic and biochemical findings.

RESULTS: Our results demonstrate that high frequency US wave propagation is affected by collagen. Apparent integrated backscatter is sensitive to collagen fiber orientation. Speed of sound and integrated attenuation coefficient are related to collagen content while changes in the frequency dependence of the attenuation is linked to changes in collagen fiber diameter. However changes in proteoglycan content do not have any effect on US wave propagation.

CONCLUSION: Current original findings indicate that high resolution quantitative ultrasonography is of a great interest for the characterization of articular cartilage and suggest that this technique may be helpful for the quantitative evaluation of pharmacological treatment effects and biointegration of biomaterials used for cartilage repair.

DISCIPLINE

GENIE BIOLOGIQUE ET MEDICAL

MOTS-CLÉS

Cartilage articulaire, Echographie de haute fréquence, Ultrasons, Caractérisation tissulaire, Collagène, Protéoglycanes, Anisotropie, Maturation, Dégradation enzymatique, Rétrodiffusion, Atténuation, Célérité, Rat, Images paramétriques

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

UMR 7561 CNRS-UNIVERSITE NANCY I
LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE
FACULTE DE MEDECINE - BP 184
54505 VANDOEUVRE LES NANCY