



**HAL**  
open science

# Arthrose des membres inférieurs : aspects épidémiologiques, cliniques et fondamentaux

Christian Roux

► **To cite this version:**

Christian Roux. Arthrose des membres inférieurs : aspects épidémiologiques, cliniques et fondamentaux. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4001 . tel-01249544

**HAL Id: tel-01249544**

**<https://theses.hal.science/tel-01249544>**

Submitted on 4 Jan 2016

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

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

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS  
UFR SCIENCES

THESE

**Arthrose des membres inférieurs :  
Aspects épidémiologiques, cliniques et fondamentaux.**

Présentée pour obtenir le titre de  
Docteur es Sciences de l'Université de Nice-Sophia Antipolis  
Spécialité: Interactions moléculaires et cellulaires

Christian ROUX

Soutenue publiquement le 7 février 2013 devant le jury composé de :

Professeur Philippe Paquis  
Professeur Liana Euller-Ziegler  
Professeur Sandrine Guis  
Professeur Bernard Mazières  
Docteur Serge Luquet  
Docteur Ez-Zoubir Amri

# REMERCIEMENTS

Toute thèse ne peut être un travail solitaire, je tiens à remercier les personnes qui m'ont donné l'opportunité de réaliser cette thèse de doctorat en sciences dans un environnement de très grande qualité:

Madame le Professeur Liana Euller-Ziegler sans qui rien n'aurait été possible, qui m'a accueillie dans son service, qui a toujours su me guider, me soutenir et me placer dans les conditions idéales. Madame et cher maître, je tiens à vous remercier pour tout ceci mais aussi pour tout le reste et notamment pour m'avoir fait bénéficier de vos compétences scientifiques et permis d'apprécier vos réelles qualités humaines.

Le docteur Ez-Zoubir Amri, mon directeur de thèse, qui m'a accepté au sein de son équipe et a mis à ma disposition son expertise, sa disponibilité, sa générosité et les ressources de son laboratoire. Je tiens à te remercier de tout ce que tu as fait durant ces trois années qui en définitive auront été trop courtes et qui je l'espère seront le tremplin vers une collaboration scientifique riche.

Le Professeur Véronique Breuil, qui m'a soutenu, aidé durant cette période et qui est l'une des co-instigatrices de ce travail notamment pour sa partie fondamentale. Je me souviens encore de notre discussion, il y a trois ans, et de cette idée que j'avais du mal à appréhender dont tu as su me montrer tout le potentiel. Encore merci de ton aide et de ton investissement.

Le Professeur Philippe Paquis, qui me fait l'honneur d'être le président de mon jury de thèse. Cher maître, je souhaite aussi profiter de cette occasion pour vous remercier de votre disponibilité et de la relation privilégiée que vous avez toujours entretenu avec notre service, notamment pour la prise en charge de nos patients.

Les deux personnes qui ont accepté de se rendre disponible pour la soutenance et d'être rapporteurs pour ce travail, le Professeur Sandrine Guis et Serge Luquet. Je vous remercie du temps précieux que vous avez investi pour évaluer ce travail. Chère Sandrine, encore une fois merci pour ton soutien, ta gentillesse et ton amitié.

Le professeur Bernard Mazières, qui me fait le plaisir d'être membre de mon jury de thèse. Bernard, je t'en remercie et sache que toutes ces années passées à tes côtés au sein du conseil scientifique de Khoala ont été pour moi très enrichissantes. Je te remercie de m'avoir fait profiter de ton expertise et j'espère que ce travail sur le Schuss ne sera que le premier d'une collaboration riche.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont su m'accueillir au sein du laboratoire, m'aider et accepter de m'expliquer et de me réexpliquer. Didier, je te remercie pour toutes tes explications, du temps passé et juste une chose : changes de lecture et arrête de « martyriser » tes étudiants. Mais aussi Hédi pour son travail et son professionnalisme ainsi que Mansour. Maud et Ryan pour leur soutien et leur bonne humeur (je vous souhaite bonne chance pour la suite, mais je suis très confiant car vous êtes dans le meilleur environnement que vous auriez pu avoir).

Et enfin bien entendu, je tiens à remercier ma famille, ma femme pour son soutien dans toutes ces périodes longues et difficiles.

## Table des matières

I. Introduction :	3
A. Préambule :	3
B. Définition	5
a) Classifications	6
b) Critères diagnostiques	7
C. Clinique	9
a) Sémiologie	10
b) Topographie	13
c) Biologie	15
d) Imagerie	15
D. Epidémiologie	18
a) Epidémiologie descriptive	18
b) Facteurs de risques :	25
E. Traitement (tableau 5)	37
a) Moyens non pharmacologiques	38
b) Moyens pharmacologiques	39
i) Traitements pharmacologiques locaux	40
j) Traitements pharmacologiques généraux	41
c) Principes de base	44
d) Perspectives thérapeutiques	44
F. Physiopathologie	45
a) Principaux composants de l'articulation	45
b) Chondrogenèse	48
G. Cartilage normal et cartilage arthrosique	53
a) Caractéristiques du cartilage normal	53
b) Caractéristiques du cartilage arthrosique	54
H. Facteurs intervenants dans la dégradation de cartilage	57
a) Cytokines	58
b) Interleukine-1 $\beta$	58
c) TNF $\alpha$	60
d) Il-6 et autres cytokines	61

e)	Métalloprotéases (MMPs).....	62
f)	ADAMTS .....	64
g)	TGFβ (The transforming growth factor-beta).....	65
h)	Monoxyde d'Azote (NO).....	66
I.	Inflammation .....	66
J.	Relations os-arthrose .....	70
a)	Densité minérale osseuse .....	70
b)	Os sous-chondral.....	70
c)	Ostéophytes.....	72
K.	Cellules souches .....	72
a.	Généralités : .....	72
b.	Cellules souches mésenchymateuses.....	75
c.	Obtention et propriétés des cellules hMADS .....	77
L.	Ocytocine.....	78
M.	Modèles d'arthrose expérimentale .....	81
II.	RESULTATS .....	86
A.	Epidémiologie de l'arthrose des membres inférieurs .....	86
B.	Schuss .....	97
C.	Caractérisation d'un modèle reproductible de chondrogenèse à partir d'une lignée de cellules souches humaines du tissu adipeux .....	104
D.	Rôle de l'ocytocine dans l'arthrose.....	101
III.	DISCUSSION .....	104
IV.	PERSPECTIVES .....	106
V.	Références : .....	108

# I. Introduction :

## A. Préambule :

L'arthrose est la pathologie dont la prévalence est la plus élevée en Rhumatologie. Elle est responsable d'une morbidité majeure, particulièrement dans les pays développés dont la population est vieillissante, et où elle constitue une cause majeure d'invalidité mais aussi de mortalité [1, 2,3,4,5].

Les données épidémiologiques sont essentielles, car elles permettent une meilleure connaissance de la maladie et donc contribuent aux avancées cliniques, thérapeutiques et fondamentales et à la conduite des différentes politiques de santé publique. En France, cette pathologie est devenue une priorité de santé publique. En France, jusqu'à peu il n'existait aucune donnée épidémiologique en population générale sur l'arthrose des membres inférieurs. J'ai débuté mes travaux épidémiologiques lors de mon DEA portant sur l'impact des maladies ostéoarticulaires sur la qualité de vie ce qui m'a conduit à m'intéresser à l'épidémiologie encore mal connue en France de l'arthrose des membres inférieurs.

Mon implication clinique dans le service de Rhumatologie du professeur Euler-Ziegler m'a permis d'explorer l'aspect clinique et thérapeutique de cette maladie pour laquelle nous restons encore très démunis.

Les connaissances fondamentales de l'arthrose ont beaucoup évolué ces dernières années mais restent encore parcellaires. Nous sommes passés d'une conception purement « mécanistique » de la maladie ou l'arthrose correspondait à une usure lente et inéluctable du cartilage à une conception moléculaire et « inflammatoire » où le cartilage, la membrane synoviale et l'os sous chondral participent au remodelage de l'articulation. Une action systémique notamment au travers du rôle des adipokines a été mise en évidence dans l'arthrose. Le lien ostéoporose – arthrose est évoqué depuis de nombreuses années. Bien que l'on oppose souvent ces deux pathologies, ostéoblastes et chondrocytes partagent le même précurseur cellulaire et les schémas

physiopathologiques des deux maladies sont très proches. L'ocytocine est une hormone exprimée dans un grand nombre de cellules dont les ostéoblastes et les adipocytes [6]. Son rôle dans l'ostéoporose a été démontré [7, 8]. A ce jour aucune donnée sur son éventuel rôle dans l'arthrose n'a été publiée.

Ma thèse, porte sur l'aspect épidémiologique de l'arthrose, notamment sa prévalence, et sa clinique avec une étude comparant l'apport pour le diagnostic de gonarthrose de radiographies du genou antéro-postérieures de face et en Schuss, ainsi qu'à sa thérapeutique, avec un travail en cours de finalisation sur l'intérêt du méthotrexate dans l'arthrose érosive des doigts. Je me suis également intéressé aux aspects fondamentaux avec la recherche d'un éventuel rôle direct et/ou indirect de l'ocytocine. Pour cela, nous avons utilisé un modèle cellulaire les cellules : "Multipotent Adipose tissue Derived Stem"(hMADS) développé dans notre laboratoire de recherche ainsi qu'un modèle animal (rat ligamentoplasté). La première étape de ce travail étant de montrer les capacités chondrogéniques des hMADS. La deuxième étape étant de tester l'effet de l'ocytocine sur ces mêmes cellules et sur un modèle animal de rat ligamentoplasté.



## B. Définition

Maladie de l'articulation (**figure 1**), caractérisée par une dégradation du cartilage, associée à une ostéophytose marginale, à des remaniements de l'os sous-chondral et à une inflammation minime de la membrane synoviale, l'arthrose se développe souvent dans le contexte d'une surcharge mécanique qui aboutit à une authentique maladie biochimique du cartilage. D'autres facteurs peuvent intervenir, comme un stress mécanique. Le défaut de réparation des premières lésions aggrave la maladie qui s'installe dans un cercle vicieux. Il s'agit d'une maladie qui touche l'articulation dans sa globalité.

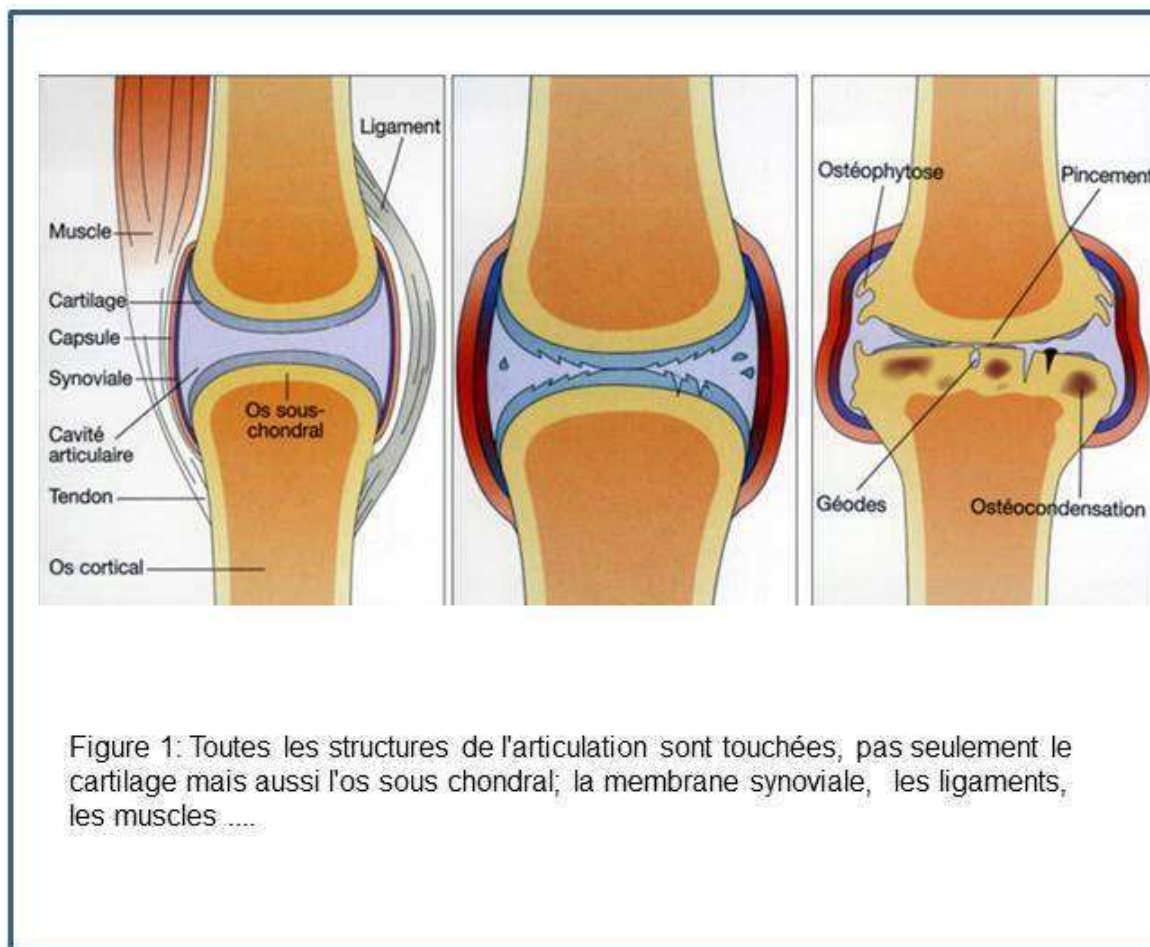


Figure 1: Toutes les structures de l'articulation sont touchées, pas seulement le cartilage mais aussi l'os sous chondral; la membrane synoviale, les ligaments, les muscles .....

## a) Classifications

On peut distinguer les arthroses primitives et les arthroses secondaires. De nombreux désordres ont été reconnus comme facteurs d'arthrose secondaire. Ils peuvent être divisés en 4 catégories principales : métabolique, anatomique, traumatique et inflammatoire (**Tableau 1**).

La distinction entre arthrose primaire et secondaire n'est pas toujours claire, d'autant plus que certains sujets qui développent une arthrose secondaire peuvent présenter une prédisposition à développer une arthrose.

### Causes des arthroses secondaires

Métaboliques	Anatomiques	Traumatiques	Inflammatoires
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Arthropathie microcristalline (goutte, chondrocalcinose)</li> <li>■ Acromégalie</li> <li>■ Ochronose</li> <li>■ Hémochromatose</li> <li>■ Maladie de Wilson</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Dysplasie de hanche</li> <li>■ Ostéochondrite de l'enfance (maladie de Leggs-Perthes-Calvé)</li> <li>■ Épiphysiolyse de l'adolescent</li> <li>■ Coxopathie pagétique</li> <li>■ Ostéonécrose aseptique</li> <li>■ Inégalité de longueur des membres (&gt;2 cm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Fracture cotyloïdienne</li> <li>■ Fracture articulaire</li> <li>■ Chirurgie articulaire (ménisectomie)</li> <li>■ Traumatisme articulaire sévère</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Tout rhumatisme inflammatoire (spondylarthrite, polyarthrite rhumatoïde)</li> <li>■ Arthrite microcristalline (goutte, chondrocalcinose)</li> <li>■ Arthrite septique</li> </ul>

Tableau 1 : Causes des arthroses secondaires[9]

## **b) Critères diagnostiques**

Il n'y a pas de consensus clair quant aux critères diagnostiques d'arthrose à utiliser dans les études épidémiologiques. Ils font classiquement appel à la symptomatologie clinique et à l'imagerie que nous développerons plus loin. Pour l'imagerie, malgré le développement de nouvelles techniques les radiographies restent la technique la plus facilement accessible et la plus communément utilisée. La nécessité d'une standardisation est apparue particulièrement pour certaines articulations, avec des difficultés qui ont conduit à une multiplicité de protocoles.

L'arthrose d'une articulation peut être définie par la présence de symptômes cliniques seuls, par la présence de signes radiographiques évocateurs, ou par l'association de signes radiologiques et cliniques qui est considérée par la plupart des auteurs comme la définition la plus pertinente [10-12].

Les critères les plus communément utilisés sont ceux de l'American Collège of Rheumatology (ACR) : Tableau 2[10-12]. Ces critères permettent d'identifier des sujets avec une arthrose. Mais en fait ces critères n'ont pas été établis pour le diagnostic, et le non-respect des critères de classification ACR n'exclut pas une arthrose.

Ces algorithmes se distinguent des classifications radiologiques, telle celle de Kellgren et Lawrence (KL), qui ne prennent en compte que les lésions visibles à la radiographie, ne s'intéressent pas aux symptômes, et peuvent donc s'appliquer à des sujets asymptomatiques.

Ces algorithmes ont été développés en comparant des sujets porteurs d'une arthrose diagnostiquée cliniquement avec un groupe contrôle présentant des douleurs articulaires liées à d'autres pathologies non arthrosiques.

Le tableau 2 illustre les critères pour la hanche, le genou et la main [10-12].

Ils trouvent leur principal intérêt notamment dans les études cliniques, où il est indispensable d'utiliser des méthodologies similaires, permettant des comparaisons. Bien entendu, dans les études de prévalence en population générale, leur utilisation fournit des chiffres de prévalence plus bas que l'utilisation des critères radiologiques traditionnels.

<b>Critères ACR</b>			
<b>Genou classification clinique</b>	<b>Genou classification clinique et radiologique</b>	<b>Main format traditionnel</b>	<b>Hanche critères combinés</b>
arthrose fémoro-tibiale	arthrose fémoro-tibiale		
cliniques	cliniques+ radiologiques	format traditionnel	cliniques + radiologiques + laboratoire
douleur du genou et au moins 3 des 6 items cliniques	douleur du genou et au moins un des 3 premiers items cliniques	douleurs de la main avec gonflement et 3 des 4 items suivants	douleur de hanche et au moins 2 des items suivants
âge > 50 ans	<b>et</b>		VS inférieure à 20
raideur matinale < 30 min	ostéophytes radiographiques	augmentation de volume de plus de 2 articulations sélectionnées *	radiographies: ostéophytes fémoraux, acétabulaires
crépitement		augmentation de volume de 2 interphalangiennes distales ou plus	radiographies: pincement supérieur, axial,et/ou médial
douleur osseuse péri articulaire		moins de 3 articulations metacarpophalangiennes gonflées	
hypertrophie osseuse périarticulaire		déformation d'au moins 1 articulation des 10 sélectionnées	
absence de chaleur locale			

Tableau 2 : Critères de l'American College of Rheumatology

\*Main ; articulations sélectionnées : 2° et 3° Interphalangiennes distales, 2° et 3° Interphalangiennes proximales ,1° Metacarpophalangiennes des 2 côtés.

## C. Clinique

La symptomatologie de l'arthrose associe douleurs articulaires, difficultés locomotrices incapacités fonctionnelles de degré variable avec une forte variabilité de l'expression phénotypique. Age de début, origine de l'atteinte articulaire, et rapidité de progression varient d'un patient à l'autre et selon l'articulation. L'arthrose peut être une découverte fortuite chez un sujet asymptomatique lors d'un examen clinique ou radiologique, ou représenter une maladie douloureuse et invalidante touchant parfois plusieurs articulations. La correspondance anomalies structurales visualisées par l'imagerie et incapacité n'est que partielle et varie selon l'articulation[13].

Les articulations les plus fréquemment touchées sont les interphalangiennes des doigts, le rachis, les genoux, les hanches puis la première métatarsophalangienne par ordre de fréquence (Figure 2).

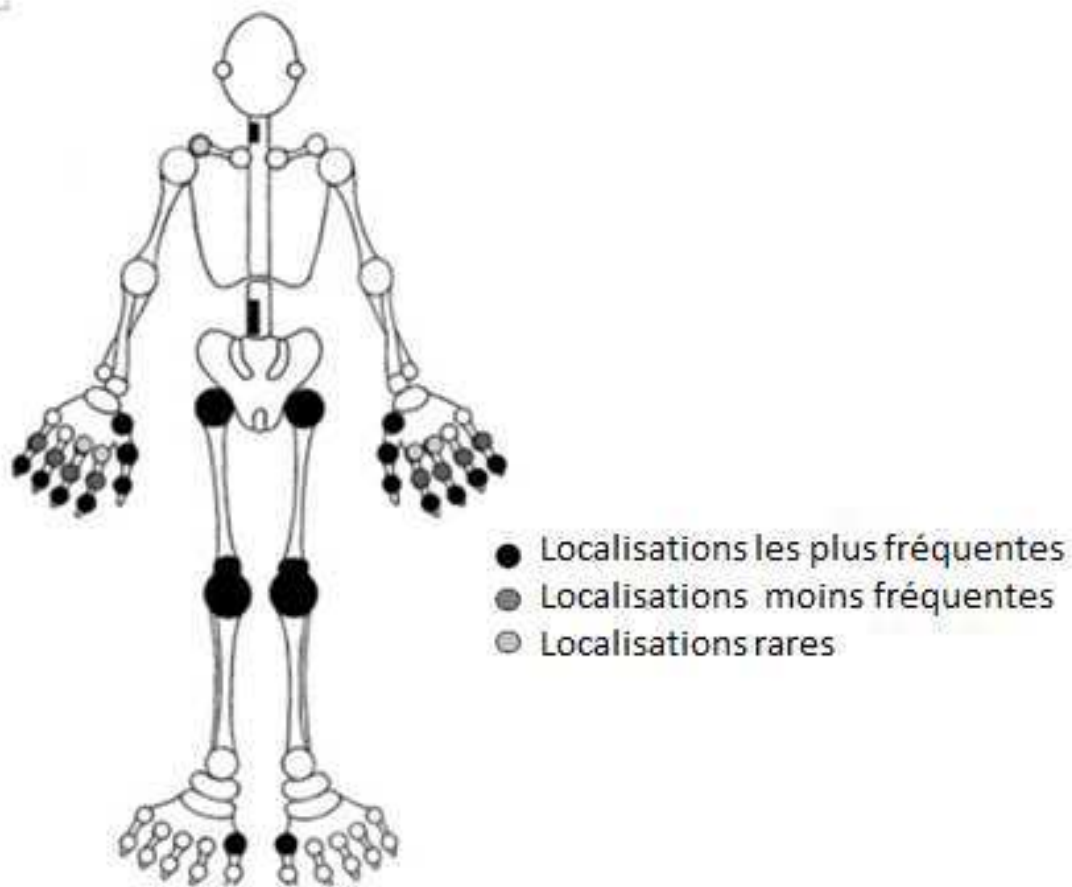


Figure 2 : principales localisations arthrosiques

### a) Sémiologie

La douleur est le plus souvent le symptôme qui conduit le patient à consulter. Enraidissement, incapacité fonctionnelle font aussi partie des symptômes fréquemment rencontrés à côté des déformations articulaires (remodelage osseux, ostéophytose, subluxations) ou du gonflement des articulations traduisant un épanchement intra articulaire. Ces manifestations apparaissent généralement sur une ou plusieurs articulations chez des personnes d'âge moyen ou plus âgées [13]. Des signes cliniques tels que fièvre, anémie et perte de poids ne font pas partie des manifestations classiquement retrouvées.

La douleur est bien souvent décrite comme sourde, localisée à l'articulation touchée, aggravée par l'utilisation et soulagée par le repos (douleur mécanique). C'est habituellement le symptôme le plus gênant. Le rythme et l'intensité de la douleur que l'on peut évaluer à l'aide d'une échelle visuelle analogique peuvent varier au cours de l'évolution de la maladie. L'origine de la douleur dans l'arthrose n'est pas complètement élucidée: fibres nociceptives et mécanorécepteurs dans la synoviale, os sous-chondral, périoste, capsule, tendons ou ligaments. Interviennent sans doute aussi des lésions de la moelle osseuse, une synovite, un épanchement par le biais d'une stimulation de fibres nociceptives et d'une hypertension intra-articulaire. Le cartilage hyalin lui-même n'est pas innervé et n'est pas à l'origine de la douleur. L'évolution de la douleur se fait en 3 étapes, pas toujours présentes, chaque étape pouvant être interrompue.

Au début, la douleur est vive, prévisible et intermittente, provoquée par la mise en charge ou encore l'activité, le retentissement sur la fonction est minime.

Une deuxième étape comporte une douleur de légère à modérée, régulière, avec gêne pour les activités quotidiennes et épisodes imprévisibles de rigidité.

Une troisième étape (tardive) voit s'installer une douleur constante, lancinante, avec de courts épisodes souvent imprévisibles de douleurs intenses, des douleurs épuisantes avec de graves limitations fonctionnelles.

La douleur arthrosique varie dans le temps et peut-être selon les saisons. Elle est plus importante au réveil le matin, avec amélioration dans les heures qui suivent, elle s'aggrave ensuite dans l'après-midi et en début de soirée pour se réduire plus tard. Une douleur nocturne, dont l'origine pourrait être l'os sous-chondral, peut être présente entraînant des troubles du sommeil, de la fatigue, un manque de bien-être, et une sensibilité accrue à la douleur. On peut la rencontrer notamment dans l'arthrose de hanche sévère pour laquelle elle est souvent associée à un épanchement.

L'enraidissement articulaire est un fait commun dans l'arthrose, bien que classiquement reconnu comme une manifestation des polyarthrites rhumatoïdes pour lesquelles il peut durer plusieurs heures, dans l'arthrose il est court n'excédant pas

20 à 30 minutes. C'est une difficulté ou un inconfort du mouvement causé par un manque de souplesse de l'articulation. L'enraidissement est généralement davantage présent en début de matinée, mais peut également survenir plus tard, le plus souvent après des périodes d'inactivité. L'enraidissement matinal comme celui lié à l'inactivité s'améliore rapidement et disparaît avec l'utilisation de l'articulation. Par la suite cependant les douleurs articulaires vont s'aggraver avec l'utilisation prolongée de l'articulation.

Limitation locomotrice et gêne fonctionnelle dépendent de l'articulation touchée et de la gravité de l'arthrose: gêne à la préhension pour la rhizarthrose, gêne à la marche et difficulté à se lever de la position assise pour les atteintes des genoux ou des hanches. Elles dépendent aussi des activités quotidiennes habituelles de l'individu et des exigences pour le travail et les loisirs. Elles peuvent être liées à la douleur, à la raideur ou encore à la présence d'un épanchement, qui limitent le jeu articulaire. L'atteinte fonctionnelle dans l'arthrose peut s'évaluer lors de la consultation en interrogeant le malade sur ses activités (monter les marches d'escaliers, activités ménagères, activités sexuelles...). Des outils spécifiques sont disponibles pour évaluer leur retentissement notamment pour le genou, la hanche et la main.

Les principaux signes d'examen de l'arthrose sont la limitation/réduction des amplitudes articulaires, la sensibilité de l'interligne articulaire, l'augmentation de volume articulaire (os, épanchement), les déformations ainsi que la présence de craquements.

Une sensibilité intra et périarticulaire est commune dans l'arthrose. Les deux pouvant être présentes simultanément. La limitation des mouvements actifs et passifs résulte principalement de l'épaississement capsulaire, de l'ostéophytose marginale, de l'hyperplasie synoviale et parfois d'un épanchement. Un flessum est fréquent aux genoux, aux hanches, aux coudes dans l'arthrose sévère évoluée.

Un gonflement d'origine osseuse est habituellement présent: modeste (Interphalangiennes, rhizarthrose) ou important (genou, coude). Il combine remodelage osseux, ostéophytose marginale, subluxation. Il peut s'associer à un



épanchement et à des déformations. Dans les formes graves il peut y avoir une instabilité, une destruction articulaire marquée et une importante amyotrophie [13].

## **b) Topographie**

L'arthrose peut toucher n'importe quelle articulation avec comme sièges préférentiels les genoux, les hanches, les mains (atteinte inter phalangienne distale et rhizarthrose), les poignets, la colonne vertébrale avec les articulations postérieures du rachis (Figure 2).

La gonarthrose fémoro-tibiale est la cause la plus fréquente de handicap des membres inférieurs chez les personnes âgées. Généralement bilatérale, souvent avec prédominance des douleurs d'un côté, elle touche surtout le compartiment articulaire fémoro-tibial médial, parfois le compartiment latéral ou les deux. L'atteinte unilatérale est plus fréquente chez l'homme jeune après blessure, traumatisme et chirurgie. La douleur est antéro-médiale généralement aggravée par la position assise prolongée, au lever de chaises basses, aux montées et surtout aux descentes d'escaliers ou de rampes. La symptomatologie est typiquement celle de l'arthrose avec la particularité d'un possible kyste poplité (kyste de Baker). Une amyotrophie quadricipitale souvent présente peut contribuer à une sensation d'instabilité[13].

L'arthrose de la hanche, volontiers uni latérale, se traduit par une douleur habituellement profonde à l'aîne, à la cuisse latérale ou antéro-supérieure, à la fesse, et parfois au genou où elle peut prédominer. La douleur est exacerbée au lever d'une position assise, et lors des premiers pas. Les mouvements actifs et passifs peuvent être douloureux. La première limitation se fait souvent sur la rotation interne, hanche fléchie. Dans les formes évoluées la hanche est fixée en rotation externe, adduction. Parfois, en particulier chez les femmes âgées, l'arthrose de la hanche peut être rapidement progressive avec évolution vers la destruction articulaire en quelques mois (arthropathie destructrice rapide)[13].

L'arthrose de la main est généralement bilatérale, symétrique, touchant les interphalangiennes distales (IPD), proximales (IPP), les trapèzo-métacarpiennes (rhizarthrose), plus rarement les autres articulations.

Les nodules d'Heberden et / ou Bouchard, concernent IPD et IPP. Il s'agit de femmes plutôt que d'hommes, avec une prédisposition familiale. Le début se fait généralement à l'âge mûr, souvent à la ménopause avec douleur, sensibilité et enraidissement d'une ou plusieurs articulations. Chaleur locale et gonflement des tissus mous sont présents au début puis les articulations deviennent moins douloureuses, l'inflammation s'atténue laissant persister les nodules d'Heberden (IPD) et de Bouchard (IPP). Le résultat fonctionnel à long terme n'est pas trop mauvais mais il reste l'aspect esthétique.

L'arthrose érosive des doigts est un cas particulier. C'est une forme agressive, avec douleur, raideur, gonflement des tissus mous, parfois paresthésies, érythème, instabilité latérale, ankylose, parfois déformation en lorgnette, affectant plusieurs IP, et surtout sur les clichés la présence d'érosions sous chondrales, destruction corticale, attrition du cartilage, et évolution vers une ankylose [14].

La rhizarthrose est l'arthrose de l'articulation trapèzo-métacarpienne de la base du pouce. Elle est à l'origine d'un déficit fonctionnel important lié à la fermeture de la première commissure (pouce adductus) [15].

D'autres localisations arthrosiques sont possibles : aux membres supérieurs épaule, coude, poignet, aux membres inférieurs avec la métatarsophalangienne du gros orteil (hallux valgus) mais aussi les arthroses talo-naviculaires, sous taliennes, chevilles (post traumatiques).

L'atteinte de plus d'une articulation est commune. De nombreuses études ont montré que des sujets présentant une atteinte articulaire ont souvent d'autres localisations, indépendamment du seul hasard ou encore de l'âge seul. Il y a dans l'arthrose une forte association entre les atteintes de la main et du genou, en particulier dans la population caucasienne [16]. L'arthrose dite généralisée est une forme polyarticulaire d'arthrose qui selon l'ACR et l'European League Against Rheumatism (EULAR) associe à une arthrose du rachis ou de la main, au moins 2 autres localisations [12, 17].

### **c) Biologie**

Elle aide à exclure certains diagnostics différentiels. Les marqueurs de l'inflammation (protéine C-réactive, vitesse de sédimentation) sont normaux ou peu augmentés. L'examen du liquide synovial n'est pas systématiquement nécessaire. En cas de ponction de liquide articulaire, celui-ci est mécanique (<1500 éléments avec moins 50% de polynucléaires, stérile). L'examen du liquide articulaire a un intérêt en cas de suspicion d'arthropathie cristalline: cristaux de pyrophosphate, d'urate, d'hydroxyapatite de calcium dont la présence au cours des arthroses est une possibilité.

A ce jour, il n'existe pas d'examen biologique spécifique pour le diagnostic d'arthrose [18].

### **d) Imagerie**

Malgré le développement récent de nouvelles techniques d'imagerie les radiographies restent le moyen le plus facilement accessible et le plus souvent pratiqué pour la détection et le suivi des arthroses du genou. Elles permettent de rechercher les modifications osseuses associées à l'arthrose dont les ostéophytes, le pincement et l'ostéosclérose de l'os sous chondral, ainsi que les géodes sous chondrales. La mesure de l'interligne articulaire est un marqueur indirect d'une éventuelle usure du cartilage et de l'intégrité méniscale. La progression du pincement articulaire est le critère le plus communément utilisé pour étudier une évolution structurale chez un sujet arthrosique. Cependant, dire que la mesure de l'interligne articulaire et sa diminution est le reflet exact d'une perte d'épaisseur du cartilage est incorrect et il a été montré récemment que les atteintes méniscales et notamment les extrusions méniscales ou sublaxations méniscales pouvaient contribuer au pincement de l'interligne [19].

Les radiographies peuvent conforter un diagnostic clinique d'arthrose mais le plus souvent la symptomatologie clinique chez un sujet d'âge compatible est suffisante pour l'évoquer. Des radiographies normales n'excluent pas une arthrose authentique, et inversement. Il y a bien souvent une discordance radio-clinique.

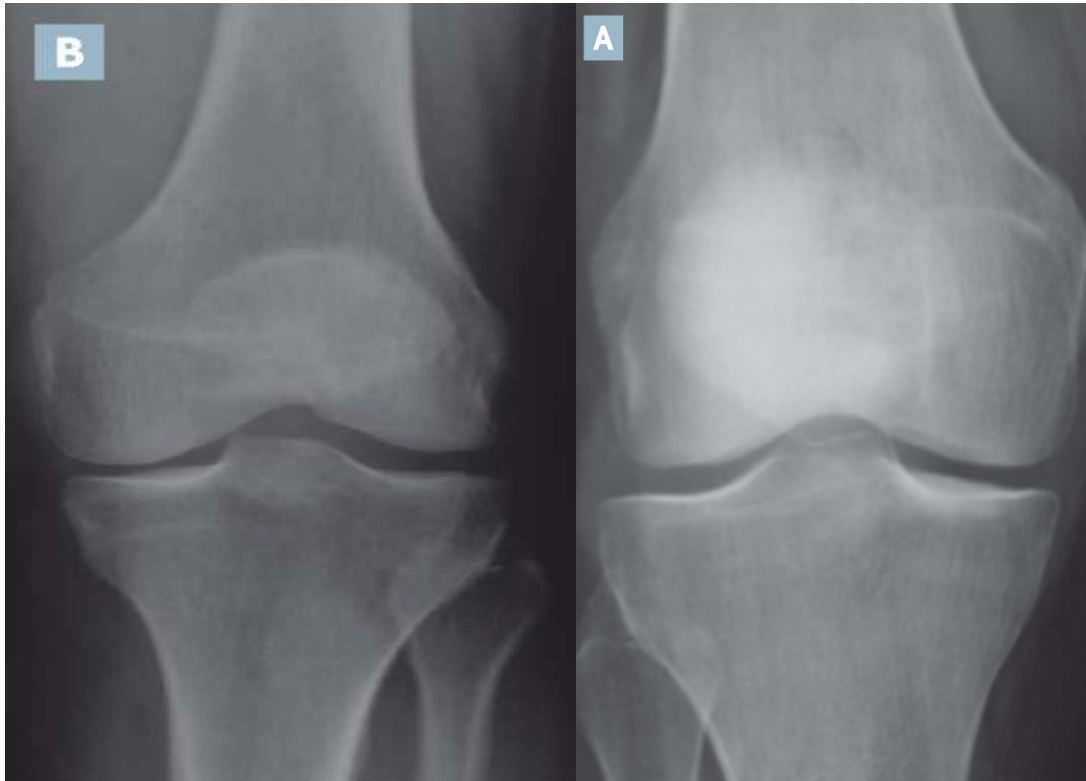
La nécessité d'une standardisation est apparue particulièrement pour certaines articulations, avec des difficultés qui ont conduit à une multiplicité de protocoles. Un exemple est fourni par le genou qui peut être évalué par un cliché antéropostérieur de face en extension, par des clichés en flexion avec de nombreuses variantes, ou par l'association cliché de face et cliché en flexion. L'accord n'est d'ailleurs pas fait quant à l'intérêt d'une association.

L'exploration standard est faite sur un cliché antéropostérieur. Le cliché est pratiqué en charge, plus souvent en appui bipodal que monopodal. Le genou est en extension ce qui permet l'exploration de la partie antérieure de l'interligne fémoro-tibial en dégageant la zone cartilagineuse antérieure tant au niveau fémoral que tibial. Le centrage du rayon est fait sur la rotule. Ce cliché permet l'étude des interlignes et des axes, il permet l'appréciation des pincements articulaires, la visualisation des ostéophytes et des lésions sous-chondrales. Il est peu performant pour la détection précoce des arthroses et pour leur suivi évolutif en particulier du fait de l'absence de standardisation du degré de flexion pouvant exister, des rotations, de l'effet d'agrandissement et du centrage [20-22].

Les radiographies en flexion permettent l'obtention d'images plus fiables avec un meilleur positionnement anatomique et une plus grande sensibilité pour la détection des pincements articulaires, particulièrement pour le compartiment latéral. Plusieurs protocoles, certains avec assistance fluoroscopique, ont été élaborés. Ils comportent une standardisation du degré de flexion, de rotation et de centrage tels les protocoles antéro-postérieur semi-fléchi [23], antéro-postérieur semi-fléchi avec fluoroscopie [24], Lyon Schuss postéro-antérieur avec fluoroscopie [25] et sans fluoroscopie [26], Flexion fixe postéro-antérieur [27], les clichés fixes fixes semi-fléchis (MTP) postéro-antérieur [28], qui pourrait représenter avec le cliché en flexion fixe la technique la plus simple à la fois fiable et reproductible. L'association systématique pour l'exploration d'une arthrose du genou d'un cliché de face et d'un cliché avec degré de flexion constant est habituelle, c'est l'une des 7 recommandations proposées par Vignon et al 1999 [29].

Notre étude, que nous présentons dans la partie résultats est une tentative d'appréciation du bénéfice obtenu par cette association par rapport au cliché en flexion seul (Schuss).

D'autres imageries sont disponibles dont l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui est certes un examen beaucoup plus sensible mais malheureusement bien trop souvent demandé en première intention. Son indication devrait être réservée aux diagnostics difficiles et aux études pour lesquelles elle est devenue un outil clef. D'autant plus que la nature et la signification de l'œdème osseux, que l'on peut retrouver dans certaines arthroses, reste encore à préciser même si son caractère prédictif péjoratif semble probable. L'IRM dans l'arthrose permet d'étudier l'articulation dans sa globalité, les changements pathologiques liés à l'état pré radiologique, les changements physiologiques des tissus articulaires avant que les changements morphologiques deviennent apparents et les changements retrouvés au niveau des différents tissus peuvent tous être étudiés en même temps. L'utilisation de l'échographie en rhumatologie est en pleine expansion, l'échographe devenant le « stéthoscope » du rhumatologue. Elle présente un intérêt, particulièrement pour le bilan des parties molles, pour la recherche d'érosions ou de synovites dans les rhumatismes inflammatoires, mais l'examen de base pour établir le diagnostic et le pronostic d'une arthrose reste la radiographie [30, 31]. Elle est maintenant communément utilisée dans les études portant sur l'arthrose de la main et notamment pour la recherche de synovites. Il a d'ailleurs été montré que les signes d'inflammation étaient plus fréquents chez les sujets présentant une arthrose digitale érosive que chez ceux présentant une arthrose digitale non érosive mais que ces derniers pouvaient aussi présenter une synovite. Ces données venant étayer l'hypothèse d'une maladie systémique [32,33].



Cliché en Schuss

Cliché en extension

Figure 3 : Radiographies de genou de face en Schuss et en extension

## D. Epidémiologie

L'arthrose touche tous les vertébrés. Chez l'homme les premières descriptions remontent au 18<sup>ème</sup> siècle. C'est la plus fréquente des affections rhumatologiques, elle est universellement répandue dans les populations âgées. Ce n'est pas une maladie univoque mais un groupe d'affections, aboutissement de diverses pathologies de l'articulation.

### a) Epidémiologie descriptive

Les articulations les plus touchées par l'arthrose sont le genou, la hanche, la main, le rachis et le pied. Les poignets, épaules et chevilles sont moins souvent atteints. Genoux et hanches sont à l'origine d'incapacités nécessitant parfois la mise en place de prothèses totales : plus de 350 000 par an aux USA[34].

## **i. Prévalence :**

L'arthrose présente la caractéristique de calquer son épidémiologie sur l'espérance de vie. Dans les pays industrialisés, la prévalence de l'arthrose en population générale, quel que soit le site, est estimée entre 8 et 15% et est amenée à augmenter avec le vieillissement de la population [35,36]. La variabilité des données épidémiologiques tient en partie à la discordance radio clinique de la maladie. Les données épidémiologiques varient selon que l'on considère les arthroses cliniques, radio cliniques ou simplement radiologiques, ou encore celles détectées au cours d'autopsies qui sont bien entendu plus fréquentes [37, 38].

## **ii. Prévalence de l'arthrose radiologique**

Les lésions radiologiques conventionnelles prises en considération pour définir l'arthrose sont le pincement articulaire, les ostéophytes, la sclérose sous chondrale, les géodes et les anomalies des contours osseux.

Différents systèmes de gradation radiologique ont été développés. Le plus communément utilisé, dans les études épidémiologiques, bien que critiqué par certains, reste la classification de Kellgren et Lawrence [39]. Cette classification comporte 5 stades radiologiques (0-4) qui sont liés à l'apparition successive d'ostéophytes, de pincement articulaire, de sclérose de l'os sous chondral et de géodes (**tableau 3**).

Les informations disponibles actuellement sur l'épidémiologie de l'arthrose proviennent le plus souvent d'études en population portant sur l'arthrose radiologique [40-44]. Ces différentes études mettent en évidence une augmentation de la prévalence radiologique avec l'âge quelque soit le site articulaire. Dans l'étude hollandaise de van Saase portant sur 6585 sujets, il a été mis en évidence une arthrose des mains chez 75% des femmes âgées de 60 à 70 ans et chez 10 à 20% des sujets de plus de 40 ans.

L'étude NHES (National Health Examination Survey) [42] met en évidence une prévalence de l'arthrose radiologique de la main de 29,5% chez les sujets de plus de

25 ans avec une atteinte moins fréquente des genoux. Les résultats de la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I, 1971-1975) montrent des prévalences pour les 25-74 ans de 32,5%, 2,2% et 3,8%, respectivement pour la main, le pied et le genou[45]. Les prévalences augmentent avec l'âge puisqu'elles passent pour la tranche d'âge 55-74 ans à 70% pour la main, 40% pour le pied, 10% pour le genou et 3% pour la hanche. Dans l'étude de Framingham, portant sur une population de sujets de 63 à 93 ans, les résultats suggèrent qu'un tiers des sujets de cette tranche d'âge ont une arthrose radiologique du genou[43]. Les données des études en population américaine sont comparables aux données européennes. L'arthrose des mains ou des genoux, semble plus fréquente chez les femmes que chez les hommes (sex-ratio entre 1,5 et 4 selon les études).

Stade 0	Radiographie normale	Radiographie normale .
Stade 1	Ostéophyte de signification douteuse	Pincement articulaire, ostéophytose péri-capitale douteuse
Stade 2	Ostéophyte net sans modification de l'interligne articulaire.	Pincement articulaire, ostéophytose, sclérose osseuse modérée.
Stade 3	Ostéophyte net et diminution de l'interligne articulaire.	Pincement articulaire net avec discrète ostéophytose, sclérose osseuse avec kyste, déformation de la tête fémorale et de l'acétabulum minime.
Stade 4	Pincement sévère de l'interligne articulaire	Disparition de l'espace articulaire avec sclérose osseuse et kyste, importante déformation de la tête fémorale et de l'acétabulum avec ostéophytose majeure .
	Gonarthrose	Coxarthrose



Tableau 3 : Stades de Kellgren et Lawrence pour l'arthrose de hanche (coxarthrose) et l'arthrose de genou (gonarthrose).



Figure 4 : Radiographies de gonarthrose fémoro-tibiale et coxarthrose

Flèche jaune : pincement de l'interligne et condensation sous-chondrale

Flèche rouge : ostéophyte

### iii. Prévalence de l'arthrose symptomatique

Il n'existe une bonne corrélation entre arthrose radiologique et clinique que pour les grosses articulations portantes [46,47]. Ailleurs la corrélation anatomo-clinique est mauvaise. Dans l'enquête de Framingham 40% seulement des sujets ayant une arthrose radiologique de grade 3 à 4 sont symptomatiques[43]

Bien que la plupart des travaux se soient intéressés à la prévalence de l'arthrose radiologique, on observe l'émergence croissante d'études s'intéressant à l'arthrose symptomatique, principalement pour le genou qui reste l'articulation la plus facile à appréhender pour ces études. La hanche de par sa position plus profonde reste plus difficile à étudier notamment du fait que les critères de l'American College of Rheumatology (ACR) pour la hanche comportent des données radiographiques. Une arthrose symptomatique affecte plus de 27 millions d'Américains avec la mise en place de 350 000 prothèses de hanche et de genou par an [34].

Il existe deux types d'études portant sur l'arthrose symptomatique (tableau 4): les études sur l'arthrose clinique et celles sur l'arthrose radio-clinique.

Les études portant sur l'arthrose symptomatique clinique ont pour intérêt d'être moins coûteuses et plus faciles à réaliser, mais en revanche, elles comportent des difficultés liées à la possibilité de nombreux diagnostics différentiels, plus nombreux pour la hanche que pour le genou, où les diagnostics différentiels sont en petit nombre après 60 ans. En fait la performance des questionnaires de détection utilisés dans ces études est souvent médiocre notamment en ce qui concerne la spécificité.

Plusieurs études européennes récentes se sont intéressées à l'arthrose symptomatique clinique[48-50]. Mannoni dans une étude portant sur une population italienne, âgée de plus de 65 ans, a mis en évidence une prévalence de 29,8%, 14,9%, et 7,7% respectivement pour le genou, la main et la hanche[48]. Andrianakos, dans une étude portant sur une population grecque de 10647 sujets observe après ajustement sur l'âge et le sexe une prévalence de l'arthrose symptomatique de 6,0% (95% CI 5,6-6,4) pour le genou, 2% (1,8-2,2) pour la main et 0,9% (0,7-1,1) pour la hanche[50]. Ces prévalences de l'arthrose symptomatique sont significativement plus importantes chez la femme que chez l'homme et

augmentent significativement avec l'âge. L'arthrose du genou est significativement plus fréquente en population rurale [50].

Les études radio-cliniques sont moins nombreuses. Nous ne disposons en France d'aucune étude s'intéressant à l'épidémiologie de l'arthrose des membres inférieurs en population générale. Mon travail, présenté dans la partie résultats de ce document, a consisté à obtenir au travers d'une étude pilote portant sur la prévalence de l'arthrose des membres inférieurs dans deux départements français, des données préliminaires de prévalence. Il a aussi permis de valider un outil de détection des sujets présentant une arthrose symptomatique des membres inférieurs. Il s'agissait de la constitution d'une cohorte de cas prévalents d'arthrose des membres inférieurs [51, 52], étape indispensable à la réalisation d'une étude de prévalence nationale.

Etudes	Période	Classe d'âge	Définition arthrose	Prévalence			
				Total	Femmes	Hommes	
<b>Genou</b>							
France	Roux	2005	40-75	Clinique et radiographique	7,6		
	Guillemin	2007-2009	40-75	Clinique et radiographique	-	6,6	4,7
Espagne	Quintana	2002-2003	60-90	Clinique et radiographique	12,2	14,9	8,7
Chine	Zhang	1998-2000	≥60	Clinique et radiographique	-	15,0	5,6
Japon	Muraki	2005	≥60	Clinique et radiographique	26,1	31,8	15,8
Etats-Unis	Framingham	1983-1985	63-70	Symptômes rapportés et radiographique	7,0	7,6	6,2
	Johnston County OA project	1991-1997	≥45	Symptômes rapportés et radiographique	16,4	18,7	13,5
	NAHNES III	1991-1994	≥60	Symptômes rapportés et radiographique	12,1	13,6	10,0
Italie	Salafi	2004	≥18	Critères ACR cliniques	5,4	-	-
	Mannoni	2003	≥65	Critères ACR cliniques	29,8	-	-
Grèce	Andrianakos	1996-1999	≥19	Critères ACR cliniques	6,0	8,6	3,2
Norvège	Grotle	2004	24-76	Diagnostic rapporté	7,1	7,9	6,2
Hollande	Picavet	1998	≥25	Diagnostic rapporté	-	13,6	10,1

Hanche							
France	Roux	2005	40-75	Clinique et radiographique	5		
	Guillemin	2007-2009	40-75	Clinique et radiographique		2,5	1,9
Espagne	Quintana	2002-2003	60-90	Clinique et radiographique	7,4	8,0	6,7
Chine	Nevitt	1998-2000	≥60	Clinique et radiographique		0,1	00
Etats-Unis	Johnston County project OA	1991-1997	≥45	Symptômes rapportés et radiographique	9,7	11,1	8,3
Italie	Salaffi	2004	≥18	Critères ACR cliniques	1,6		
	Mannoni	2003	≥65	Critères ACR cliniques	7,7		
Grèce	Andrianakos	1996-1999	≥19	Critères ACR cliniques	0,9	1,5	0,3
Norvège	Grotle	2004	24-76	Diagnostic rapporté	5,5	6,2	4,6
Hollande	Picavet	1998	≥25	Diagnostic rapporté		9,6	39

Tableau 4: Prévalence de l'arthrose des membres inférieurs

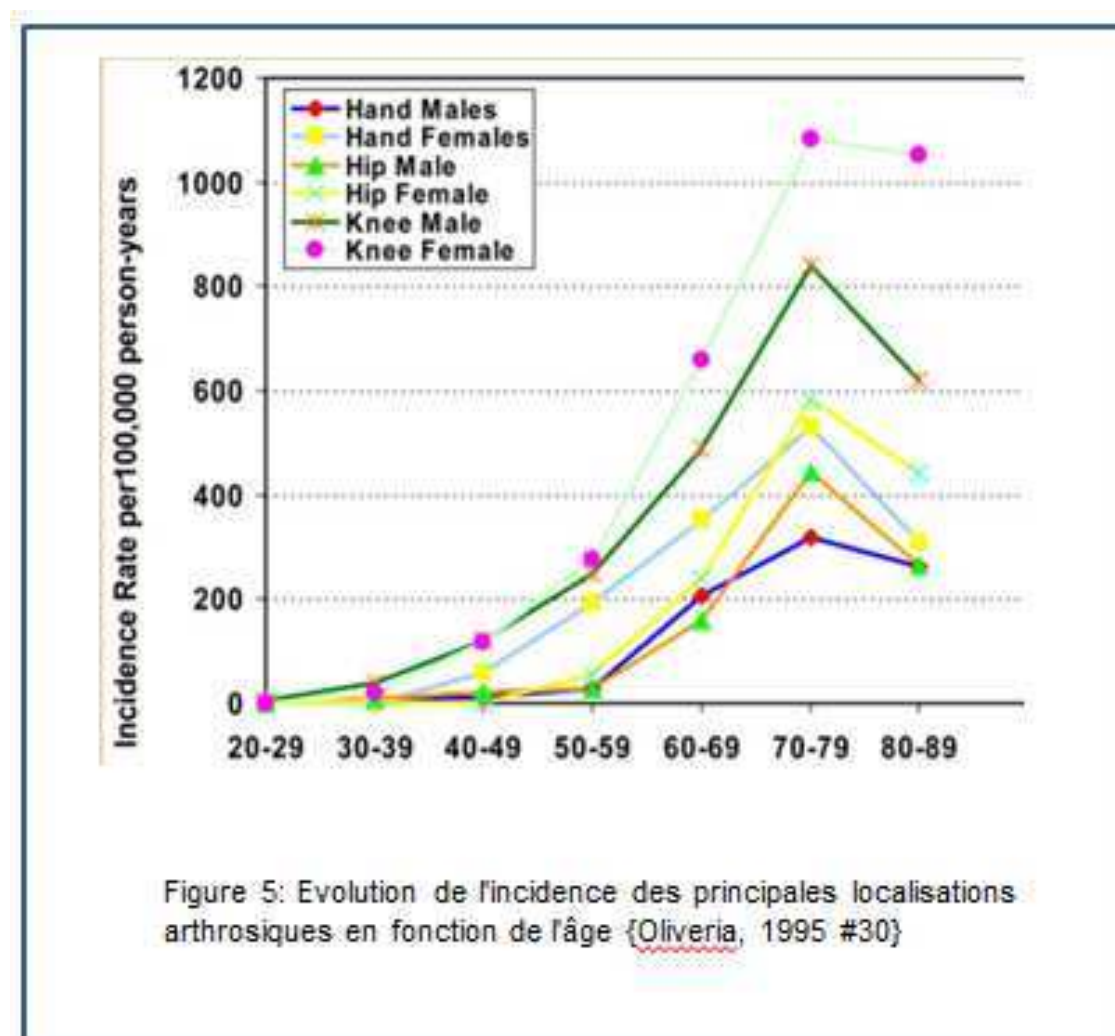
#### iv. Incidence

Dans l'étude de Rochester, portant sur la population générale, le taux d'incidence (ajusté sur l'âge et le sexe) est estimé pour la hanche et le genou à 47,3 pour 100 000 personnes-années et 163,8 pour 100 000 personnes-années respectivement[53]. Les données les plus récentes relatives à l'incidence de l'arthrose symptomatique des mains, hanches et genoux ont été obtenues à partir du « plan de santé de la communauté de Fallon », une organisation de soins de santé localisée dans le Nord-Est des USA[54]. Dans cette étude, l'incidence standardisée sur l'âge et le sexe est estimée à 100 pour 100 000 personnes années pour la main, 88 pour 100 000 personnes-années pour la hanche et à 240 pour 100 000 personnes années pour le genou.

L'incidence de l'arthrose des mains, hanches et genoux augmente avec l'âge, et les femmes semblent présenter des taux d'incidence plus élevés que les hommes, surtout après 50 ans. Avec une augmentation plus importante (femmes et hommes) après 80 ans, quel que soit le site articulaire. La figure 5 reprend les courbes d'incidences en fonction de l'âge pour chaque articulation [54].

Dans la tranche d'âge des 70-80 ans, l'incidence de l'arthrose symptomatique du genou chez la femme avoisine 1% par an. Le risque de gonarthrose symptomatique au cours de la vie entière est estimée à 4,7% [54].

Il est intéressant de noter que selon les données relatives aux arthroplasties dans le nord des USA le taux de solution chirurgicale est le même que le taux d'incidence des arthroses sévères de hanche, mais qu'un fossé considérable existe entre le traitement chirurgical et l'incidence de l'arthrose du genou[34].



## b) Facteurs de risques :

Les études épidémiologiques menées sur l'arthrose ont permis de déterminer de nombreux facteurs de risque, qui diffèrent selon les articulations, et interviennent dans le développement de l'arthrose du genou, de la hanche et de la main notamment. Plusieurs facteurs sont souvent associés chez un même individu et la part de responsabilité de chaque facteur est parfois difficile voire impossible à déterminer. Le développement d'une arthrose peut être favorisé à la fois par des facteurs biomécaniques locaux et par des facteurs systémiques conférant une susceptibilité générale à la maladie.

**i. Âge et sexe :**

L'âge semble être le facteur de risque le plus important pour l'arthrose. Toutes les études portant sur la prévalence et l'incidence de l'arthrose qu'elle soit définie de façon radiologique ou symptomatique, mettent en évidence une augmentation nette de celle-ci avec l'âge. Dans l'étude NAHNES I, la prévalence de l'arthrose est inférieure à 0,1% chez les sujets de 25 à 34 ans et atteint 10 à 20% chez les sujets âgés de 65 à 74 ans[55].

Cette augmentation de prévalence concerne toutes les articulations, mais reste plus importante pour les articulations préférentiellement touchées par l'arthrose, telles que le genou, la hanche et la main[55]. La relation entre âge et risque de développement d'une arthrose est très probablement affectée par des facteurs de risques généraux et locaux, eux aussi âge dépendants (excès de charge sur une articulation lié à l'obésité, anomalies musculaires ou neurologiques, instabilité articulaire d'origine ligamentaire par exemple). Chez les femmes, le risque de développer une arthrose est accru avec l'âge, notamment pour les articulations des mains et des genoux mais aussi lors des atteintes multiples (aussi appelées « arthrose généralisée »). Ainsi, après 50 ans, la prévalence et l'incidence de la maladie dans ces localisations sont plus élevées chez la femme que chez l'homme [54]. La sévérité chez la femme semble plus grande [46], ce qui pourrait être expliqué par une moindre épaisseur du cartilage au niveau du genou chez la femme [56].

Cependant, la fréquence de l'atteinte de la hanche augmenterait de façon similaire avec l'âge chez la femme et chez l'homme avec cependant une aggravation plus

rapide chez la femme [57,58]. Dans d'autres études le sexe ne paraît pas avoir d'influence sur la progression de l'arthrose du genou et de la main [59].

Le cartilage du sujet âgé comporte une accumulation d' « **Advanced Glycation End Products** » (**AGE**) qui semblent modifier la structure du cartilage et interfèrent avec certains enzymes[60]. Le chondrocyte exprime des récepteurs pour les **AGE** susceptibles d'activer des enzymes de dégradation du cartilage [61]. Le cartilage vieillissant est fragilisé ce qui ferait le lit de l'arthrose et fait dire à certains qu'il s'agit de la « maladie d'Alzheimer du chondrocyte»[62].

Une inflammation de bas grade se retrouve dans l'arthrose. Or l'on sait que l'inflammation réduit l'élimination des protéines oxydées avec pour corollaire l'augmentation de la concentration cellulaire en dérivés réactifs de l'oxygène. Ceux-ci contribuent au stress oxydatif qui est un facteur de sénescence cellulaire, en particulier des chondrocytes. Cette sénescence est essentiellement une sénescence de sécrétion (phénotype de sénescence sécrétoire associée) et concerne plusieurs médiateurs inflammatoires et pro-dégradatifs. La production de Métallo Protéases Matricielles (MMP-13) par le chondrocyte après stimulation par l'IL-1 $\beta$  augmente avec l'âge, de même que la production d'IL-1- $\beta$  par le lymphocyte non stimulé ce qui suggère que le chondrocyte vieillissant acquiert ce phénotype[63]. Cela pourrait être l'une des explications des lésions cartilagineuses

## ii. Facteurs hormonaux :

La fréquence de l'arthrose chez la femme semble s'accroître dès 50 ans, c'est-à-dire dès la ménopause. C'est d'ailleurs à cette période de la vie que certaines femmes vont développer des arthroses de la main sévères, d'évolution rapide [64]. Cette relation suggère que le déficit oestrogénique post ménopausique augmente les risques d'arthrose; elle est confortée par la présence d'un récepteur oestrogénique dans le noyau des chondrocytes, des ostéoblastes sous-chondraux et des synoviocytes [65]. Certaines études épidémiologiques sont venues étayer cette thèse, d'autres études sont cependant plus réservées [66,67]. Des études transversales montrent que les femmes ayant un traitement hormonal substitutif ont un risque plus faible de développer une arthrose du genou ou de la hanche [68 , 69 ,

70]. La réduction du risque de développer une arthrose chez ces femmes ayant un traitement oestrogénique a été estimée à 40%. Le rôle protecteur des traitements oestrogéniques apparaît surtout lorsque l'arthrose est définie radiologiquement, il est moins net lorsqu'on utilise une définition symptomatique ou clinique [71,72], ce qui peut suggérer la possibilité d'un effet différent structural/symptomatique des œstrogènes. Cependant les seuls résultats provenant d'une étude randomisée contrôlée versus placebo ne mettent pas en évidence de différence pour le genou entre les femmes recevant des œstro-progestatifs versus celles recevant le placebo [73].

L'effet des œstrogènes pourrait impliquer plusieurs mécanismes: diminution de la résorption sous chondrale (une des modifications précoces de l'arthrose), effet direct sur le cartilage par augmentation de facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF-1), augmentation de la synthèse de protéoglycanes par les chondrocytes, prévention de l'induction de la Nitric Oxyde Synthase Inductible (iNOS), réduction de l'inflammation avec inhibition de l'expression et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1[74,75].

### **iii. Facteurs génétiques**

Dès 1941, une composante génétique est suspectée par Stecher qui constate une fréquence 3 fois plus élevée des nodosités d'Heberden chez les sœurs de sujets avec nodosités d'Heberden et deux fois plus élevée chez les mères par rapport à la population générale[76]. Le mécanisme en cause semble être lié à une transmission autosomique dominante chez la femme et autosomique récessive chez l'homme. La prévalence des nodules d'Heberden est 10 fois plus fréquente chez la femme. Il a été suggéré que de multiples gènes sont impliqués dans la susceptibilité à l'arthrose et que des facteurs environnementaux ont une importante influence sur l'expression de la maladie. La recherche de gènes candidats pour la susceptibilité à l'arthrose s'est centrée sur les gènes codant pour le procollagène de type II (forme majeure de collagène dans l'articulation), pour des protéines de structure de la matrice, sur les gènes des récepteurs de la vitamine D (VDR) et des oestrogènes ainsi que sur l'os et les facteurs de croissance du cartilage [77,78]. Bien que les résultats des études de gènes candidats soient hétérogènes, le rôle de gènes codant pour le procollagène



de type II (COL2A1), le polymorphisme Taq I du VDR et le polymorphisme du récepteur alpha des œstrogènes a été mis en avant [78-82].

L'étude de Spector portant sur 130 jumelles monozygotes et 120 jumelles dizygotes âgées de 44-77 ans a montré pour la première fois le rôle de la génétique dans l'arthrose de la main et du genou chez la femme, avec une influence génétique allant de 39 à 65% indépendamment des facteurs de confusion environnementaux connus [83].

Il est intéressant de noter dans cette étude, que le lien est plus fort pour le genou que pour la main.

#### **iv. Facteurs Ethniques**

Le profil clinique de l'arthrose varie suivant l'origine ethnique. Dès les années 60, le « National Center for Health Statistics » s'est intéressé à ce facteur de risque mettant en évidence des différences entre les populations caucasiennes, africaines, indiennes et orientales [84]. Les afro-américains sont plus fréquemment concernés, avec deux pics de fréquence à l'âge de 50 ans et à 70 ans, quel que soit le sexe. Alors que les Américains d'origine caucasienne sont en revanche davantage touchés par une arthrose sévère, surtout après 60 ans. Dans la population caucasienne, la prévalence de l'arthrose de hanche est nettement supérieure à celle retrouvée chez des populations asiatiques, africaines et indiennes de l'est [85]. Chez le noir africain, les nodosités d'Heberden ont une fréquence élevée, alors que les formes polyarticulaires digitales sont rares [86].

L'importance de ces variations ethniques doit cependant être modérée du fait de multiples facteurs liés à l'accès aux soins, et aux activités physiques et professionnelles notamment.

#### **v. Anomalies architecturales des articulations (macroarchitecture)**

Les anomalies architecturales, qu'elles soient congénitales ou acquises, peuvent entraîner une arthrose secondaire par une mauvaise répartition des contraintes mécaniques. Ces anomalies sont, entre autres, pour la hanche les dysplasies acétabulaires. Une étude prospective a montré une association entre dysplasie acétabulaire, définie comme une insuffisance de couverture ou défaut de

profondeur acétabulaire, et l'augmentation d'incidence de l'arthrose de hanche radiographique. Le risque relatif ajusté sur l'âge et le poids étant de 2,8 [1,0-7,9] [87]. On retrouve aussi comme facteurs de risque d'arthrose de hanche la protrusion acétabulaire, la subluxation, la coxo plana, la coxa retrorsa, et pour le genou les défauts d'alignement: genu valgum, genu varum...Le compartiment interne du genou supporte 60 à 70% de la charge c'est lui qui est préférentiellement touché[88]. Les sujets avec genu varum ont 3 à 4 fois plus de risques d'arthrose du compartiment interne, tandis que pour un genu valgum le développement d'une arthrose porte de manière égale sur les 2 compartiments[89].

La morphologie osseuse semble aussi jouer un rôle important notamment au fémur[90]. Au genou il y a des différences notables entre Afro-Américains et sujets de race blanche qui pourraient intervenir aussi [91].

## **vi. Traumatismes**

Les traumatismes articulaires sont eux aussi pourvoyeurs de lésions arthrosiques (fractures avec cals vicieux, luxations, lésions tendineuses, hyper laxités...) [92-97]. Les suites chirurgicales peuvent elles aussi être considérées comme une forme de traumatisme. Concernant le genou par exemple, la survenue de lésions méniscales et/ou ligamentaires (Ligament Croisé Antérieur= LCA) chez les footballeurs ou l'existence d'une instabilité chronique constituent des facteurs de gonarthrose[98]. A défaut de traitement, l'évolution spontanée se fait vers une arthrose ultérieure. Mais une ménisectomie chirurgicale constitue également un facteur de risque certain. Si le traumatisme a été à l'origine de modifications anatomiques c'est un risque supplémentaire[97]. L'existence d'arthroses à d'autres niveaux est aussi un facteur péjoratif, de même que la poursuite de l'activité à l'origine des lésions[97,99].

## **vii. Surpoids**

L'obésité est un facteur de risque majeur d'arthrose du genou et parmi les mieux établis[100]. Une étude américaine a montré que les patients dont l'indice de masse corporelle (IMC) est supérieur ou égal à 30kg/m<sup>2</sup> ont une prévalence d'arthrose de genou radiologique quatre fois plus importante que des patients dont

l'IMC est inférieur à 30[101,102]. Dans la cohorte de Framingham, il semble que le risque de développer une arthrose du genou est directement corrélé à l'IMC moyen entre 36 et 40 ans[103]. La surcharge pondérale précède l'arthrose du genou de plusieurs années, elle aggrave aussi une arthrose préexistante[92,104,105,106,107]. Cette association surpoids-gonarthrose paraît plus importante chez les femmes que chez les hommes. La perte de poids réduit le risque[108], et le lien est à ce point important que l'American College of Rheumatology et l'EULAR recommandent une perte de poids dans le traitement médical de la gonarthrose[109,110]. La perte d'environ 5kg dans les 10 ans précédents diminue chez les femmes le risque de gonarthrose de 50% et la perte de 1 Kg de poids corporel réduit d'un facteur supérieur à 2 la charge compressive maximale au genou [111].

Si le rôle du surpoids est clairement établi pour la gonarthrose, il apparaît moins marqué dans la coxarthrose [112,113,114]. Cependant, il est retrouvé une association nette entre accroissement de l'index de masse corporelle et risque d'une prothèse de hanche ultérieure chez les hommes et femmes jeunes, qui semble moindre chez les plus âgés [115].

Le stress mécanique lié à la surcharge pondérale entraîne un dysfonctionnement des chondrocytes avec libération de médiateurs dégradant le cartilage, tels la prostaglandine E2, les métalloprotéases responsables de la digestion de la matrice cartilagineuse (MMPs). Le passage d'un stimulus physique (le stress mécanique) à un effet biologique implique l'activation de mécanorécepteurs tels que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ou le récepteur à l'acide hyaluronique (CD44) qui sont situés à la surface membranaire des chondrocytes. En aval de ces mécanorécepteurs, une cascade moléculaire intracellulaire est mise en jeu, aboutissant à la libération de médiateurs pro-inflammatoires.

Les ostéoblastes sous-chondraux comprimés possèdent également des mécanorécepteurs réagissant de manière comparable en libérant des médiateurs solubles nocifs pour l'os lui-même et pour le cartilage sus-jacent[116].

D'autres facteurs semblent aussi intervenir, en particulier métaboliques, telles les anomalies lipidiques et glucidiques [117]. Hyperglycémie et élévation de la CRP sont présentes dans l'obésité, et sont aussi associées au risque de gonarthrose et à son évolution chez la femme [118,119]. Le risque de gonarthrose augmente avec le

nombre de facteurs du syndrome métabolique: 2 facteurs pour un Odds Ratio (OR)=2,3, 3 facteurs et plus pour un OR=9,8, avec un risque maximum pour l'association obésité-hypertension[120]. L'insulinorésistance est plus marquée chez les hommes avec arthrose du genou [121]. Parmi les différents types d'obésité, c'est l'obésité avec sarcopénie qui a la plus forte association avec l'arthrose du genou [122].

La charge pondérale n'explique pas chez les obèses l'augmentation de la fréquence de l'arthrose digitale mise en évidence ces dernières années qui relève nécessairement de facteurs systémiques [123]. Le tissu adipeux blanc est responsable de la production de nombreux médiateurs inflammatoires dont l'IL6, l'IL1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . S'ajoutent à ces médiateurs les adipokines qui sont impliquées dans un large éventail d'activités, notamment dans le métabolisme des lipides et dans la modulation de l'inflammation [124, 125]. La plus explorée de ces adipokines est la leptine. Elle semble avoir un rôle dans la physiopathologie de l'arthrose entre autre par l'induction des métalloprotéases matricielles (MMPs) (MMP-9 et MMP-13) [126]. Elle peut aussi agir en synergie avec l'IL-1 $\beta$  en induisant la production de MMP-1 et MMP-3. Elle est responsable de l'augmentation de médiateurs cataboliques et de la diminution de la production des médiateurs anaboliques. L'induction par la leptine de la production des IL-1 $\beta$ , MMP-9 et MMP-13 au niveau des chondrocytes indique son rôle pro-inflammatoire et catabolique sur le métabolisme du cartilage[127]. Le niveau d'expression de la leptine et de son récepteur semble corrélé au degré d'atteinte du cartilage: il existe une corrélation entre la concentration de leptine dans le liquide synovial et la sévérité radiologique de l'arthrose[128].

Bien entendu, la leptine n'est pas la seule adipokine impliquée dans l'arthrose, d'autres ont été incriminées (adiponectines, visfatine...) et d'autres restent à découvrir. Ces adipokines semblent pouvoir expliquer au moins en partie le développement systémique de l'arthrose.

#### **viii. Force et faiblesse musculaires, laxité articulaire**

Des contractions musculaires importantes et surtout répétées peuvent être à l'origine d'arthroses, en particulier à la main dans certaines professions (IPP, IPD,

MCP) [129]. Cependant, une bonne tonicité musculaire peut aussi avoir un effet protecteur sur une articulation, et au genou une faiblesse du quadriceps semble augmenter le risque d'arthrose [130]. Les extenseurs de cuisse chez l'arthrosique souffrant d'un seul genou ont une surface de section réduite de 5,2% pour le côté douloureux par rapport au côté non douloureux [131]. La constatation d'une réduction du WOMAC à 2 ans et de la nécessité d'une prothèse à 4 ans lorsque la section du quadriceps augmente va dans le même sens [132].

Il est possible qu'une bonne musculature retarde l'évolution d'une arthrose, mais l'effet peut aussi être inverse [133].

L'hypermobilité articulaire généralisée est habituellement considérée comme un facteur d'arthrose [134] et au genou il est constaté une moins grande laxité des genoux normaux par rapport à ceux controlatéraux des sujets gonarthrosiques [134]. Cependant à la main l'hypermobilité pourrait avoir un effet protecteur [135].

## **ix. Activité sportive**

Le retentissement d'une activité sportive sur le développement d'une arthrose reste sujet à débat. Le facteur prédisposant serait l'hyper utilisation articulaire. Une étude réalisée par Gelber et collègues a été réalisée auprès de 1321 étudiants afin d'étudier l'impact du sport sur l'arthrose [95]. Ces étudiants, sportifs depuis longtemps, ont été appariés à des sujets contrôles ne pratiquant pas de sport, en fonction de l'âge, du poids, de l'état général, des articulations impliquées, de leur laxité, de l'utilisation excessive de celles-ci, et d'une lésion traumatique éventuelle. Les résultats montrent un risque accru de gonarthrose et de coxarthrose pour les footballeurs, ainsi que pour les joggers (arthrose fémoro-patellaire). Cependant, un sport pratiqué de façon légère à modérée n'augmente pas le risque d'arthrose de hanche, du genou ou du rachis et si toute utilisation articulaire excessive est nocive pour le cartilage, la pratique d'une activité physique régulière semble être bénéfique. Il n'y a pas d'augmentation du risque d'arthrose du genou chez les coureurs dont la pratique est modérée [136]. Pour les coureurs de haut niveau en revanche, même si la littérature est inconclusive [137], certaines études indiquent que des risques existent du fait des sollicitations très importantes ainsi que des contacts

répétés[136,138-141]. Chez les patients souffrant d'arthrose, le sport peut être poursuivi à un rythme régulier, mais il doit rester indolore.

#### **x. Professions**

De même, certaines catégories professionnelles peuvent être exposées à l'arthrose par hyper utilisation articulaire. Les contraintes répétées, le soulèvement de charges, augmentent de façon nette le risque d'arthrose, que ce soit pour la hanche ou pour le genou. Pour ces raisons, les agriculteurs par exemple sont des sujets à risque accru d'arthrose [142], les carreleurs, ainsi que tous les métiers nécessitant d'être accroupi sont préférentiellement atteints de gonarthrose [143]. Une activité avec répétition du mouvement de pince peut être à l'origine d'arthroses des interphalagiennes distales [144,145]. La liste des activités professionnelles concernées est longue...

#### **xi. Tabac**

L'influence du tabagisme reste controversée. De nombreuses études ont suggéré un effet protecteur pour le développement de l'arthrose du genou [70,146, 147]. Dans d'autres publications, le tabagisme est plus commun chez les femmes présentant une arthrose symptomatique du genou que chez les femmes présentant une arthrose radiologique non symptomatique [148], et un travail récent montre chez le fumeur de sexe masculin une perte accrue de cartilage et un caractère plus sévère des douleurs [149].

En fait, il n'y a actuellement que peu d'argument dans la littérature permettant d'envisager un effet protecteur du tabagisme. En revanche, il semble exister des arguments confirmant un rôle péjoratif de ce dernier sur le cartilage et l'os, se traduisant par un effet sur la progression de l'arthrose [149].

Trois méta-analyses récentes ne confirment pas le lien entre tabagisme et incidence de l'arthrose d'une part et un éventuel rôle protecteur du tabagisme sur l'évolution de la pathologie arthrosique d'autre part [150,151].

## **xii. Nutrition**

Les données de l'étude de Framingham ne montrent pas d'association évidente entre la prise de vitamine C, de vitamine D ou encore de vitamine E avec l'incidence de l'arthrose radiographique du genou. Mais, un déficit en vitamine C serait associé à la progression de l'arthrose du genou [152]. D'autres travaux suggèrent que les hommes et les femmes présentant un taux bas de 25 (OH) vitamine D sont à plus grand risque pour la progression (et non l'apparition) de l'arthrose du genou que les sujets ayant des taux élevés de vitamine D [153]. Mais un effet de la vitamine D sur l'arthrose symptomatique n'a pas été démontré à ce jour. Des essais de vitamines à propriétés anti oxydantes E et C n'ont pas conduit non plus à des résultats probants. Un déficit en vitamine K a été retrouvé associé à des arthroses du genou et de la main [144-146]. Un déficit en Sélénium a été observé dans la maladie de Kashin-Beck, et aussi dans des arthroses de la hanche et du genou [157, 158].

## **xiii. Chondrocalcinose**

Une arthrose associée à des microcristaux de pyrophosphate de calcium touche préférentiellement les genoux, poignets, MCP 2 et 3 et les épaules [13] et principalement chez des patients âgés de plus de 60 ans. La présence de microcristaux a un effet pro-inflammatoire [159], et la symptomatologie a des particularités : dérouillage matinal plus long, fréquence plus grande des synovites et épanchements parfois hémorragiques [160]. Dans certains cas l'évolution est rapidement destructrice.

Peu d'études en population ont démontré une association significative entre chondrocalcinose radiographique du genou et arthrose du genou [160]. Les résultats de l'étude NAHNES pour la tranche d'âge des 55-74 ans mettent en évidence que la chondrocalcinose de genou est associée à l'arthrose de cette même articulation avec un OR de 2,7. Dans l'étude de Framingham, l'Odds Ratio ajusté sur l'âge est de 1,5 pour les deux sexes. En ce qui concerne la Densité Minérale Osseuse (DMO) des résultats divergents ont été observés dans des arthroses avec chondrocalcinose: DMO élevée [44] ou DMO normale [161].

#### **xiv. Densité minérale osseuse**

Une relation inverse entre arthrose et ostéoporose est argumentée depuis de nombreuses années [163].

Une augmentation de la DMO semble être associée avec une augmentation du risque d'arthrose de hanche, à la présence d'ostéophytes et de façon moindre à la détérioration cartilagineuse [44, 82,164].L'augmentation de la DMO de l'ordre de 3 à 6% devrait correspondre à un risque réduit de fracture [165-167].Cependant, la relation arthrose-risque de fracture n'est pas claire, même si quelques études vont cependant bien dans le sens d'une réduction du risque fracturaire chez l'arthrosique [168,169]. Une explication pourrait tenir au mode d'évaluation (DEXA) de la DMO en 2 dimensions, la taille des os plutôt que la densité pouvant expliquer une apparente augmentation de la DMO [162].

Chez l'ostéoporotique arthrosique, on ne retrouve pas le plus souvent de réduction du risque fracturaire [170,171].

Les patients avec fracture prévalente ont un risque réduit d'arthrose du genou indépendamment de la DMO, et chez les femmes avec une arthrose du genou définie par la présence d'ostéophytes, la DMO est plus élevée [169].

Il a été supposé qu'un os plus mou permettrait une meilleure diffusion des contraintes avec une meilleure répartition du poids supporté, moins délétère pour l'ensemble du cartilage. De fait, certains ont constaté que la DMO des femmes avec arthrose du genou ou de hanche est plus élevée à la fois à proximité des articulations arthrosiques et à distance [44,93,172,173].

Au niveau de l'os sous-chondral dans une petite étude avec contrôle tomодensitométrique, la DMO 3D de l'os sous-chondral a été retrouvée augmentée au niveau des genoux arthrosiques [174]. Des études IRM vont dans le même sens [175], de même que la constatation d'une augmentation d'épaisseur du tibia proximal au début du développement d'une arthrose [176].

#### **xv. Autres facteurs**

L'élévation de l'acide urique sérique est associée à l'arthrose généralisée non nodulaire dans l'étude de Acheson et collègues [177].Cependant cette association



n'est pas retrouvée notamment pour l'arthrose du genou dans les études de Framingham, NHANES I et Chingford. Hart et collègues dans une étude portant sur la population de l'étude de Chingford notent une association entre des taux élevés de glucose dans le sang et l'arthrose du genou, ceci indépendamment du poids [178]. Cependant, Frey et collègues, dans une étude ultérieure, ne retrouvent pas d'association significative entre intolérance au glucose, diabète non insulino-dépendant et présence d'une arthrose clinique [179].

Différentes maladies de surcharge peuvent être à l'origine d'arthroses secondaires, souvent avec des aspects exubérants (goutte, hémochromatose, maladie de Wilson, acromégalie, hyperparathyroïdie). Les arthroses secondaires à des pathologies inflammatoires ne sont pas rares à un stade avancé de la maladie inflammatoire, et de même une infection articulaire mal traitée ou tardivement traitée fait le lit d'une arthrose.

## E. Traitement (tableau 5)

La prise en charge médicale peut apparaître complexe en raison des particularités symptomatiques du processus arthrosique, variable d'un sujet à l'autre, d'une articulation à l'autre, d'une période à l'autre.

Les moyens sont divers, médicamenteux et non médicamenteux, locaux et généraux.

Le traitement chirurgical n'est utilisé que dans 10 % des cas, surtout dans certaines localisations, il ne doit pas être considéré comme l'aboutissement des échecs du traitement médical. Il ne vit pas des contre-indications du traitement médical.

Le traitement de l'arthrose est le plus souvent de longue durée, il accompagne l'évolution de l'arthrose et de sa symptomatologie, il doit être avant tout bien toléré et adapté au patient, à l'évolution symptomatique, à la topographie et aux caractéristiques propres du processus arthrosique. Il reste essentiellement symptomatique avec plusieurs objectifs :

- calmer la douleur,
- diminuer la gêne fonctionnelle,

- améliorer la qualité de vie,
- si possible, ralentir ou stabiliser l'évolution de l'arthrose,
- essayer de passer d'une stratégie de résignation à une stratégie d'incitation.

L'essentiel de ce traitement étant :

- une prise en charge multidisciplinaire, le médecin généraliste et le rhumatologue occupent une place importante
- selon l'évolution, plusieurs spécialistes peuvent intervenir: rééducateur, chirurgien, diététicien, psychologue...

La prise en compte dans ce traitement de plusieurs facteurs est nécessaire :

- facteurs généraux: obésité, activité professionnelle ou sportive, sexe, contexte psychologique
- facteurs locaux: dysplasie, dysmorphie, dysfonction articulaire.

Les différents moyens thérapeutiques médicaux et non médicaux, locaux ou généraux doivent être adaptés aux patients.

Les recommandations de l'EULAR représentent une mise au point récente pour la hanche et le genou [110].

### **a) Moyens non pharmacologiques**

L'information et l'éducation des patients arthrosiques est capitale. Les recommandations européennes insistent sur la nécessité d'une information des patients arthrosiques, il s'agit d'une obligation professionnelle pour le praticien. Il existe de nombreuses sources d'information (médecins, pharmaciens, paramédicaux, etc.) ainsi que des programmes éducatifs (réunion, CD Rom, vidéo, internet). Ces outils ne sont valables que dans la mesure où ils diminuent la consommation de soins, réduisent les arrêts de travail et améliorent la qualité de vie des patients [180].

#### **i. Diététique**

L'obésité est un facteur défavorable en particulier pour l'arthrose des genoux. Les rapports entre obésité et arthrose sont complexes. Au stress mécanique de

surcharge pondérale, s'ajoute l'action d'adipokines sur le tissu cartilagineux. Cela pourrait expliquer la plus grande fréquence de l'obésité dans l'arthrose digitale[181]. La perte de poids améliore les symptômes de l'arthrose, perdre 10 % de surpoids, améliore la fonction de 28 %. En perdant 5 Kg, 24 % des interventions chirurgicales sur le genou pourraient être évitées. Le plus difficile est peut-être non de perdre du poids mais surtout de maintenir cette perte de poids dans la durée.

## **ii. Exercices – rééducation**

L'entretien musculaire favorise la mobilité et la stabilité articulaire, il doit être associé à des exercices d'étirement et de posture. Il faut adapter cette activité physique en intensité, rythme et amplitude aux possibilités articulaires. Le muscle doit travailler en charge et en décharge, sans ou avec pesanteur, avec ou sans déplacement articulaire. Plusieurs études ont montré les effets thérapeutiques du renforcement musculaire sur la douleur et la fonction dans la gonarthrose [182].

## **iii. Mesures d'économie articulaire**

L'hygiène de vie, c'est l'adaptation du travail articulaire à ses propres capacités, en prévenant tout effet secondaire. L'arthrosique doit avant tout éviter le surmenage articulaire et apprendre à connaître ses propres capacités et ses limites. Les aides techniques sont importantes: orthèse nocturne, appareil de contention, semelles orthopédiques et surtout canne de marche. Elle doit toujours être utilisée du côté sain[183].

## **iv. Acupuncture**

Plusieurs essais thérapeutiques semblent concluants. Les conclusions d'une étude récente semblent démontrer une certaine efficacité sur la douleur et la fonction, sans effets secondaires[184,185].

## **b) Moyens pharmacologiques**

Toute prescription médicamenteuse chez un patient arthrosique doit tenir compte de son âge. Ce sont parfois des sujets porteurs de plusieurs pathologies et polymédicamentés.

L'incidence de ces risques, dans certaines prescriptions, n'est pas négligeable surtout dans un traitement au long cours, ils doivent être pris en compte dans le choix thérapeutique.

Les trois options essentielles chez l'arthrosique âgé étant de privilégier un traitement non pharmacologique, associé ou non à un traitement pharmacologique, d'utiliser un traitement local si c'est possible, et de prendre en compte le rapport bénéfice/risque dans le choix thérapeutique en particulier dans l'utilisation de certains antalgiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens.

#### **i) Traitements pharmacologiques locaux**

[186, 187, 188, 189]

##### **1. Topiques**

Plusieurs méta-analyses récentes ont validé leur efficacité, en particulier dans les arthroses superficielles (mains et genoux). Leur action est supérieure au placebo. Les principales études ont porté sur la capsaïcine et les AINS. La pénétration cutanée est prouvée, elle assure une concentration tissulaire utile avec un taux sérique cent fois moins important. Qu'il s'agisse de crème, de gel ou de patch, les topiques en particulier les AINS sont indiqués pour les articulations superficielles ou pour des manifestations péri-articulaires tendino-musculaires associées.

##### **2. Corticoïdes intra-articulaires**

L'injection peut soulager une poussée douloureuse d'arthrose hydarthrodiale. La technique doit être précise, intra-articulaire avec une imagerie de complément pour certaines articulations profondes (fréquence élevée d'infiltrations périarticulaires). Il ne semble pas exister de variation d'efficacité entre les différents corticoïdes injectables utilisés.

### **3. Acide hyaluronique**

Les résultats de l'injection intra-articulaire d'acide hyaluronique ont fait l'objet de nombreuses études.

Composant essentiel du liquide synovial, la concentration et le poids moléculaire de l'acide hyaluronique diminuent dans l'arthrose, ce qui modifie la viscosité du liquide synovial et donc sa capacité de nutrition et de lubrification articulaire. Le poids moléculaire de l'acide hyaluronique des préparations injectables ne semble pas intervenir dans la qualité du résultat, mais les effets secondaires sont plus fréquents pour les produits à hauts poids moléculaires.

Injecté dans l'articulation, l'acide hyaluronique va rapidement se métaboliser (fragmentation par les hyaluronidases), il va, par son action sur les synoviocytes, favoriser la synthèse d'un acide hyaluronique endogène, ce qui explique l'effet retardé mais rémanent de cette injection. Initialement réservée au genou, cette technique a vu ses indications s'étendre à la hanche, l'épaule, la cheville et la main. Elle est aussi utilisée dans d'autres indications telles que: capsulose rétractile de l'épaule, prévention post-chirurgicale ou arthroscopique des raideurs du genou, arthrite rhumatoïde.... Nous avons comparé l'efficacité d'une versus deux ou trois injections d'acide hyaluronique dans la rhizarthrose. Il s'agissait au moment de la conception de cette étude (2006), d'un des tout premiers essais dans cette indication. Nos résultats sont rapportés en annexe.

### **4. Lavage articulaire**

Réalisé sous anesthésie locale, il consiste avec deux aiguilles à irriguer l'articulation avec du sérum physiologique. Il permet d'évacuer des débris fibrineux et cartilagineux avec souvent administration de corticoïdes. C'est une solution de dernier recours, à réserver aux arthroses liquidiennes et évoluées. 50 % des patients semblent améliorés pendant 6 à 12 mois.

#### **j) Traitements pharmacologiques généraux**

[186-189]

### **1. Antalgiques et Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) par voie orale**

Le Paracétamol est indiqué en première intention en raison de sa parfaite tolérance, en particulier digestive, cardiovasculaire et rénale. Il doit être pris toutes les 6 à 8 heures sauf en cas d'insuffisance rénale et sans dépasser 4 g par jour. Les études de satisfaction des malades ne notent pas de supériorité des AINS sur le paracétamol dans 48 % des cas.

En cas d'efficacité insuffisante, après évaluation des risques digestifs, cardiovasculaires et rénaux, il faut faire appel aux AINS. Il existe une grande variabilité individuelle d'où l'intérêt d'essayer la dose minimale utile dans les différentes familles d'AINS. L'association Paracétamol – AINS a pu être proposée. Chez un sujet à risque élevé, en particulier de troubles digestifs, il faut associer un IPP (inhibiteur de la pompe à protons). En cas d'efficacité insuffisante lors de poussées douloureuses, il est possible d'utiliser des Antalgiques de niveau 2 pendant une durée limitée (20 % d'effets secondaires dont 13 % d'arrêt du traitement).

Au total, compte tenu de l'évolution chronique de l'arthrose, de l'absence de parallélisme anatomo-clinique, de l'âge moyen élevé de ces patients, la plupart des traitements nécessitent des indications précises et un suivi prolongé.

Chez certains patients, lorsqu'une tendance dépressive est notée, des antidépresseurs peuvent être utilisés car les mécanismes de la douleur chronique et le mode d'action des antidépresseurs font intervenir des mécanismes neurochimiques assez proches.

### **2. Anti Arthrosiques Symptomatiques d'Action Lente (AASAL)**

Les principales caractéristiques de ces molécules, dont certaines ont une action surtout anabolique (chondroïtine sulfate, glucosamine) et d'autres une action surtout anticatabolique (extrait d'avocat et de soja, diacérheine), ont fait l'objet de nombreuses études dont les résultats sont parfois sujets à controverse. Ce sont des molécules qui agissent sur la douleur de l'arthrose, sur la fonction, avec un délai d'action de plusieurs semaines, leur effet rémanent se prolonge pendant au moins

deux mois après l'arrêt du traitement. Ils sont, du moins pour la chondroïtine sulfate et les extraits de soja et d'avocat, parfaitement bien tolérés. La plupart des AASAL ont fait l'objet d'études randomisées qui ont montré leur supériorité sur le placebo, malgré des critères d'évaluation souvent contestables. Ces études mériteraient de prendre en compte certains paramètres pour mieux définir les patients potentiellement répondeurs et les autres.

L'utilisation d'éléments objectifs d'appréciation (marche, viscosité, imagerie, marqueurs de l'arthrose) permettra de clarifier le sujet et d'apporter une réponse plus précise concernant l'effet structural des AASAL. L'étude du pincement de l'interligne articulaire présente de nombreuses variables, ce qui ne permet pas de le considérer comme un paramètre incontestable.

Le principal intérêt de ces molécules en dehors de leur activité de protecteurs articulaires, est leur parfaite tolérance pour un traitement au long cours et de permettre un rôle d'épargne des AINS.

### **3. Traitements «de fond»**

Il s'agit des traitements communément utilisés dans les rhumatismes inflammatoires : plaquenil, salazopyrine, leflunomide, méthotrexate. Ils n'ont pas leur place dans la prise en charge classique de l'arthrose. Cependant certaines formes d'arthrose se rapprochent de par leur présentation des rhumatismes inflammatoires. Il s'agit par exemple de l'arthrose digitale érosive qui évolue de façon sévère associant poussée congestive, réveils nocturnes, déformations et érosions. L'arsenal thérapeutique actuel ne propose malheureusement pas de thérapeutiques efficaces sur ces formes. Du fait de leur analogie avec les rhumatismes inflammatoires, certains auteurs ont étudié l'efficacité des traitements de fond sus-cités sans apporter d'arguments décisifs. Une seule étude sur l'utilisation du méthotrexate, avec un petit nombre de sujets, semble mettre en évidence une certaine efficacité. Elle n'a jamais été publiée. Nous avons mis en place une étude randomisée, en double aveugle contrôlée par un placebo visant à évaluer l'efficacité du méthotrexate dans l'arthrose digitale érosive dans le cadre d'un PHRC. Cette étude dont les inclusions sont à ce jour terminée permettra aussi d'obtenir des enseignements structuraux avec notamment l'utilisation d'une IRM dédiée.

### c) Principes de base

L'arthrose est une maladie chronique et douloureuse dont l'intensité et la gêne fonctionnelle ont tendance à s'aggraver avec le temps avec un retentissement dans la vie quotidienne et professionnelle. C'est une maladie articulaire à la fois locale et générale nécessitant une prise en charge pluridisciplinaire avec un rôle pour chaque spécialiste. Le traitement doit être personnalisé et Il faut tenir compte :

- de l'intensité des symptômes
- de la topographie, de son potentiel d'évolutivité, du stade radiographique, du terrain (obésité, facteurs mécaniques, niveau d'activité, morphologie et fonction articulaire).

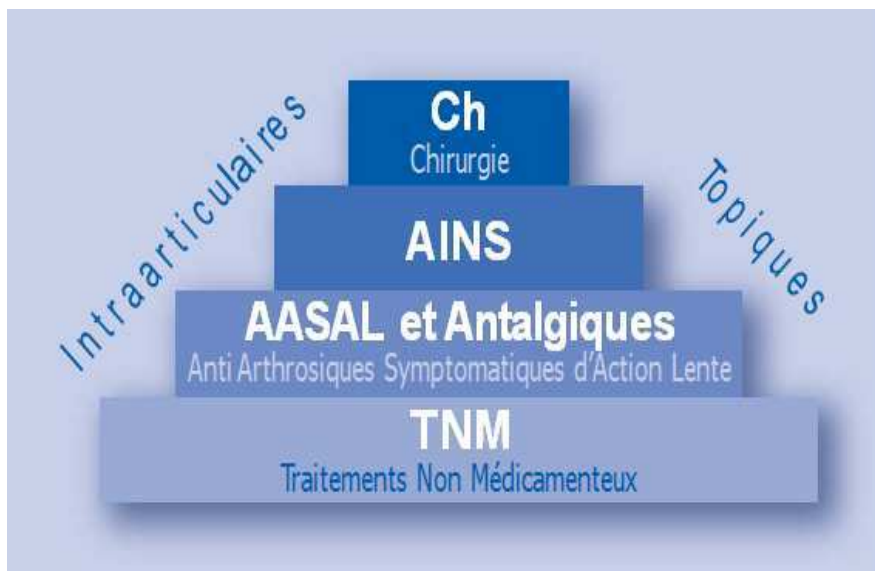


Tableau 5: prise en charge de l'arthrose.

### d) Perspectives thérapeutiques

Traiter le cartilage pathologique avant l'arthrose par thérapie génique ou par ingénierie tissulaire est une possibilité envisageable dans certaines lésions du cartilage en particulier circonscrites (fractures ostéochondrales, ostéochondroses, chondropathies localisées).

Ce n'est pas le cas de l'arthrose qui est avant tout une maladie de l'ensemble des structures articulaires dans laquelle le terrain en particulier, l'âge, l'obésité, le



surmenage articulaire, les dysmorphies et dysfonctions articulaires jouent un rôle prépondérant.

La piste des biothérapies est pour l'instant décevante. Rappelons qu'une arthrose sur deux seulement est symptomatique, qu'une arthrose symptomatique sur 50 devient chirurgicale. Il reste encore beaucoup de place pour le traitement médical dans la prise en charge de l'arthrose à condition que celui-ci reste raisonnable et bien toléré.

## F. Physiopathologie

### a) Principaux composants de l'articulation

L'articulation ne se borne pas au cartilage, elle comporte aussi des structures annexes: ménisques, ligaments, membrane synoviale, muscles qui toutes font partie intégrante de l'articulation.

#### i. Le cartilage articulaire (Figure 6)

Il s'agit d'un tissu non vascularisé et non innervé dont la nutrition est assurée principalement par diffusion à partir de l'os sous chondral et du liquide synovial. Le cartilage articulaire possède des propriétés biomécaniques lui permettant de supporter, d'amortir, et de distribuer les charges appliquées à l'articulation. Ces propriétés sont dues à la composition de la matrice extracellulaire formée principalement d'eau dans une proportion allant de 70 à 80 %, mais aussi de protéoglycanes et de collagène. La part cellulaire ne représente qu'environ 1% du volume du cartilage adulte et ne comprend qu'un seul type cellulaire qui est le chondrocyte [190 , 191].



Figure 6: Vue arthroscopique cartilage articulaire

## ii. La matrice extracellulaire (MEC) (Figure 7)

Très abondante, elle est composée d'un grand nombre de molécules dont les caractéristiques physico-chimiques et l'organisation structurale assurent les propriétés fonctionnelles du cartilage. Les principales sont le collagène et notamment de type II (CollII) qui est de loin le plus abondant des collagènes. Il comporte aussi des protéoglycanes et de l'eau (80%), ce sont les protéoglycanes qui, de par leur forte affinité pour l'eau, confèrent au cartilage ses propriétés biomécaniques. Les protéoglycanes, sont principalement représentées par l'aggrécane et donnent au cartilage ses propriétés mécaniques de compressibilité et d'élasticité. Les glycosaminoglycanes que ce soit la chondroïtine sulfate ou la kératane sulfate, sont des protéoglycanes sulfatés riches en radicaux acides très hydrophiles.

Les protéoglycanes, sont des biomolécules ubiquistes composées d'une protéine axiale et d'une ou de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes sulfatées (GAG) attachées de façon covalente [192], représentées principalement par le chondroïtine sulfate (CS), le kératane sulfate (KS), et le dermatane sulfate (DS) qui au niveau du cartilage articulaire se lient de façon non covalente à l'acide hyaluronique formant ainsi des agrégats, dont les plus gros sont formés d'environ 300 molécules[193].

L'aggrécane est le protéoglycane majoritaire du cartilage selon sa masse moléculaire et il peut être répertorié en deux classes en fonction de son poids moléculaire (biglycan et fibromoduline [193-195].

La structure rigide du cartilage est conférée par le collagène fibrillaire[193], constitué principalement du ColIII qui représente entre 90-95% du collagène articulaire. Sa structure est d'une importance majeure dans la mesure où elle permet de maintenir aussi bien le volume que l'architecture tissulaire.

D'autres types de collagène tels que le IX et le XI sont aussi présents mais en moindre quantité [193,194,196]. Cependant lors d'atteintes pathologiques du cartilage, le ColIII va être dégradé et remplacé de façon aberrante par le collagène de type I, lequel n'a pas les mêmes propriétés. Le collagène de type VI borde les chondrocytes et leur permet d'adhérer à la MEC[193]. Les collagènes IX et XI semblent impliqués dans la stabilisation de la structure en fibre du ColIII. Quant au ColX, il joue un rôle dans la minéralisation ,et se retrouve au niveau de la zone du cartilage calcifié et au niveau de la plaque de croissance et représente un marqueur d'hypertrophie du chondrocyte [193].

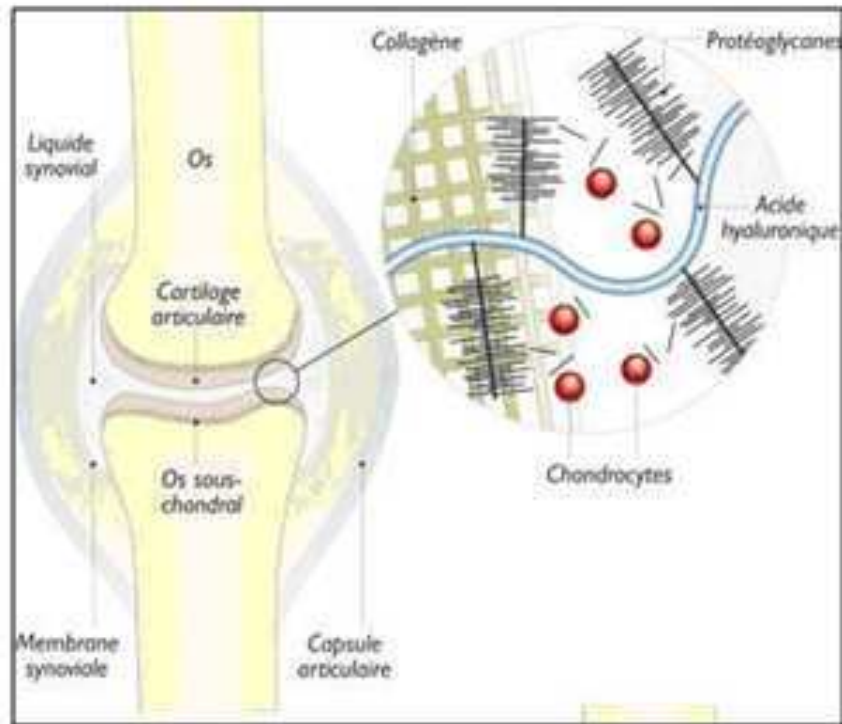


Figure 7: Représentation de la matrice extra cellulaire du cartilage (GAG= Glycosaminoglycans).

## b) Chondrogenèse

Elle comporte deux étapes initiales de maturation ayant pour finalité la formation de deux populations chondrocytaires. L'une conduisant à la formation du cartilage articulaire et la deuxième subissant une maturation en chondrocytes hypertrophiques, nommés ainsi en fonction de leur taille et en raison de l'expression de certaines molécules caractéristiques, plus précisément le collagène de type X, la phosphatase alcaline, Runx2, l'ostéopontine et la MMP-13 (Figure 8). En contre partie, une diminution de l'expression du Coll III est observée chez cette population qui

fini par disparaître par apoptose. Les zones d'apoptose chondrocytaire seront entravées par des vaisseaux sanguins et la synthèse de la matrice osseuse a lieu à ce niveau sous l'action des ostéoblastes; il s'agit de l'ossification enchondrale. La vitesse de maturation des chondrocytes est sous le contrôle de facteurs qui peuvent l'accélérer ou la ralentir [197,198].

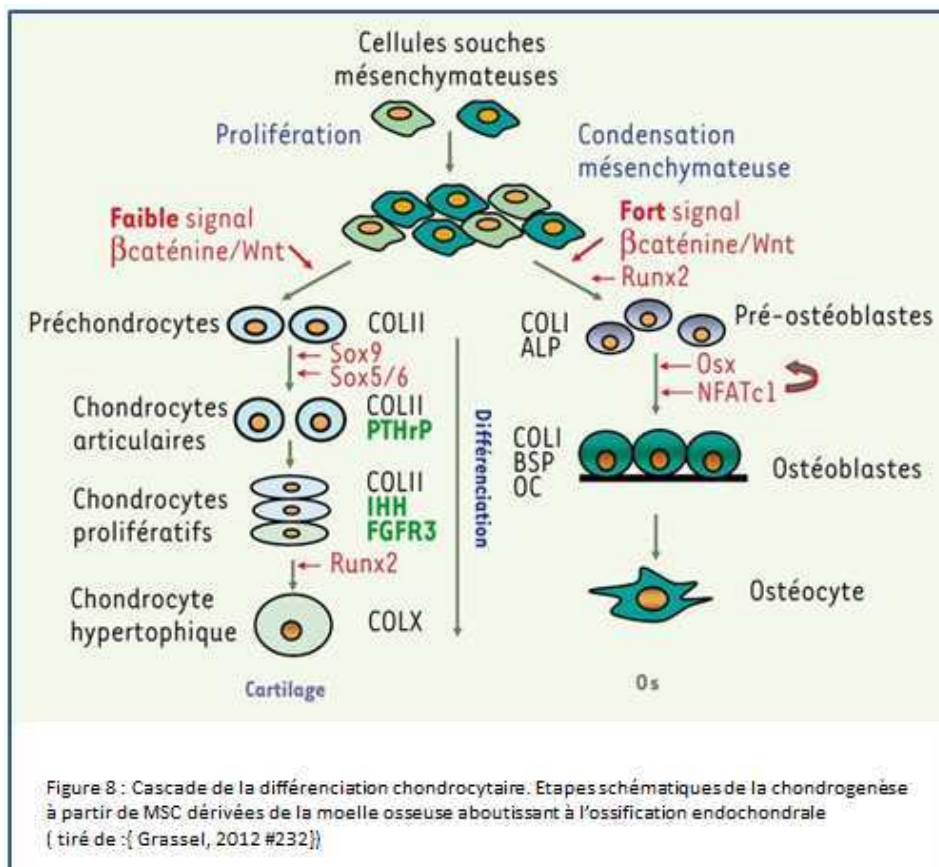
Quant à la première population, elle est à l'origine des chondrocytes articulaires qui possèdent la capacité d'exprimer les constituants de la MEC comme le Coll et l'aggrécane. La chondrogenèse est régulée par des facteurs de croissance et de différenciation via la régulation des protéines kinases PKA, PKC et MAPK [199,200]. La signalisation pour la régulation de la différenciation et de la prolifération chondrocytaire se fait via des intégrines et des récepteurs au collagène, dont le *Discoidin Domain-Containing Receptor 2* (DDR2) [201].

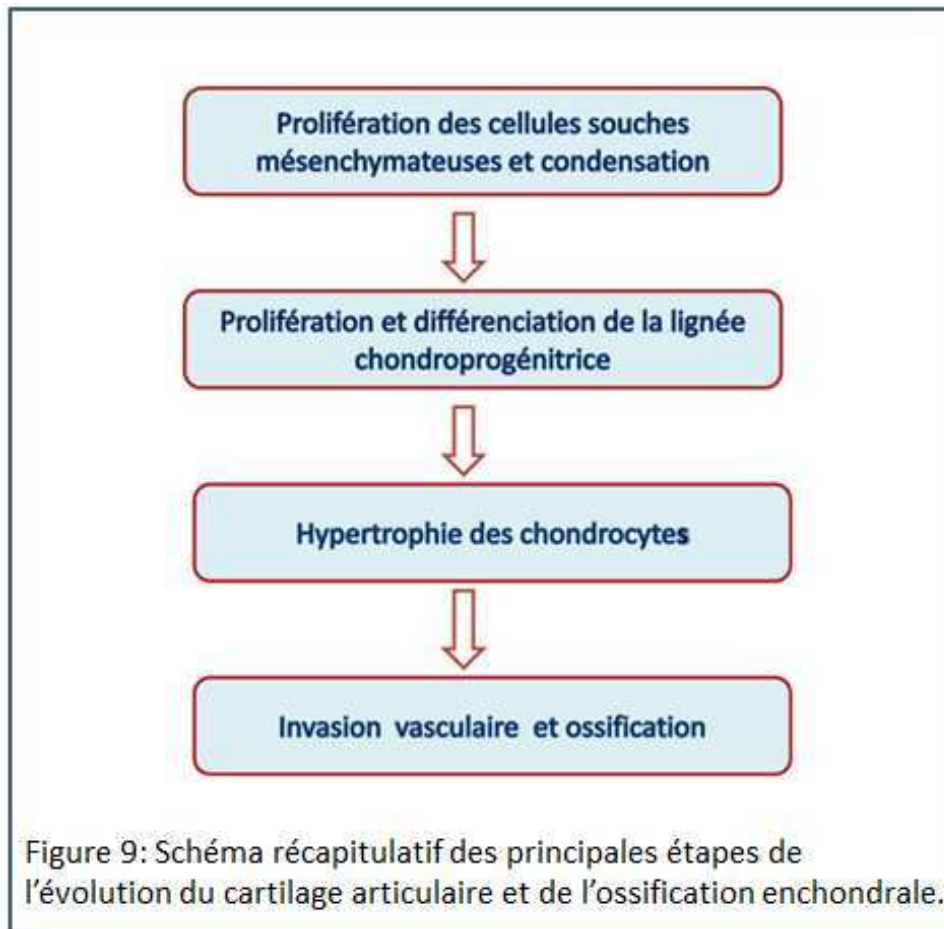
La taille, la forme et l'activité métabolique des chondrocytes articulaires varient dans les diverses couches du cartilage. Ce type cellulaire est constitué de toutes les organelles nécessaires pour la synthèse de la matrice sous l'effet de facteurs anaboliques, entre autres les protéoglycanes, l'aggrécane et le Coll. Ces facteurs s'opposent aux facteurs cataboliques dont l'IL-1 $\beta$  et les MMPs [202,203].

Chez l'adulte, la nutrition des chondrocytes se fait par diffusion à partir de la cavité synoviale pouvant atteindre les différentes couches du cartilage. Les canaux existant au niveau de l'os sous chondral permettent la nutrition de la couche calcifiée en contact avec ce dernier [194,204].

Après la maturation du squelette, les chondrocytes deviennent incapables de se diviser et la synthèse de la matrice diminue aussi fortement. Mais malgré cela elle persiste. Bien longtemps perçue comme cellule à l'activité ralentie, les chondrocytes ont une activité comparable à celle des autres cellules [204]. Bien qu'ils aient été considérés comme des cellules quiescentes pendant longtemps, ils ont la capacité d'assurer l'homéostasie cartilagineuse dans les conditions physiologiques. Cette homéostasie est assurée par de nombreux facteurs: contraintes mécaniques, facteurs de croissance; Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$ , Fibroblast Growth Factor (FGF $\beta$ ), Insulin-Like Growth Factor (IGF). L'activité métabolique du chondrocyte est fonction des informations qu'il reçoit par l'intermédiaire des intégrines [191,204]. Avec l'âge, le nombre de chondrocytes va diminuer en raison de

la mort cellulaire qui est le plus souvent accompagnée de changements morphologiques avec notamment l'apparition d'un phénotype semblable à celui des chondrocytes hypertrophiques produisant la MMP13 et du collagène de type X. Ces chondrocytes ont subi un phénomène de dédifférenciation. De plus, un raccourcissement de télomères résultant des dommages au niveau de l'ADN sous l'effet des "Reactive Oxygen Species" (ROS) est noté. Ce raccourcissement, caractéristique de la sénescence cellulaire observée chez les chondrocytes, est la conséquence de changements phénotypiques (phénotype sécrétoire sénescents). Ce phénotype contribue au vieillissement tissulaire par stimulation de la dégradation de la MEC via la favorisation du catabolisme sous l'effet des cytokines et facteurs de croissance. A ces changements, s'ajoutent d'autres changements ultrastructuraux au niveau de la MEC [205-207].





### i. Marqueurs de la Chondrogenèse

La MEC est constituée principalement d'eau, de Col II, Col VI, Col IX, Col XI, COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), et des protéoglycanes telles que aggrecane, versicane et fibromoduline [208]. Le Col II et l'aggrecane sont respectivement le collagène et le protéoglycane les plus abondants de la MEC et sont donc considérés comme deux indicateurs d'importance de la chondrogenèse. Le ColIII est exprimé selon deux isoformes: A et B. Ces deux variantes dépendent de l'épissage de l'exon 2 au niveau de l'ARNm précurseur[208]. La variante A contient l'exon 2 et est caractéristique des préchondrocytes, alors que la variante B (absence d'exon 2) est caractéristique du chondrocyte mature [208,209]. Les marqueurs reconnus comme caractéristiques d'une mauvaise chondrogenèse sont le Col I et le Col X, le Col X étant un marqueur de l'hypertrophie du chondrocyte [208,209]. Le Col I le collagène le plus abondant dans le corps, est retrouvé dans de multiples tissus tels que la peau, les tendons, les ligaments, le fibrocartilage, la paroi vasculaire et

l'os. Bien que présent à l'état normal dans la couche superficielle du cartilage, il est normalement sous exprimé durant la chondrogenèse[209].

## **ii. Influence de l'environnement**

Le milieu de culture joue un rôle prédominant, mais les conditions de culture influencent elles aussi de façon cruciale la chondrogenèse. La culture en 3D, est considérée comme la meilleure condition de réalisation d'une chondrogenèse [210, 211]. Que ce soit les MSC originaires de la moelle osseuse ou du tissu adipeux, il est reconnu que leur culture en 2D produit une moins bonne chondrogenèse qu'en 3D avec obtention d'un phénotype spécifique qui s'accompagne d'une augmentation du collagène de type 1 et de la décroissance du collagène de type II (phénotype fibroblastique) [212]. La culture en 3D reproduit un environnement et des contraintes proches de ceux dans lesquels se développe le précartilage durant le développement embryogénique et notamment durant lequel les MSC adoptent une morphologie sphérique [213]. Un environnement en 3D seul ne peut cependant maintenir une chondrogenèse et nécessite l'adjonction de facteurs de croissance et de stimuli physiques pour prévenir l'apparition d'un état hypertrophique du chondrocyte [214].

L'utilisation de gels d'agarose et d'alginate ne permet pas de maintenir une stabilité suffisante sur le long terme des cellules originaires du tissu adipeux, ce qui est à l'origine de différences entre les modèles de culture en 3D influençant la chondrogenèse avec apparition d'une sénescence prématurée, et d'un aspect hypertrophique se traduisant par une surexpression du ColX en présence du TGF $\beta$ 3 [215]. En revanche, la culture en culot résultant de la centrifugation des cellules en vue de la culture en présence de TGF $\beta$ 3 et dexaméthasone permet d'éviter la surexpression de Col X [216].

## **iii. Influence du type cellulaire**

En 1998, il a été montré que les cellules mésenchymateuses originaires de la moelle osseuse, connues pour leur capacité à se différencier en différents types cellulaires tels que les adipocytes et les ostéoblastes, avaient aussi la capacité de se



différencier en chondrocytes [213]. Cependant, elles ont rapidement montré leurs limites en termes d'auto renouvellement, et de difficulté de recueil [217]. En 2001, une alternative a été trouvée avec la mise en avant du potentiel chondrogénique des cellules souches originaires du tissu adipeux obtenues par liposuccion [218]. De nombreuses études ont comparé les capacités chondrogéniques des cellules issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux. Outre le fait que l'obtention de cellules adipeuses est moins invasive, certains auteurs démontrent que le potentiel chondrogénique des cellules d'origine adipeuse, similaire à celui des cellules originaires de la moelle osseuse alors que pour d'autres les cellules originaires de la moelle osseuse restent un meilleur choix [210,218-224].

Ces cellules, du fait d'une durée de vie limitée, d'un faible nombre de cellules obtenues par individu et de leur incapacité à résister au processus de congélation-décongélation présentent aussi un certain nombre de limites. D'autant plus que les cellules mésenchymateuses originaires du tissu adipeux, à la différence de celles provenant de la moelle osseuse, expriment rarement les BMPs (Bone Morphogenic Protein) et donc requièrent un apport exogène de ces dernières lors de leur différenciation [216].

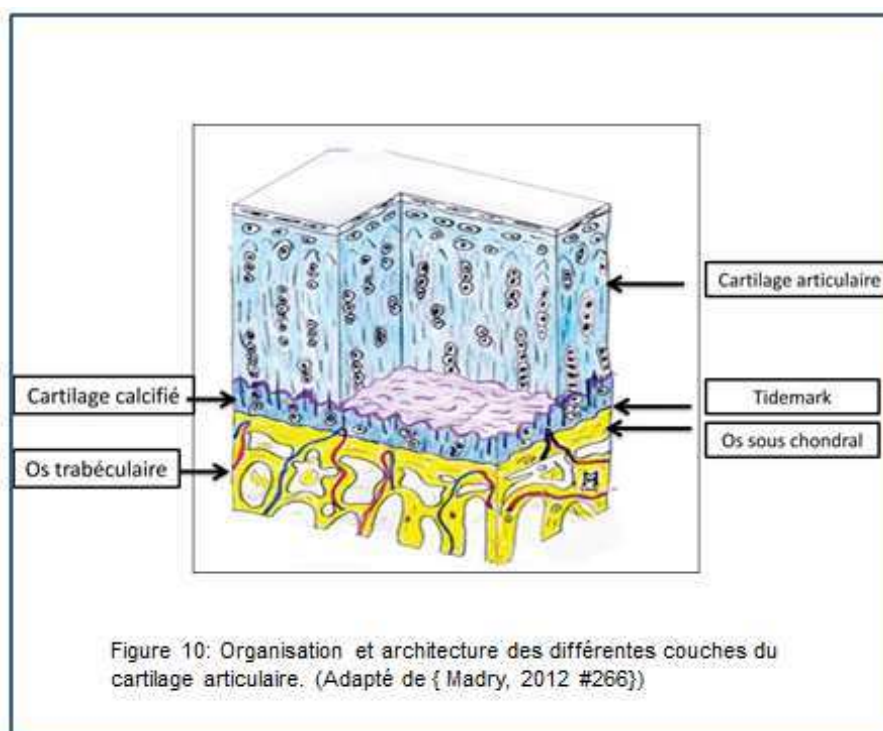
Il est connu que les conditions de culture peuvent affecter la qualité de la chondrogenèse. Outre la densité cellulaire qui lorsqu'elle est élevée permet de maintenir les capacités cellulaires d'auto renouvellement et le potentiel de différenciation dans les MSCs d'origine adipeuse, l'utilisation de facteurs de croissance tels que TGF $\beta$  et BMP ou encore IGF-1 est nécessaire pour la qualité de la différenciation [225, 226]. Le Fibroblastic Growth Factor notamment permet le maintien de la longueur des télomères et influe lui aussi sur le potentiel de différenciation [227].

## **G. Cartilage normal et cartilage arthrosique**

### **a) Caractéristiques du cartilage normal**

Le cartilage articulaire normal est un tissu blanc brillant. Il est formé de trois zones différentes selon la disposition cellulaire et les molécules sécrétées (Figure

10). La zone la plus superficielle est constituée de cellules aplaties sécrétant une protéine qui est la "lubricine", la zone intermédiaire est constituée par des cellules arrondies qui ont la capacité de produire le CollIII et les protéoglycanes, quant à la zone profonde, elle est constituée de cellules en colonne avec une MEC minéralisée. A l'état physiologique lorsque le cartilage est soumis à un stress mécanique, il est capable de rétablir l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. Les chondrocytes qui jouent un rôle de véritable chef d'orchestre sont à l'origine du maintien de l'homéostasie de la matrice grâce à leurs capacités de synthèse [228].

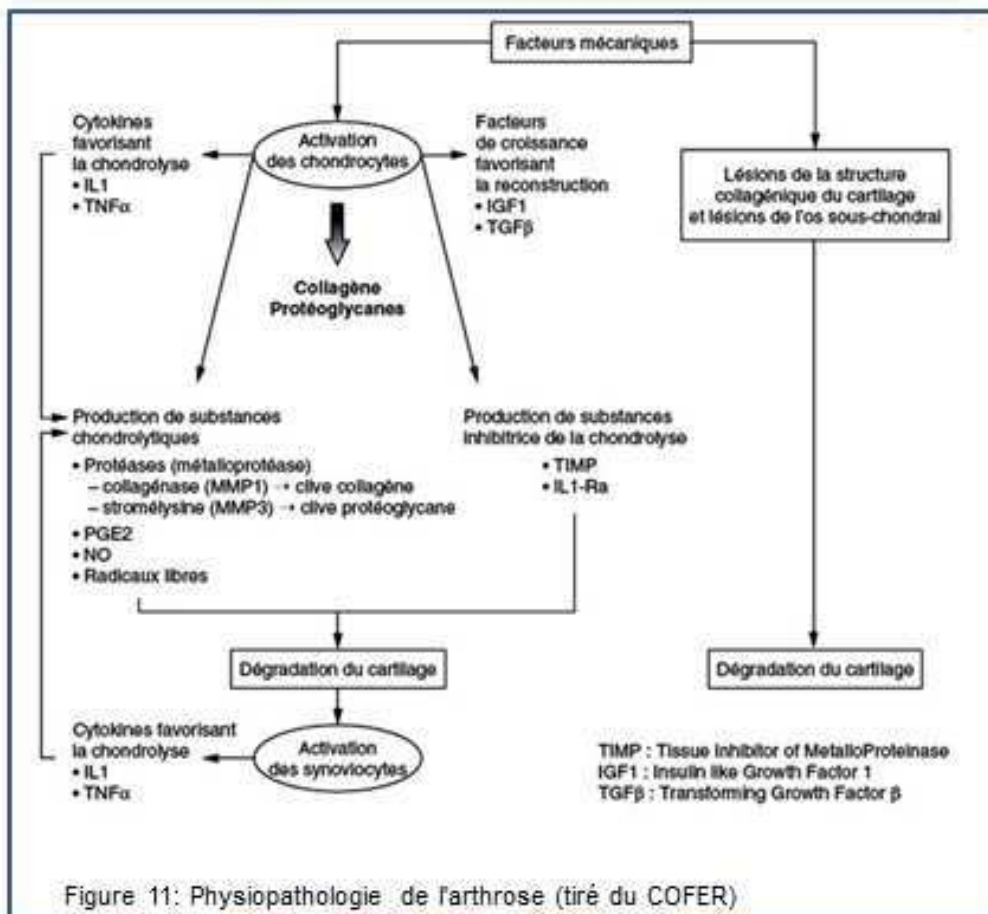


## b) Caractéristiques du cartilage arthrosique

Le début de l'arthrose est caractérisé par plusieurs phénomènes allant de la perte de la coloration blanchâtre du cartilage ainsi que de son état à une modification structurale se traduisant par un ramollissement[229,230].

Des protéines spécifiques vont dégrader les protéoglycanes et ainsi augmenter l'accès des MMPs aux fibres de collagène [231] dont la dégradation a pour conséquence un changement de l'architecture matricielle. Les contraintes biomécaniques à l'origine de ces changements affectent également la différenciation des chondrocytes qui s'hypertrophient et commencent à produire en excès des médiateurs inflammatoires et cataboliques (tableau 6), avec aussi un anabolisme

dévié via la production de molécules qui ne devraient pas être exprimées dans un cartilage normal. Ce déséquilibre du comportement chondrocytaire est à l'origine de la dégradation des composants matriciels [231] conduisant à l'altération des propriétés biomécaniques du cartilage [232, 233](Figure 11).



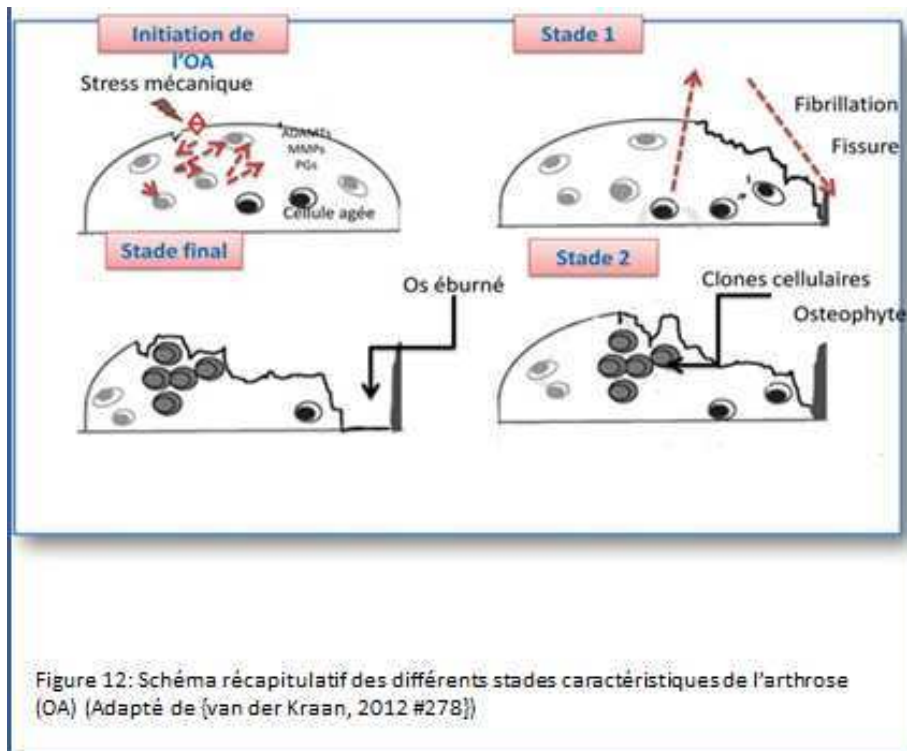
Au même temps, une prolifération cellulaire se manifestant par la formation de clones est visible à proximité des régions endommagées avec augmentation du métabolisme cellulaire. Ces cellules expriment des niveaux élevés de Smad 2/3 et Smad 1/5/8 phosphorylés. En fonction du niveau de la phosphorylation des Smads, les cellules peuvent être différenciées en deux catégories; l'une présentant un haut niveau de phosphorylation avec des cellules localisées aux alentours des dommages, l'autre avec des cellules ne présentant pas de Smad phosphorylés et situées loin des zones affectées [231, 234, 235].

### Principales caractéristiques des chondrocytes arthrosiques

Diminution de l'anabolisme par:	Augmentation du catabolisme par:
Synthèse de Coll	Production de cytokines inflammatoires
Production de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 $\beta$ (IL-1Ra)	Production de protéases
	Production des enzymes inflammatoires:
	Cyclooxygénase-2 (COX-2), (Microsomal Prostaglandin E Synthase) mPGES, inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)
	Apoptose cellulaire
	Augmentation de la synthèse de Coll IV, Coll III, Coll X

**Tableau 6: Principales caractéristiques des chondrocytes arthrosiques.**

L'ensemble de ces changements conduit à l'apparition de la fibrillation à la surface du cartilage qui va de plus en plus s'approfondir avec la progression de la maladie sans toutefois porter atteinte à la zone du cartilage calcifié [236]. La tidemark est toujours visible au début de la maladie [237]. Au fil du temps, le cartilage peut disparaître mettant à nu l'os sous chondral. En marge articulaire, des ostéophytes calcifiés prennent place et le tissu synovial est également affecté avec infiltration de cellules inflammatoires [191](Figure 12).



## H. Facteurs intervenants dans la dégradation de cartilage

En réponse aux perturbations mécaniques appliquées au chondrocyte, ce dernier répond par des tentatives de réparation. Mais malgré cela, l'état d'équilibre dont le chondrocyte est responsable est rompu au cours de l'arthrose en faveur du catabolisme par la production de médiateurs inflammatoires principalement des cytokines produites par les chondrocytes et les synoviocytes. [238]. (Figure 13).

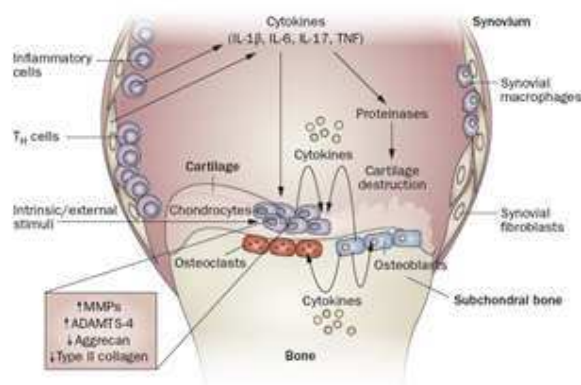


Figure 13: rôle des cytokines proinflammatoires dans la Physiopathologie de l'arthrose (schéma tiré de {Kapoor, 2011 #280})

## a) Cytokines

L'IL-1  $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL6 représentent les cytokines majeures impliquées au cours de l'arthrose (OA) en raison de leur rôle dans l'induction de la dégradation du cartilage articulaire [239, 240]. En plus de ces cytokines, d'autres médiateurs comme le Monocyte Chemoattractant Protein1 (MCP-1), le leukemial Inhibitory Factor (LIF), d'autres dérivés d'oxygène ROS, GRO, oncostatine M et des composés lipidiques dont les Prostaglandines (PGs) et les Leukotriènes (LTs) augmentent l'activité catabolique, ce qui conduit à la destruction du cartilage articulaire qui n'est autre que la résultante de son inflammation au niveau moléculaire [238].

## b) Interleukine-1 $\beta$

L'IL-1 apparaît comme la cytokine la plus impliquée dans les processus de dégradation du cartilage dans l'arthrose comme l'ont confirmé différents travaux expérimentaux. L'IL-1 $\beta$  semble jouer un rôle important dans le processus inflammatoire rencontré dans l'arthrose, qui a été pendant très longtemps considérée comme une pathologie essentiellement mécanique [241-243]. La famille de l'IL-1 renferme 11 membres dont l'IL-1 $\beta$  qui joue un rôle central dans la physiopathologie des maladies inflammatoires. L'IL-1 $\beta$  est synthétisée sous forme d'un précurseur de 31 kDa, forme inactive nécessitant l'intervention de caspas1 connue également sous le nom de l'IL-1 $\beta$  Converting Enzyme (ICE) [244], ayant la capacité de générer l'IL-1 $\beta$  sous sa forme active. Il a été montré qu'un modèle animal déficient en caspase-1

ne produit pas d'IL-1  $\beta$  mature. L'effet biologique de l'IL-1  $\beta$  peut être inhibé par ses inhibiteurs naturels : l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) et le récepteur « leurre » de type 2 à l'IL1 (IL-1RII), qui a la capacité de fixer l'IL-1 $\beta$  sans transmettre de signal [245]. Le récepteur à l'IL-1 (IL-1RI) est le récepteur ayant le plus d'affinité pour l'IL-1 $\beta$ , contrairement à IL-1RII qui semble plus spécifique de l'IL-1 $\alpha$  [244, 246].

Une fois fixé sur son récepteur de type 1 (IL-1RI), l'IL-1  $\beta$  peut activer des voies de signalisation conduisant à l'augmentation intra cellulaire de  $Ca^{2+}$ , l'activation de PKC, p38, ERK1/2, JNK et de la voie NF- $\kappa$ B, et de l'activateur de la protéine 1 (AP1).

Elle est considérée comme le principal médiateur responsable de la perte de cartilage dans l'arthrose et il a été montré que la matrice extra cellulaire était la cible de son activité catabolique. IL-1  $\beta$  augmente la synthèse des principales enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation du cartilage telles que les métalloprotéases (MMP) et les « A Disintegrin-like and Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs (ADAMTS).

Plusieurs auteurs ont rapporté l'augmentation dose dépendante des MMP-1,-3,-13 dans les chondrocytes de cartilages arthrosiques et non arthrosiques suite à l'injection d'IL-1 $\beta$ [247-249]. MMP13 a aussi une action entre autres sur les ADAMTS (aggrecanases), qui sont des enzymes impliquées dans la dégradation de l'aggrecane. Il a été rapporté que dans les chondrocytes normaux et arthrosiques l'IL-1 $\beta$  augmentait l'expression de ces enzymes [247]. D'autres auteurs ont retrouvé une action à la fois sur ADAMTS 4 et 5 [250,251].

Dai et ses collègues ont quant à eux mis en évidence, sur des chondrocytes articulaires humains, une stimulation de l'IL-18 sous l'influence de l'IL-1 $\beta$ . Et l'augmentation de l'ADAMTS-5 suite à la stimulation de cet IL-18. Il est donc probable que certains effets cataboliques de l'IL-1 $\beta$  soient relayés par d'autres facteurs ainsi que cela a été mis en évidence avec IL-18 [252].

L'expression d'autres médiateurs cataboliques est aussi augmentée sous l'influence de l'IL-1 $\beta$ , que ce soit la cathepsine  $\beta$ , la « Fibroblast Activation Protein- $\alpha$  » (FAP  $\alpha$ ), les glycosidases lysosomiales, l'« urokinase-type Plasminogen Activator Receptor » (uPAR) [244].

D'autre part, l'IL-1 $\beta$  a aussi la capacité d'induire l'expression de multiples médiateurs pro inflammatoires tels que le TNF $\alpha$ , l'IL-8, le complément, la prostaglandine E2 qui ont chacun la capacité de propager l'inflammation localement et de contribuer à la dégradation tissulaire. Par son action sur les facteurs angiogéniques tels que le « Vascular Endothelial Growth Factor » en complément d'autres chémokines telles que RANTES et leur récepteur CCR4, l'IL-1 $\beta$  va jouer un rôle notamment dans l'inflammation synoviale, laquelle est classiquement retrouvée dans les articulations arthrosiques [244].

Outre son effet activateur du catabolisme, de nombreuses études ont mis en avant sa capacité à réduire l'activité anabolique du chondrocyte notamment par une action négative sur les protéoglycanes et sur la synthèse du collagène. De nombreux auteurs ont montré que le traitement de chondrocytes arthrosiques par IL-1 $\beta$  se traduisait par une réduction significative de l'aggrecane et de la synthèse des protéoglycanes, mais aussi du collagène de type II que ce soit sur le chondrocyte humain ou dans des modèles animaux tels que le rat. Il est probable qu'une partie de cet effet délétère soit liée à une action négative sur la transcription du collagène [253-258]. En plus de ces différents effets, IL-1 $\beta$  induirait l'apoptose chondrocytaire, Le mécanisme en reste cependant mal connu et pourrait passer via la dépolarisation mitochondriale et l'augmentation de la production de protéines proapoptotiques (Bcl-2 family proteins) [259,260] ou encore par une induction d'acide nitrique (NO), comme l'a suggéré l'équipe de Pelletier, en mettant en évidence que NO est absent du cartilage normal et que sa présence dans le cartilage arthrosique semble liée à l'influence de l'IL-1 $\beta$ [261].

Bien que l'IL-1 $\beta$  soit le principal acteur du catabolisme au cours de l'arthrose, sa délétion accélérerait l'apparition de lésions arthrosiques comme cela a été montré chez la souris déficiente du gène de l'IL-1 $\beta$  [246].

### **c) TNF $\alpha$**

Le TNF- $\alpha$ , tout comme l'IL-1 $\beta$ , est une des cytokines majeures impliquées dans l'arthrose. Le TNF- $\alpha$  serait responsable de la cascade inflammatoire et l'IL-1 $\beta$  de la destruction du cartilage articulaire [246]. Il est synthétisé sous la forme d'un précurseur protéique de 76 acides aminés et est activé sous l'action d'une enzyme (la



TNF-Alpha Converting Enzyme:TACE) qui est présente à la surface cellulaire et dont l'expression est augmentée au niveau du cartilage arthrosique. Le TNF- $\alpha$  exerce ses effets via deux récepteurs nommés en fonction de leur poids moléculaires: le TNF-R55 et le TNF-R75 [262].

C'est le TNF-R55 qui est impliqué, dans les tissus articulaires, dans la médiation de l'effet du TNF- $\alpha$ . L'augmentation d'expression de ce récepteur est retrouvée aussi bien dans les chondrocytes que dans les fibroblastes synoviaux [263,264].

Dans l'arthrose, des niveaux élevés d'expression et de production du TNF- $\alpha$  sont retrouvés que ce soit au niveau du liquide synovial, de l'os sous chondral mais aussi du cartilage articulaire. Le TNF- $\alpha$  réduirait l'action anabolique du chondrocyte en inhibant la synthèse des constituants de la MEC et notamment des protéoglycanes [265]. Il aurait aussi des effets sur le catabolisme en induisant la sécrétion des MMPs [266].

#### **d) Il-6 et autres cytokines**

L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  ne sont pas les seules cytokines à intervenir dans l'arthrose, d'autres cytokines contribuent de façon significative à la maladie arthrosique, telles que les IL-8,IL-11,IL-15,IL-17,IL-18,IL-21,mais aussi l'IL-6 qui est une cytokine pro-inflammatoire produite par différents types cellulaires dont le chondrocyte [267]. Elle aurait un effet catabolique sur le cartilage. L'injection d'IL6 dans l'articulation du genou chez la souris conduit à l'apparition de lésions arthrosiques alors que la neutralisation du gène de l'IL-6 chez la souris semble bloquer la dégradation du cartilage induite par « Hypoxia-Inducible Factor 2  $\alpha$  » (HIF-2  $\alpha$ ) avec une modulation concomitante des taux de MMP-3 et MMP-13. De plus, il a été montré que les taux d'IL-6 et de son récepteur IL-6R sont augmentés dans le liquide synovial et le sérum des patients arthrosiques[267 , 268]. Il semblerait qu'elle ait aussi un rôle dans l'expression de certaines MMPs et de médiateurs pro inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de l'arthrose tels que: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, Nos2 [269-271]. Parallèlement, IL-6 et la forme soluble de l'IL-6R augmentent les niveaux d'ARN messager de MMP-1, MMP-3, MMP13 et ADAMTS5 dans le chondrocyte articulaire de souris [272,273].

Il semblerait que le rôle inflammatoire et dégénératif de l'IL6 au cours de l'arthrose soit plus prononcé en présence de la sous unité soluble IL6R qui augmente son affinité au récepteur. Bien que les études in vitro suggèrent un possible rôle de l'IL6 dans la physiopathologie de l'arthrose, il n'y a que peu d'informations à notre disposition sur un rôle in vivo dans la dégradation du cartilage arthrosique. Mais il est probable qu'elle puisse représenter une cible thérapeutique intéressante dans l'arthrose notamment compte tenu de son action pro-inflammatoire et de ce qu'il a été démontré sur son rôle dans la voie HIF-2 $\alpha$ .

Outres ces cytokines, d'autres telles que l'IL-17 et l'IL-18 sont exprimées au niveau du cartilage et de la membrane synoviale des articulations arthrosiques et pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'arthrose [274,275].

#### e) **Métalloprotéases (MMPs)**

Elles ont été découvertes pour la première fois par Grosset Lapière en 1962, elles appartiennent à la famille des MMPs zinc-dépendantes, qui renferme plus de 26 endoprotéases dont les collagénases (MMP-1,8 et 13) responsables de la destruction du collagène, les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les stromélysines (MMP-3,7,10 et 11) et les MMPs de type membranaire dont MT-MMP1-4 et différents autres sous-groupes [276].

Elles sont majoritairement présentes sous forme soluble avec quelques exceptions sous forme membranaires et ont pour fonction de dégrader les protéines matricielles. Elles comportent trois domaines [277]:

- un domaine au niveau de l'extrémité Nterminale qui permet le maintien de l'enzyme sous sa forme latente et dont le clivage conduit à son activation.
- un domaine catalytique reliant les atomes de zinc et de calcium.
- un domaine hémopexine au niveau de l'extrémité C terminale.

Leur activité est optimale à pH neutre et requiert la présence de calcium et de zinc [278, 279].

Elles sont inhibées par lesTIMP (*Tissue Inhibitor of Metalloproteases*) dont seuls les types 1 et 2 sont produits par les chondrocytes. Mais leur activité est débordée par les MMPs dans la pathologie arthrosique.

Pendant longtemps la MMP-13 ou encore collagénase 3 a été considérée comme la principale enzyme responsable de la dégradation du cartilage. Comme les autres MMPs, elle est sécrétée sous une forme latente et son activation se fait sous l'influence de la trypsine-2 (sous-groupe des Matrix Serin Protéinases), par l'intermédiaire de son domaine structural N terminal, tout comme les MMP-1,-3,-8 [280].

L'action physiologique de la MMP-13 est contrôlée par des inhibiteurs naturels dont l' $\alpha$ 2-microglobuline qui est sécrétée par le foie et retrouvée principalement au niveau du sérum et du liquide synovial. En raison de son haut poids moléculaire, elle ne peut pénétrer au niveau du cartilage articulaire et agit sur les MMPs en empêchant leur accès au substrat [277].

Dans les conditions physiologiques, la MMP-13 est exprimée par les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes humains lors du développement fœtal. Au niveau des tissus normaux, son expression est très faible ou même inexistante [281].

L'expression de la MMP-13 est augmentée sous l'effet de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ . Elle va intervenir sur la dégradation du Col II avec une activité 5 à 6 fois plus importante sur ce type de collagène que d'autres MMPs telle que la MMP-1 qui est elle aussi fortement impliquée dans le développement de l'arthrose [276, 282-284].

La preuve du rôle délétère de MMP-13 a été apportée chez les souris MMP-13 invalidées qui ainsi présentent moins de survenue d'érosions cartilagineuses. Dans ce modèle de souris, après arthrose chirurgicalement induite, on ne retrouve pas de différence à 4 semaines au niveau des érosions cartilagineuses entre souris invalidées ou non, mais à 8 semaines en revanche les érosions sont nettement moindres chez les souris délaitées [285]. Il est intéressant de noter que la perte d'aggrecane est la même dans les deux groupes de souris, ce qui souligne que le déficit en MMP-13 peut inhiber la dégradation arthrosique même en présence de taux bas d'aggrecane. La perte d'aggrecane seule, ne peut donc pas conduire à l'érosion cartilagineuse.

Des observations plus anciennes avaient mis en évidence le rôle pivot d'ADAMTS5 dans la diminution de l'aggrecane chez la souris arthrosique et la réduction de la

pathologie arthrosique chez les souris invalidées pour ADAMTS5 [286]. Ce qui implique que la perte d'aggrecane ouvre le chemin à une dégradation du collagène de type II médiée par MMP-13.

MMP-13 semble aussi jouer un rôle dans la dégradation d'autres protéines matricielles. En revanche les études portant sur des souris invalidées du gène codant pour MMP-13 ont montré que ce dernier n'avait pas de rôle essentiel dans la formation des ostéophytes. La même chose a été démontrée pour l'hypertrophie chondrocytaire [287].

On sait aussi que MMP-13 est impliquée dans les maladies inflammatoires, ce qui rend plausible son intervention dans les processus inflammatoires de l'arthrose [288].

D'autres MMPs, telles que MMP-1 et MMP-8 sont aussi impliquées dans le processus arthrosique et présentent une spécificité pour le Col I et III respectivement.

La cible privilégiée des MMPs reste le collagène, bien que certaines familles puissent dégrader l'aggrecane matricielle. L'action des MMPs contribue significativement à la progression de la maladie arthrosique en dégradant la matrice extra cellulaire.

## **f) ADAMTS**

Le collagène est protégé par l'aggrecane [289-292] qui est l'un des composants majeurs de la matrice extra cellulaire. Sa dégradation est considérée comme un événement essentiel dans le développement de la pathologie articulaire conduisant à une dégradation irréversible du collagène [293, 294].

Les aggrecanases (ADAMTS) sont les principales protéines responsables de la dégradation in situ du cartilage articulaire.

Elles appartiennent à la famille des ADAMTS, impliqués dans l'angiogénèse, la coagulation et la progression des arthrites. Parmi les 19 membres de la famille, seuls 5 ont la capacité de dégrader le cartilage et d'agir sur le couple Aggrecane-proteoglycane: il s'agit d'ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-8 et ADAMTS-9 [294-296]. Deux aggrecanases (ADAMTS-4 et -5) semblent particulièrement impliquées dans la dégradation du cartilage [297]. Il existe au niveau

du cartilage, une régulation très précise de l'activité des aggrecanases pour le maintien d'un équilibre entre anabolisme et catabolisme de l'aggrecane.

De nombreuses études portant sur l'animal ont montré que l'ADAMTS4 joue un rôle significatif dans la dégradation in vitro de l'aggrecane. Cependant, il a aussi été montré que les souris déficientes en ADAMTS5 (mais pas en ADAMTS4) sont protégées contre la perte précoce d'aggrecane et l'érosion cartilagineuse dans des modèles inflammatoires et non inflammatoires d'arthrites suggérant que l'ADAMTS5 est plus active que l'ADAMTS4 [298].

Mais, à ce jour, la question de savoir laquelle de ces deux aggrecanases est la principale responsable de la dégradation de l'aggrecane lors de la dégradation du cartilage articulaire reste débattue.

Il a été montré dans le cartilage humain et dans les chondrocytes que l'expression de l'ARNm d'ADAMTS4 est induite par l'action de cytokines cataboliques telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ainsi que par l'action du TGF- $\beta$  mais que en revanche l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS5 n'est pas dépendante de ces mêmes cytokines et que sa régulation se fait soit par contact direct soit par la voie MAPK [299]. En revanche les résultats des études in vitro s'intéressant à l'ADAMTS5 s'opposent aux résultats sur l'animal qui montrent que son expression est augmentée par les cytokines cataboliques.

### **g) TGF $\beta$ (The transforming growth factor-beta)**

La famille des TGF- $\beta$  comprend plus de 35 membres dont les activines ou encore les BMP (Bone Morphogenetic Proteins) [300]. Ces protéines jouent un rôle crucial dans le développement et l'homéostasie de différents tissus et ce sont des médiateurs de la réponse cellulaire aux agressions. Elles régulent la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la migration cellulaire, et elles participent aussi au contrôle de la synthèse et de la dégradation de la matrice extra cellulaire. [301]. Il existe 3 isotopes du TGF- $\beta$ , ayant le même gène promoteur, qui sont le TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3. Chacune de ces isoformes ayant un haut degré d'homologie allant de 84 à 92%. Compte tenu de la présence de différentes séquences

promotrices, l'expression de ces trois isoformes est différemment régulée au niveau transcriptionnel [302-304].

Le TGF- $\beta$  est sécrété sous une forme inactivée et son activation se fait par l'intermédiaire de récepteurs serine/thréonine transmembranaires qui permettent la transmission d'un signal via les protéines SMAD [301, 305].

Le TGF- $\beta$  peut aussi activer les voies Erk, Jun N-terminal kinase (JNK) et p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK).

Le rôle essentiel du TGF- $\beta$  dans la physiopathologie de l'arthrose a été mis en avant ces dernières années notamment pour le maintien de l'intégrité structurale du cartilage et pour son homéostasie [306]. Il stimule la prolifération chondrocytaire et son absence se traduit par une perte en protéoglycanes entraînant une dégradation du cartilage chez la souris [307,308].

Plusieurs auteurs ont mis en évidence le rôle du TGF- $\beta$  dans la formation des ostéophytes. La suppression de son activité endogène supprime la formation d'ostéophytes in vivo mais en revanche aggrave la dégradation du cartilage dans les modèles de souris arthrosiques[309,310].

#### **h) Monoxyde d'Azote (NO)**

Le rôle du NO reste encore très discuté, il est produit dans l'arthrose de manière excessive par le chondrocyte sous l'effet de l'iNOSynthetase [232]. Il a la capacité de relayer l'IL-1 $\beta$  [311]et d'inhiber la synthèse des protéoglycanes,du collagène II, de stimuler l'action des MMPs, d'accroître le relargage des aggrecanes dans le liquide synovial et d'induire l'apoptose des chondrocytes [312].

### **I. Inflammation**

L'arthrose a longtemps été considérée comme la conséquence d'un processus de surcharge sur des articulations portantes, ou d'une fragilité de la matrice cartilagineuse conduisant à une dégradation par sollicitation excessive d'une articulation. Entre autres explications, allant dans ce sens, on peut noter l'activité métabolique très faible des chondrocytes, l'absence de possibilité de réparation du

cartilage, l'absence de vascularisation et d'innervation. Les conceptions se sont modifiées avec la découverte de l'implication de nombreux médiateurs tels que les cytokines, les prostaglandines et les MMPs. Le rôle de la synovite et de l'os sous chondral est aussi apparu important. Une revue générale des processus inflammatoires dans l'arthrose vient d'être faite [75].

La membrane synoviale participe à la maladie arthrosique et même si elle n'est pas l'initiatrice d'une arthrose, elle joue un rôle à des étapes plus tardives [313].

Le gonflement des articulations avec présence d'un épaissement synovial et/ou d'un épanchement fait partie de la symptomatologie arthrosique, et la possibilité de poussées douloureuses parfois nocturnes peut permettre un rapprochement avec les atteintes articulaires inflammatoires. Dans l'arthrose, un pannus est présent dans un petit nombre de cas, décelable par IRM avec injection de gadolinium, échographie voir arthroscopie. Les niveaux de CRP ultrasensible peuvent s'accorder avec une inflammation synoviale même si l'explication prête à controverses. Des fragments de cartilage jouant le rôle de corps étrangers, pourraient être à l'origine de la production par les cellules synoviales de médiateurs inflammatoires que l'on retrouve dans le liquide synovial. Ces médiateurs activent les chondrocytes de la couche superficielle du cartilage, avec synthèse de MetalloProteases et dégradation du cartilage. Ces médiateurs peuvent aussi induire une angiogenèse synoviale, augmenter la synthèse de cytokines inflammatoires et de Matrix MetalloProteases (MMP) par les cellules synoviales elles-mêmes, avec perpétuation de la dégradation du cartilage.

De nombreux types de cellules généralement impliquées dans les processus immunologiques interviennent dans le déclenchement du processus arthrosique et font intervenir directement le tissu synovial.

Chez la souris, dans le modèle de l'arthrose à la collagénase, les macrophages synoviaux jouent un rôle majeur dans la production de MMPs [314]. Les macrophages synoviaux interviennent aussi dans la formation d'ostéophytes [315].

Des marqueurs moléculaires des cellules dendritiques synoviales ont été détectés dans un modèle post-traumatique d'arthrose du lapin dès les premiers stades après la chirurgie, ce qui suggère leur participation précoce. Il a été retrouvé aussi une augmentation de l'expression de l'IL-17, principalement exprimée par les mastocytes

dans le tissu synovial arthrosique, à un niveau moindre cependant que dans les polyarthrites séronégatives [316].

Des anomalies de l'immunité sont présentes dans l'arthrose. Des Toll Like Receptors (TLR) ont été retrouvés augmentés dans le cartilage arthrosique au niveau des lésions [317]. Les ligands des TLR-2 et TLR-4 et l'acide hyaluronique de bas poids moléculaire sont présents dans le liquide synovial arthrosique ainsi que les fibronectines, ténascine-C, et alarmines S100A8 et S100A9 qui sont impliquées dans l'activation synoviale et la destruction du cartilage (Protéines S100, groupe de hautemobilitéprotéineB1[HMGB1]). Ces facteurs peuvent induire des réponses cataboliques dans les chondrocytes et/ou des réactions inflammatoires dans les synoviocytes. Ces résultats ont été corroborés par une analyse protéomique révélant que les protéines de liquides synoviaux arthrosiques peuvent induire dès le début de la maladie une production par les macrophages de cytokines inflammatoires par la voie de la signalisation TLR-4 [318]. Le liquide synovial des patients atteints de lésions arthrosiques précoces du cartilage montre une réponse accrue de type fibroblastique aux ligands TLR-2 et TLR-4 des synoviocytes. Des niveaux accrus d'IL-15 sont retrouvés dans le liquide synovial des gonarthroses précoces par rapport à des gonarthroses tardives, avec un nombre de CD 8 synovial corrélé au taux de MMP-1[319]. Un rôle du complément a aussi été mis en évidence par Wang et son équipe avec des taux anormalement élevés dans l'articulation arthrosique chez l'homme[320]. On peut fréquemment observer dans les liquides articulaires arthrosiques la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté et de phosphate de calcium basique, ils pourraient être à l'origine d'une réponse immunitaire.

Plusieurs médiateurs inflammatoires sont à des niveaux sériques plus élevés chez l'arthrosique [321]. Dans l'arthrose symptomatique du genou, dans un sous groupe de patients douloureux, les leucocytes périphériques sont apparus activés avec expression de l'IL-1 $\beta$  [322].

On insiste actuellement surtout sur le rôle des adipokines qui pourraient jouer un rôle important (la question a été développée précédemment).



Ainsi, l'arthrose pourrait être initiée et/ou aggravée par la présence d'une inflammation de bas grade, systémique, avec intervention de médiateurs inflammatoires circulants.

L'âge constitue le principal facteur de risque de l'arthrose. Un lien âge-inflammation pourrait intervenir dans la mesure où l'inflammation réduit l'élimination des protéines oxydées avec pour corollaire l'augmentation de la concentration cellulaire en dérivés réactifs de l'oxygène qui contribuent au stress oxydatif. Or le stress oxydatif est un facteur de sénescence cellulaire, en particulier des chondrocytes avec essentiellement une sénescence de sécrétion (phénotype de sénescence sécrétoire associée) concernant plusieurs médiateurs inflammatoires et pro dégradatifs. La production de MMP-13 par le chondrocyte après stimulation par l'IL-1 $\beta$  augmente avec l'âge, de même que la production d'IL-1 $\beta$  par le lymphocyte non stimulé ce qui suggère que le chondrocyte vieillissant acquiert ce phénotype [63].

Les produits de glycation avancée (AGE), produits dans les tissus vieillissants, sont susceptibles d'affaiblir le cartilage en modifiant ses propriétés mécaniques. Ils peuvent déclencher une activation des chondrocytes en se liant à des récepteurs spécifiques présents à leur surface. Ce processus peut conduire à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires et de MMPs [61,323,324].

L'augmentation du risque d'arthrose après la ménopause est un fait bien établi et l'on sait qu'un récepteur oestrogénique est présent dans le noyau des chondrocytes, des ostéoblastes sous-chondraux et des synoviocytes [65]. Mais bien que l'augmentation de l'incidence de l'arthrose soit considérable après la ménopause, les mécanismes sont mal connus. L'effet global des œstrogènes paraît être l'inhibition de l'expression et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1[125].

L'intervention de mécanorécepteurs est une évidence avec conversion des contraintes articulaires mécaniques anormales (étirement, compression, cisaillement, pression) en signaux intracellulaires activés dans les cellules par des mécanorécepteurs de surface (canaux ioniques, intégrines [65]. Ces signaux peuvent conduire à la surexpression dans les chondrocytes et les cellules de l'os sous chondral, de médiateurs inflammatoires tels que prostaglandines, chimiokines [325]. La conversion signal mécanique-médiateurs de l'inflammation est médiée par l'activation de voies de signalisation et particulièrement NF-kB et MAPK [326].

Il existe donc des arguments pour penser que l'inflammation joue un rôle important dans l'arthrose ce qui représente un justificatif à l'utilisation de thérapeutiques visant cette inflammation, mais cependant l'approche thérapeutique par anti-cytokines n'a pas encore fourni de résultats bien convaincants.

## J. Relations os-arthrose

### a) Densité minérale osseuse

Son rôle a déjà été discuté préalablement.

### b) Os sous-chondral

Il a été mis en évidence depuis plusieurs années que cartilage et os sous chondral communiquent. On retrouve au niveau de l'os sous chondral arthrosique différentes cytokines telles que IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , activateurs des plasminogène et urokinase, plasmine. Il s'agit de cytokines clés de l'arthrose susceptibles d'induire une inflammation synoviale, un remodelage sous chondral, une activation ostéoclastique, l'activation d'enzymes et la dégradation de la matrice extra articulaire du cartilage[327-329]. Elles peuvent être produites sous l'influence de stress mécaniques, de surcharges : excès de poids, anomalies d'alignement, traumatismes, hyperpression veineuse locale et hypoxie [246,330,331].

Il est possible que des micro fractures soient à l'origine d'augmentations sous chondrales locales de la DMO et d'un retentissement cartilagineux conduisant à l'arthrose[332].

Les compétences mécaniques de l'os sous chondral ne sont pas normales dans l'arthrose[333]. On constate en effet un épaissement osseux sous chondral, une modification de l'architecture des travées osseuses sous chondrales, la formation d'ostéophytes et le développement de kystes sous-chondraux. Il s'y associe des modifications du contour des surfaces articulaires à l'origine d'anomalies biomécaniques [237,334,335]. Scintigraphies et radiographies montrent que ces anomalies sont précoces dans le cursus de l'arthrose et que les anomalies du

turnover osseux précèdent les modifications osseuses détectées par radiographies [336,337]. Une augmentation de la fixation isotopique sous chondrale est prédictive de l'apparition d'un pincement articulaire et de lésions structurelles de l'os sous chondral [338]. Les modifications structurelles de l'os sous chondral de même que le développement d'ostéophytes précèdent les lésions cartilagineuses et le pincement articulaire [339]. Dans la conception de « Radin et Rose » les modifications de l'os sous chondral sont à l'origine de lésions du cartilage articulaire en raison d'une augmentation de la rigidité osseuse. De nombreuses études ont confirmé que le volume de l'os sous chondral est accru dans l'arthrose ce qui corrèle bien avec l'aspect de sclérose sous chondrale observé sur les radiographies.

Il a été mis en évidence dans plusieurs études un amincissement et une diminution du nombre de travées osseuses de l'os sous chondral [340-342]. Ce qui va de pair avec les aspects constatés d'ostéoporose périarticulaire [343].

Les lésions médullaires osseuses détectables en IRM au niveau de l'os sous chondral sont un marqueur fidèle de la progression de l'arthrose [344]. Ces lésions médullaires osseuses s'observent principalement au niveau des lésions cartilagineuses maximales. Elles pourraient correspondre à des microfractures [345, 346]. Ces microfractures de l'os trabéculaire sont à des stades de réparation différents avec un possible processus de réparation osseuse local [347].

Les schémas physiopathologiques de l'arthrose et de l'ostéoporose sont très proches. Ils font intervenir des facteurs génétiques souvent communs, tels que les polymorphismes de nombreux gènes : collagène de type 1 (COL1A1), récepteur à la vitamine D (VDR), récepteurs aux œstrogènes (ER), TGF  $\beta$ ... Mais aussi des facteurs de risques communs tels que l'âge, des facteurs mécaniques ou traumatiques et des facteurs environnementaux comme le poids, l'alimentation, le tabac, des hormones... Dans l'arthrose comme dans l'ostéoporose ces différents facteurs sont à l'origine de perturbations cellulaires et de la matrice extracellulaire, avec dégénérescence cartilagineuse et baisse de la résistance mécanique osseuse, préambules des lésions radiographiques d'arthrose et des fractures ostéoporotiques. Ces différents éléments et le fait que les substances qui inhibent le turnover osseux réduisent le nombre des lésions sous chondrales visualisées par l'IRM dans l'arthrose sont venus s'ajouter à la mise en lumière du rôle de l'os sous chondral

dans l'arthrose pour constituer l'argumentaire à l'essai dans l'arthrose des traitements anti ostéoporotique tels que les bisphosphonates dont l'efficacité n'a cependant pas été démontrée [348]. Mais d'autres substances sont actuellement en cours d'expérimentation, notamment le ranélate de strontium.

### **c) Ostéophytes**

Caractéristiques de l'arthrose, ce sont des excroissances fibrocartilagineuses disposées en périphérie de l'articulation. Les modèles animaux ont permis d'en préciser le mécanisme de formation [349].

Le fait initial est une prolifération de cellules du périoste en périphérie de l'articulation avec différenciation en chondrocytes et ossification enchondrale. Il y a une production locale de facteurs de croissance en particulier de TGF $\beta$  et de BMP 2 qui jouent un rôle direct comme l'ont montré les expérimentations avec injection directe dans l'articulation ou avec blocage sélectif de leurs voies de signalisation qui inhibe la formation ostéophytique [306]. La localisation des ostéophytes aux zones articulaires où la charge est élevée est un argument pour penser qu'ils contribuent à la stabilité de l'articulation. Des adipokines sont également retrouvées (adiponectine, visfatine) au niveau des ostéophytes précocement et tardivement et semblent donc intervenir dans leur développement[350].

Les alarmines S100A8/S100A9 produites par les macrophages synoviaux semblent aussi jouer un rôle important [351].

## **K. Cellules souches**

### **a. Généralités :**

On peut distinguer plusieurs types de cellules souches dans un organisme adulte en fonction de la diversité des types cellulaires qu'elles peuvent engendrer. Les cellules souches de l'organisme ont été classées en fonction de leur potentiel de développement :

- Les **cellules souches unipotentes**, sont en mesure de ne fournir qu'un seul type cellulaire, elles sont capables d'autorégulation, ce qui les distingue des cellules précurseurs.
- Les **cellules souches multipotentes**, sont capables de donner naissance à plusieurs types cellulaires, comme les cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse qui sont à l'origine des cellules sanguines (érythrocytes, monocytes, granulocytes....). Deux exemples de cellules souches multipotententes sont les cellules souches adultes hématopoïétiques (HSC) et les cellules mésenchymateuses (MSC).
- Les **cellules souches pluripotentes**, issues d'un embryon de 5 à 7 jours ou obtenues artificiellement après transformation de cellules adultes, peuvent donner naissance à plus de 200 types cellulaires représentatifs de tous les tissus de l'organisme.
- Les **cellules souches totipotentes**, sont des cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé et sont capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme et les seules à permettre le développement complet d'un individu.

Les cellules souches sont caractérisées par un certain nombre de traits phénotypiques.

- **Cellule indifférenciée**

L'état indifférencié peut être caractérisé par des marqueurs de surface et par l'expression de facteurs de transcription qui en sont les garants. Les cellules ES, par exemple, expriment les facteurs de transcriptions STAT3, Oct3/4 et Nanog qui répriment l'engagement de ces cellules en préservant leur capacité différenciatrice au cours des générations [352]. Chez l'adulte, les HSC sont caractérisées par l'expression d'une combinaison de marqueurs de surface particuliers (CD45, CD34), ainsi que par l'expression des facteurs de transcription Bmi-1 et HOXB4, indispensables à l'auto-renouvellement de ces cellules [353].

- **Clonogénicité**

Elle consiste à montrer les capacités d'auto-renouvellement et de multipotence de cellules cultivées à l'état clonal et ainsi permet de définir le caractère "souche" comme inhérent à une seule cellule. Cette notion permet d'exclure, au sein d'une population cellulaire:

- une coopérativité cellulaire responsable du phénotype souche
- un mélange de cellules précurseur à l'origine de la multipotence.

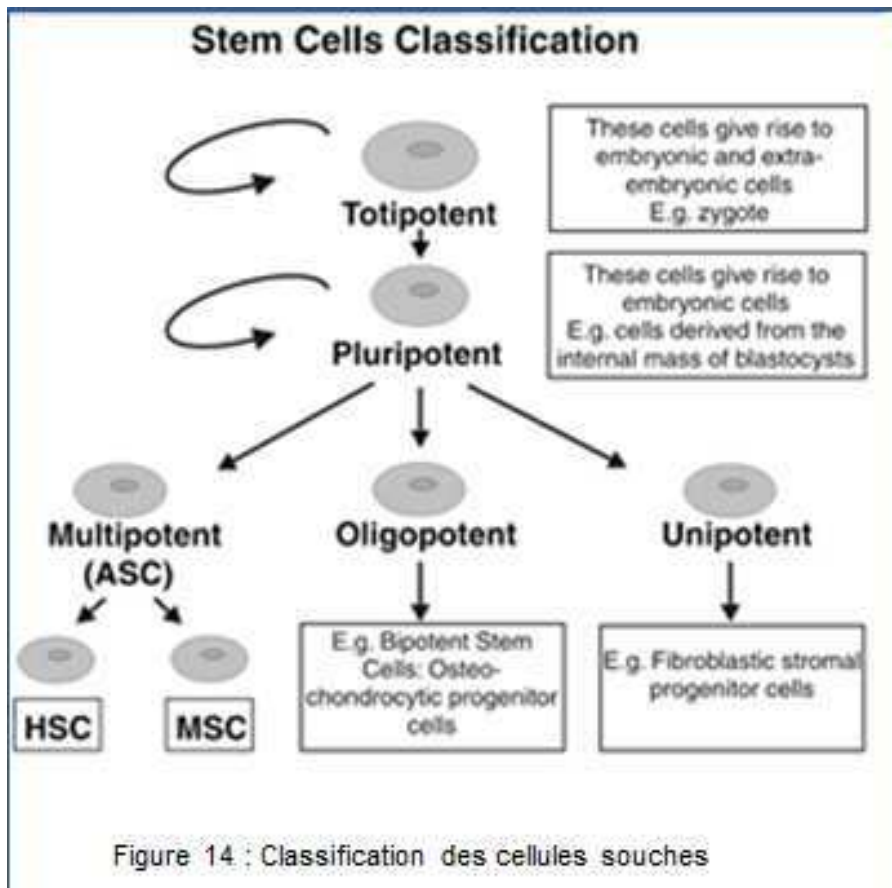
- **Auto-renouvellement**

L'auto-renouvellement définit la capacité des cellules souches à proliférer tout en maintenant au fil des générations leurs potentialités [354]. L'auto-renouvellement peut être symétrique ou asymétrique selon qu'il donne naissance à deux cellules filles souches (ex : cellules ES) ou à une cellule fille souche et une cellule engagée (ex: cellules satellites musculaires) [355,356].

- **Multipotence**

La multipotence est la capacité d'une cellule à acquérir plusieurs phénotypes différenciés selon les stimuli externes. Plusieurs modèles sont possibles: plasticité, trans-détermination et trans-différenciation. Une cellule "plastique" co-exprimerait plusieurs programmes de différenciation tandis que la trans-détermination caractérise le processus par lequel une cellule progénitrice déjà déterminée dans un lignage, acquiert le programme d'un autre lignage. La trans-différenciation caractérise le processus par lequel une cellule différenciée se transforme en une cellule différenciée d'un autre type cellulaire [357-359].

Les cellules souches adultes multipotentes ont été décrites dans différents tissus. Certaines ont été caractérisées ces dernières années dont les HSC et les MSC que ce soit dans la moelle osseuse, le système nerveux central, le foie (canal de Hering), le pancréas (îlots pancréatiques), la peau, le poumon, les muscles, le tissu adipeux, l'os trabéculaire, le tissu synovial... [360]. Du fait de leur capacité à pouvoir se différencier dans des cellules de différentes lignées de tissu conjonctif incluant l'os, le tissu adipeux, le cartilage, le ligament et le muscle, elles ont généré un vif intérêt de la communauté scientifique mais aussi des médias du fait de leur potentiel d'utilisation dans la réparation de tissus et d'organes [361 , 362 , 363].



## b. Cellules souches mésenchymateuses

De multiples tissus adultes contiennent des populations de cellules souches qui ont la capacité de se régénérer après des traumatismes, maladies ou tout simplement sous l'effet de l'âge. Ces cellules peuvent être retrouvées dans des tissus qui servent de réservoir. Par exemple, la moelle osseuse contient des cellules souches mésenchymateuses multipotentes qui contribuent à la régénération du tissu mésenchymateux tels que l'os, le cartilage, le muscle, le ligament, le tendon, le tissu adipeux... [364-367]. Ces cellules souches mésenchymateuses (MSC, Mesenchymal Stem Cells) constituent un outil de choix pour l'étude de l'engagement cellulaire vers les lignages adipocytaires, ostéoblastiques mais aussi chondrocytaires.

Classiquement obtenues à partir de la moelle osseuse mais au prix de prélèvements douloureux pour les patients, avec l'obtention d'un nombre limité de cellules à chaque prélèvement, elles présentent aussi une diminution de leur capacité proliférative au fil du temps cependant sans apparition d'anomalies

chromosomiques [368]. Le tissu adipeux est une source alternative d'obtention des MSC (lipoaspiration), elles sont ainsi obtenues de façon moins invasive et en plus grande quantité que lors des prélèvements de moelle osseuse. Il a été montré que les MSC originaires du tissu adipeux avaient des caractéristiques similaires à celles obtenues à partir de la moelle osseuse [369].

La différenciation chondrogénique des MSC nécessite l'utilisation de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs de croissance jouent le rôle le plus important dans ce processus. Ils représentent un groupe de polypeptides biologiquement actifs qui peuvent stimuler la prolifération cellulaire et la différenciation. Dans le cartilage hyalin, les facteurs de croissance régulent l'homéostasie et l'intégrité aussi bien que le développement [203]. Ainsi, les facteurs de croissance et les MSC représentent un outil prometteur pour la réparation et la régénération des tissus en médecine. Le tableau 7 liste les principaux facteurs de croissance et leur effet.

<b>Facteurs de croissance</b>	<b>Effets sur les MSC</b>	<b>référence</b>
<b>TGFβ1</b>	<b>Augmente la synthèse de la MEC et diminue l'expression du Col I</b>	[306, 370]
<b>TGFβ3</b>	<b>Augmentation synthèse MEC</b>	[371]
<b>BMP-2</b>	<b>Augmente la synthèse de la MEC, Diminue l' expression du Col I</b>	[306, 372]
<b>BMP-4</b>	<b>Accélère la progression de la différenciation cartilagineuse vers la maturation</b>	[373]
<b>BMP-7</b>	<b>Inhibe la prolifération cellulaire, Induit la différenciation chondrogénique,</b>	[374]



	A un effet additif sur la chondrogenèse avec TGF- $\beta$ 1 et IGF-1	
<b>GDF-5</b>	Augmente la production cartilagineuse de la MEC	[375]
<b>IGF-1</b>	Augmente la synthèse de la MEC, A un effet additif sur la chondrogenèse avec TGF- $\beta$ 1 et BMP-7	[376]
<b>FGF-2</b>	Augmente la prolifération, Augmente la production de protéoglycanes	[377]
<b>FGF-18</b>	Inhibe la prolifération cellulaire, Induit une différenciation chondrogénique	[378]

Tableau 7: Principaux facteurs de croissance et leurs effets. MEC :Matrice extra cellulaire; TGF $\beta$ :Transforming Growth Factor-Beta; BMP: Bone Morphogenetic Proteins;IGF: Insulin-like Growth Factor; FGF: Fibroblast Growth factor Family; GDF-5: Growth and Differentiation Factor-5

### c. Obtention et propriétés des cellules hMADS

Elles sont obtenues à partir de l'exérèse chirurgicale de tissu adipeux blanc en provenance de nouveau-nés ou d'enfants âgés de moins de 8 ans. Notre laboratoire a établi plusieurs cultures de MSC, dénommées cellules hMADS (human Multipotent Adipose tissue Derived Stems) [366,379].

Deux fractions cellulaires se distinguent après digestion du tissu adipeux par un traitement à la collagénase: la SVF (Stroma-Vascular-Fraction) et la fraction adipocytaire. Seule la SVF est mise en culture en présence de sérum et les cellules non-adhérentes sont éliminées après 15h d'incubation. Les cellules adhérentes sont

amplifiées. Les populations cellulaires résultantes, après analyse, présentent les propriétés caractéristiques des cellules souches :

- nombre de doublements de population élevé sans signe majeur de sénescence ou de transformation,
- caryotype diploïde à 2n chromosomes,
- signature moléculaire des MSC et "homogénéité" de la population étant donnée l'expression des marqueurs de surface évalués par FACS
- multipotence adipo-ostéo-chondrocytaire vérifiée à l'échelle clonale [380],
- présence de cellules souches au sein de la population capables d'auto-renouvellement, vérifiée à l'échelle clonale
- non-tumorigènes.

Les cellules hMADS sont multipotentes et se différencient notamment en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes. La différenciation chondrocytaire de ces cellules a été visualisée par coloration au bleu Alcian et reste à caractériser[380].

La caractérisation de la confirmation de la capacité chondrogénique des hMADS fait l'objet de la première partie fondamentale de ce travail de thèse et est d'autant plus d'intérêt que la moelle osseuse qui a déjà été largement utilisée comme source de cellules souches dans les modèles cellulaires d'arthrose présente des limites qui rendent attrayante l'utilisation de cellules dérivées du tissu adipeux. Cependant l'utilisation de ces dernières présente aussi certaines limites que n'ont pas les hMADS avec leur haute capacité d'auto-renouvellement *in vitro* ainsi que la capacité de se différencier en de nombreux types de cellules mésenchymateuses. Le potentiel pharmacologique de ces cellules pourrait être particulièrement intéressant dans l'arthrose. Ceci est aussi une partie de notre travail de recherche.

## L. Ocytocine

L'Ocytocine (OT) est une hormone synthétisée par les noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse sous la forme d'un nonapeptide cyclique qui possède un pont disulfure entre les cystéines des positions 1 et 6 (**Figure 15**). L'ocytocine n'est pas spécifique à

l'hypophyse puisqu'il est aujourd'hui admis que d'autres organes et types cellulaires peuvent l'exprimer. C'est le cas des gonades, de la prostate, du thymus, des glandes médullosurrénales et du cœur [381-386]. Le gène *Ot-neurophysine I* est composé de trois exons. Il code pour un pré-propeptide composé de 114 acides aminés possédant un peptide signal et un site de clivage protéolytique (GKR) [387] (**Figure 15**). Au cours de son transport axonal vers l'hypophyse, le pré-propeptide est clivé, libérant le nonapeptide OT et son transporteur, la neurophysine I [388]. Tous deux sont stockés dans des vésicules au niveau de l'hypophyse où ils attendent un influx nerveux pour être libérés dans la circulation sanguine.

Du point de vue structural l'OT est très proche de la vasopressine (VP), un autre nonapeptide sécrété par l'hypophyse. En effet, la séquence peptidique de ces deux molécules ne diffère que de deux acides aminés en position 3 et 8 (**Figure 15**). Le gène codant pour la VP est situé sur le même chromosome que celui de l'OT à 12 kb d'intervalle et il semblerait que ces deux gènes soient le fruit d'une duplication génique au cours de l'évolution [389]. Par analogie avec le gène *Ot-neurophysine I*, le gène *Vp-neurophysine II* code pour un pré-propeptide qui sera maturé, par clivage protéolytique, en VP et en son transporteur, la neurophysine II. Ces deux hormones, malgré leur structure très proche, produisent des effets très différents. En effet, la VP est une hormone initialement caractérisée pour ses effets vasopresseur et antidiurétique [390].

De multiples facteurs vont intervenir dans la régulation de l'expression de l'ocytocine [391,392].

L'ocytocine tout comme la leptine joue un rôle important dans la régulation de la nutrition. Il a été montré que des souris invalidées pour le gène de l'ocytocine développaient une obésité tardive [393-397].

Il y a quelques années, alors qu'il a été montré que l'ocytocine pouvait être retrouvée dans de nombreux tissus, il a été mis en évidence la présence de récepteurs à l'ocytocine dans les ostéoblastes et les ostéoclastes [398,399]. Par la suite il a été montré que l'injection intra musculaire d'ocytocine chez le rat entraînait une diminution des niveaux du calcium dans le sérum et de l'expression de (NF)- $\kappa$ B, une augmentation de l'ostéoprotégérine et une augmentation du remodelage osseux



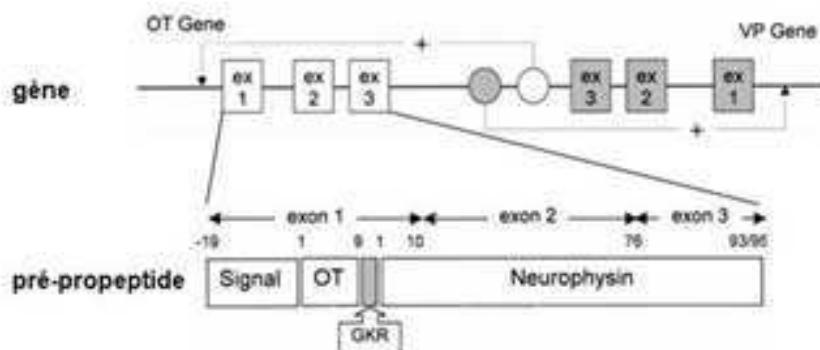


Figure 16: Structure des gènes de l'ocytocine et de la vasopressine. Les cercles représentent des séquences activatrices de l'expression d'OT en blanc et de la VP en gris. La partie inférieure de la figure représente la structure du pré- propeptide ocytocine incluant un peptide signal et un site de clivage protéolytique (GKR) qui sépare l'OT de la neurophysine. D'après Gimpl {Gimpl, 2001 #455}.

## M.Modèles d'arthrose expérimentale

Nos connaissances actuelles sur la physiopathologie de l'arthrose ainsi que la nécessité d'éprouver l'efficacité de nouvelles molécules justifient le besoin de disposer de modèles d'arthrose. L'arthrose ne peut se résumer à un modèle simplifié in vitro et nécessite le recours aux modèles expérimentaux chez l'animal.

En 1974, Bentley proposait différents critères pour définir un modèle d'arthrose expérimentale « idéal » :

Les lésions précoces et le mécanisme initiateur doivent être comparables à ceux décrits au cours de la pathologie humaine ;

Une déplétion de la matrice cartilagineuse en Protéoglycanes précède la fibrillation de la couche superficielle et l'atteinte des couches plus profondes ;

Une sclérose de l'os sous-chondral, une ostéophytose et une inflammation de la membrane synoviale caractérisent un stade avancé de la maladie ;

Ces modifications du cartilage doivent être facilement reproductibles et ne doivent pas être liées à un effet systémique ;

La méthode peut être appliquée à différentes articulations et à différentes espèces animales.

Un très grand nombre de modèles d'arthrose a été développé (**tableau 8**). Leur classification utilise en général la comparaison à l'étiologie de l'arthrose chez l'homme pour ce qu'il en est connu, à savoir une origine mécanique ou structurale, qui regroupe à la fois une atteinte des constituants du cartilage et une dérégulation du métabolisme chondrocytaire. L'existence de ces modèles d'arthrose expérimentale chez l'animal rend compte du grand nombre de facteurs étiologiques susceptibles de conduire au développement d'une atteinte dégénérative du cartilage articulaire [401].

Les modèles d'instabilité articulaire confirment les observations cliniques qui ont montré l'importance des facteurs mécaniques. Malformations congénitales, obésité, traumatismes répétés chez les sportifs ou encore la rupture des ligaments sont autant de manifestations qui ont été associées au développement précoce d'une arthrose. Ils produisent une instabilité articulaire et modifient la répartition des charges. Le terme « chirurgical » ou « mécanique » est utilisé pour ces modèles. La pathologie arthrosique peut aussi être induite par lésion méniscale, méniscectomie partielle ou totale, dissection du ligament collatéral médial et/ou latéral, section du ligament croisé antérieur ou postérieur [401].

Le modèle d'arthrose expérimentale obtenu par section du ligament croisé antérieur chez le rat est ainsi devenu le modèle de référence pour l'étude de la physiopathologie de l'arthrose ou des effets des traitements. Cette méthode décrite dès 1973 par Pond, génère des symptômes beaucoup plus sévères que la méniscectomie tels que la claudication, probablement due à l'instabilité en résultant.

De nombreuses études ont été réalisées en utilisant ce modèle, avec cependant des résultats hétérogènes pour ce qui est de la progression de la maladie arthrosique [402].

Chez le rat, ce modèle est bien établi et reproductible. Après la section, la fibrillation du cartilage apparaît dans les 4 semaines et la plupart des animaux développent une ulcération de toute l'épaisseur dans les 8 à 12 semaines [402-404]. La section partielle du ligament croisé antérieur cause des lésions arthrosiques de stade intermédiaire. Les lésions étant plus modérées qu'avec une section complète et bien entendu plus importante que chez les rats « sham ». Ce qui montre bien que l'importance de l'instabilité induite est le principal déterminant de la dégradation du cartilage [402].

Une combinaison de sections des ligaments croisés antérieur et postérieur et d'une transection du ligament collatéral médial a aussi été utilisée, se traduisant malgré l'importance du traumatisme engendré par une moindre importance des ostéophytes voire l'absence de lésions même à 12 semaines. Il a été avancé, que ces lésions traumatiques importantes pouvaient induire une réponse inflammatoire importante, une raideur de l'articulation avec une limitation de la mobilité se traduisant par une moindre progression des lésions arthrosiques [402].

L'ovariectomie est un autre modèle dont le substratum repose sur les résultats d'études récentes montrant qu'un déficit en œstrogènes chez les femmes post-ménopausiques est corrélé à une augmentation du risque d'arthrose [405]. Chez le rat, l'ovariectomie conduit au développement de lésions arthrosiques modérées 9 semaines après la chirurgie. Cette procédure a aussi été décrite chez le cochon d'Inde, la souris, le lapin, le porc, le mouton et le singe *Cynomolgus*. En raison de la mauvaise compréhension du mécanisme physiopathologique ce modèle n'est pas recommandé pour les tests thérapeutiques.

D'autres modèles ont été développés, Certains chimiques tel celui développé chez la souris et obtenu par l'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne qui crée un modèle d'arthrose par instabilité articulaire, sans la nécessité d'un geste opératoire [406]. L'action de la collagénase porte sur les structures constituées de collagène de type I, telles que les tendons, les ligaments et les ménisques. Elle

conduit au développement de lésions dégénératives sévères du cartilage des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux, associées à une dislocation de la rotule, à une sclérose de l'os souschondral et à la formation d'ostéophytes.

Le modèle d'injection intra-articulaire d'une enzyme protéolytique, la papaïne, permet la dégradation directe du cartilage. En modifiant les propriétés mécaniques et les relations cellule/matrice, la dérégulation du métabolisme chondrocytaire aboutit au développement de l'arthrose.

L'injection intra-articulaire de Mono-Iodo-Acétate (MIA), qui induit une modification du métabolisme chondrocytaire et donc une altération des capacités de synthèse de la MEC, est un autre modèle d'arthrose expérimentale. Cet agent a la capacité d'inhiber certaines enzymes de la glycolyse [407]. Les chondrocytes étant dépendants d'un métabolisme anaérobie, l'injection intra-articulaire de MIA provoque une diminution des taux d'ATP intracellulaires et une souffrance des cellules, aboutissant à une diminution du nombre de chondrocytes et à des lésions histologiques et morphologiques similaires à celles rencontrées dans l'arthrose chez l'homme. De façon intéressante, ces lésions s'accompagnent de larges ostéophytes, ce qui est une opportunité pour l'étude des mécanismes de formation de ces derniers [408]. Mais c'est surtout dans les recherches conduites sur la douleur que ce modèle s'est montré particulièrement intéressant. L'injection intra articulaire du MIA entraînant une augmentation de la sensibilité nerveuse avec douleurs spontanées, hyperalgies et allodynies, de façon dose dépendante [409].

Il n'existe pas malheureusement de modèle animal idéal, le modèle idéal devrait avoir des articulations semblables aux articulations de l'homme pour ce qui est de la taille, de la structure, du mécanisme de survenue des lésions du cartilage et de leur progression. Le choix du modèle dépendra donc de l'objectif de l'expérimentation. S'il s'agit de l'exploration de la douleur on choisira plutôt le modèle MIA. Les études thérapeutiques en revanche feront plutôt appel aux modèles chirurgicaux. Cela reste théorique et en fait il n'existe pas actuellement de réel consensus quant au type de modèle à utiliser dans une situation particulière [401].

Type de modèle	Caractéristiques/Avantages	Utilisation	Désavantages
Chirurgical	Arthrose de progression	Evaluation de	Non approprié aux études



	rapide Sévérité des lésions Reproductibilité Induction d'arthroses traumatiques	thérapeutiques Etude des lésions arthrosiques et des stades évolutifs	pathogéniques
Chimique	Rapidité de la progression arthrosique Moins invasif Facilité de mise en œuvre	Evaluation de thérapeutiques Etude des lésions arthrosiques et des stades évolutifs	Pas de corrélation avec la pathogénie des lésions arthrosiques chez l'homme
Arthrose naturelle	Pas d'intervention	Etudes pathogéniques	Lenteur du développement de la maladie  Variabilité des manifestations de la maladie (comme chez l'homme)  Cout élevé
Génétique	Intervention génomique	Etudes génétiques de l'arthrose	Production d'anomalies additionnelles du cartilage ou délétions embryoniques léthales  Cout élevé

Tableau 8 : Spécificités des principaux modèles animaux dans l'arthrose

## II. RESULTATS

### A. Epidémiologie de l'arthrose des membres inférieurs

#### a) Hypothèse de travail

L'arthrose est une cause de morbidité majeure dans les pays développés dont la population est vieillissante. Sa fréquence ne va faire que croître dans les années à venir avec le vieillissement attendu de la population de ces mêmes pays [35, 36]. Les études portant sur la prévalence en population générale de cette maladie sont peu nombreuses et comportent souvent des biais méthodologiques notamment de recrutement qui en rendent l'interprétation difficile.

En France, aucune étude ne s'était intéressée à la prévalence de l'arthrose des membres inférieurs en population générale. Disposant d'une méthodologie déjà validée dans les rhumatismes inflammatoires avec l'étude EPIRHUM et garantissant une bonne représentativité, nous avons cherché à valider dans l'arthrose cette même méthodologie pour connaître la prévalence de l'arthrose des membres inférieurs (hanche et genou) dans deux départements français (Bretagne et Alpes Maritimes). J'ai été l'investigateur principal de ce projet qui a obtenu la promotion par le CHU de Nice au titre d'un contrat d'incitation à la recherche. Il s'agissait d'une étape préliminaire à la réalisation d'une étude de prévalence de l'arthrose des membres inférieurs en population générale nationale qui devait permettre de constituer une cohorte de cas prévalents d'arthrose des membres inférieurs (cohorte KHOALA) [51, 52] .

**b) Manuscrit 1**

# Screening for hip and knee osteoarthritis in the general population: predictive value of a questionnaire and prevalence estimates

C H Roux,<sup>1</sup> A Sarau,<sup>2</sup> B Mazieres,<sup>3</sup> J Pouchot,<sup>4</sup> J Morvan,<sup>2</sup> B Fautrel,<sup>5</sup> J Testa,<sup>6</sup> P Fardellone,<sup>7</sup> A C Rat,<sup>8</sup> J Coste,<sup>9</sup> F Guillemin,<sup>8</sup> L Euler-Ziegler,<sup>1</sup> on behalf of the KHOALA Osteoarthritis Group

<sup>1</sup> Rheumatology Department, CHU Nice, Nice, France; <sup>2</sup> Unit of Rheumatology, Hôpital de la Cavale Blanche, CHU Brest, France; <sup>3</sup> Rheumatology Department, Hospital Larrey, CHU Toulouse, France; <sup>4</sup> Department of Internal Medicine, Hôpital européen Georges Pompidou, Université Paris Descartes, Paris, France; <sup>5</sup> Rheumatology Department, CHU Paris, Paris, France; <sup>6</sup> Statistical Department, CHU Nice, Nice, France; <sup>7</sup> Rheumatology Department, CHU Amiens, Amiens, France; <sup>8</sup> Inserm CIC-EC, Nancy University, University Hospital, Nancy, France; <sup>9</sup> Statistical Department, CHU Cochin, Paris, France

Correspondence to:  
Dr C H Roux, Hospital l'Archet 1,  
Rheumatology Department, 242  
Route de Saint Antoine de  
Ginestiere, 06200 Nice, France;  
[roux101fr@yahoo.fr](mailto:roux101fr@yahoo.fr)

Accepted 17 November 2007  
Published Online First  
12 December 2007

## ABSTRACT

**Objective:** To study the feasibility and validity of a two-step telephone screening procedure for symptomatic knee and hip osteoarthritis (OA) in the general population.

**Method:** The screening questionnaire was based on signs and symptoms, previous diagnosis of OA and validated OA criteria. A random sample of telephone numbers was obtained and, at each number, one person aged 40–75 years was included. A physical examination and knee or hip radiographs were offered when the screen was positive. A sample of subjects with negative screens was also examined. The diagnosis of hip/knee OA was based on the American College of Rheumatology criteria for signs and symptoms and Kellgren–Lawrence radiographic stage 2 or greater. Prevalence rates were estimated with correction for the performance of the screening procedure.

**Results:** Of 1380 subjects, 479 had positive screens, among whom 109 were evaluated; symptomatic radiographic OA was found in 50 subjects, at the knee ( $n = 35$ ) or hip ( $n = 20$ ). Corrected prevalence estimates of symptomatic OA were 7.6% (6.4%–8.8%) for the knee and 5% (3.9%–6.1%) for the hip. The screening procedure had 87% (95% CI 79% to 95%) sensitivity and 92% (95% CI 91% to 93%) specificity for detecting knee OA and respectively 93% (95% CI 86% to 100%) and 93% (95% CI 92% to 94%) for hip OA.

**Conclusion:** This study establishes the feasibility of telephone screening for symptomatic knee/hip OA, which could be used for a nationwide prevalence study. Pain and previous OA diagnosis were the best items for detecting symptomatic OA.

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent joint disease world wide and creates a massive economic burden.<sup>1</sup> There is a paucity of data on the epidemiology of knee and hip OA in North America and Europe.<sup>2–9</sup> Recently, the Dutch Institute for Public Health produced data on the prevalence of radiological OA with pain in the Dutch population<sup>9</sup>: 2.5% for men and 5% for women for hip OA and 3.9% for men and 9.9% for women for knee OA. Another recent Greek study showed a symptomatic knee and hip OA prevalence of 6% and 0.9%, respectively.<sup>8</sup> Epidemiological data are not available for France. Furthermore, a corollary to the rapid ageing of the population in many industrialised countries is a sharp rise in the prevalence of OA, which limits the validity of earlier epidemiological studies. Accurate prevalence estimates are needed to evaluate the

costs of OA and the healthcare needs generated by the disease, knowledge of which is crucial to optimisation of resource allocation.

Prevalence estimates differ widely according to whether only moderate and severe radiographic changes are considered or mild abnormalities are also included. Moreover, several definitions of OA have been used in prevalence studies. Radiographic criteria are the most widely used<sup>4 5 10–12</sup> but hold little interest in terms of public health, as radiographic abnormalities may be asymptomatic. The use of clinical criteria probably leads to overestimation of the prevalence of OA.<sup>2 3 5</sup> The best method consists in combining radiographic and clinical criteria,<sup>5 8 10 13–17</sup> which is more challenging and more costly than using either set of criteria alone.

Implementation of the clinical and radiological investigations that are needed to confirm OA is complex and difficult to consider on a large scale in studies designed to obtain population-based prevalence estimates.<sup>18</sup> Screening using a specifically designed questionnaire is less costly and easier to perform. The goal of a screening questionnaire is to select a group of people in whom further investigations will yield a high rate of OA diagnoses (high specificity), without missing a substantial number of patients with OA (high sensitivity). Self-administered questionnaires designed for OA screening have shown inadequate sensitivity and specificity.<sup>18</sup>

Previously, we successfully developed a two-step telephone procedure for estimating the prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies in France.<sup>19–21</sup> Here, our objective was to examine the feasibility and validity of a two-step telephone screening procedure designed to estimate the prevalence of symptomatic hip and knee OA in a population-based sample.

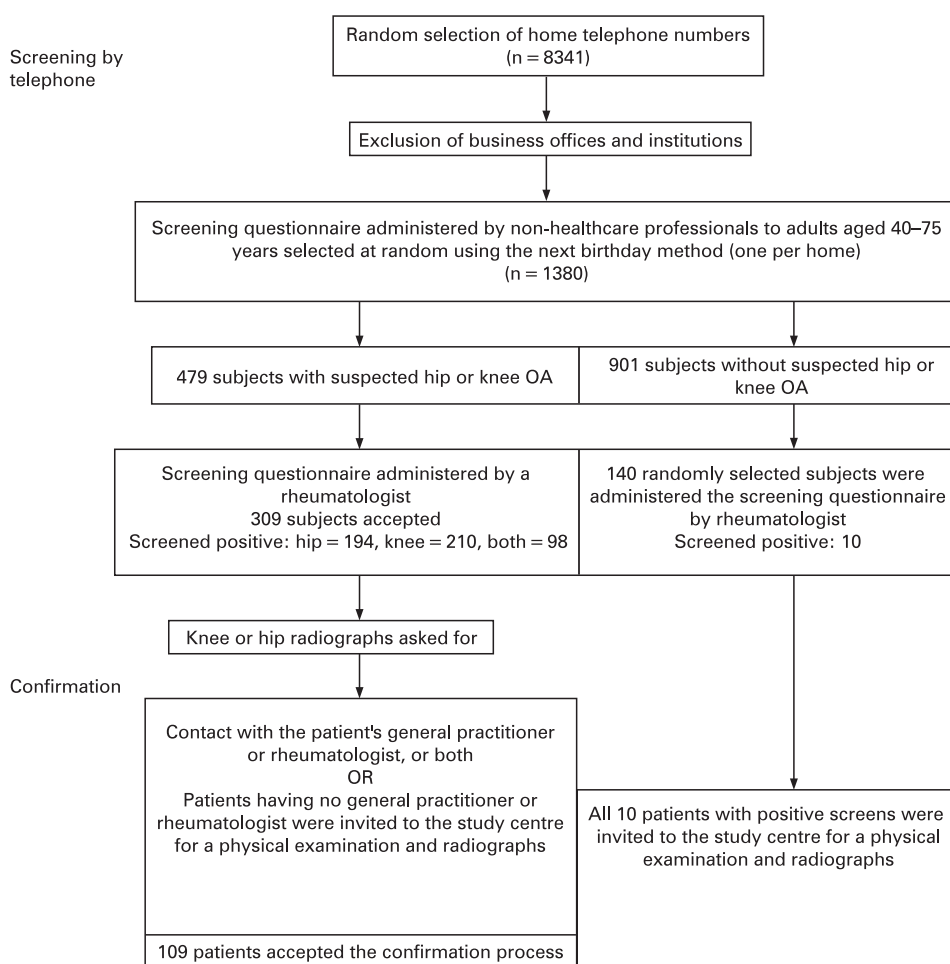
## POPULATION AND METHODS

### Design

A pilot two-step survey was conducted in two geographical areas in France (Alpes Maritimes and Bretagne) (fig 1). The survey involved telephone interviews followed by confirmation testing in subjects with suspected OA.

### Sampling

Assuming a 10% prevalence of symptomatic hip and knee OA in the general population aged 40–75 years, 1400 subjects were required to obtain 5%

**Figure 1** Screening procedure and case ascertainment. OA, osteoarthritis.

precision. Home phone numbers were taken at random from national phone company lists in the two selected geographical areas. Phone numbers of business offices and institutions were not used. At each number, a person aged 40–75 years was selected at random using the next birthday method<sup>22</sup> and invited to participate in the study.

### Ethical considerations

The study was carried out according to the Declaration of Helsinki and good clinical practice guidelines. The study protocol was approved by local institutional review boards and the independent ethics committees of Nice (France). Written informed consent was obtained from all patients who underwent investigations.

### Screening questionnaire

The questionnaire evaluated signs and symptoms of knee/hip OA, American College of Rheumatology (ACR) criteria for OA,<sup>23, 24</sup> and whether the patient had a diagnosis of OA confirmed by a doctor. It was designed to be easily administered over the telephone by a trained interviewer who was not a health professional. To evaluate feasibility and make final improvements, preliminary testing of the questionnaire was performed in a small panel of healthy volunteers and patients with OA.

The questionnaire time frame was the past 4 weeks. The questionnaire comprised four items about the hip and four about the knee (box 1).

### Screening and confirmation procedures

Screening (fig 1) comprised a telephone questionnaire administered by a non-healthcare professional. People who gave a positive reply to one or more items were interviewed again, by a rheumatologist, who used the same questionnaire but was not told which item or items were positive during the first interview.

Among subjects whose first screen was negative, a random sample was taken. People in this sample were interviewed over the telephone by a rheumatologist, who sought to confirm the absence of symptomatic hip or knee OA. Based on the results of this second interview, the person was either classified as free of OA or invited to undergo confirmation testing.

For each respondent with a positive screen, a rheumatologist contacted the general practitioner (GP) or rheumatologist for confirmation of the diagnosis. The GP or rheumatologist then examined the patient and obtained radiographs and erythrocyte sedimentation rate if not done previously to confirm the diagnosis. Respondents with positive screens who had no GP or rheumatologist were invited to the study centre (in each geographical area) for a physical examination and radiography. The diagnosis of hip/knee OA was based on “combined clinical and radiographic” ACR criteria<sup>23, 24</sup> (table 1) and on a radiographic Kellgren–Lawrence stage of  $\geq 2$ <sup>25</sup> in at least one knee or hip.

### Radiographs

Radiographs of the target joint(s) were obtained in all subjects who had a positive screening questionnaire. When one or more

## Extended report

**Box 1 Questionnaire administered first by a non-healthcare professional interviewer then by a rheumatologist****Questions about the hip**

- ▶ During the past 4 weeks, have you had hip pain (groin or upper thigh) on most days?
- ▶ During the past 4 weeks, have you had hip pain while climbing down stairs or walking down slopes?
- ▶ During the past 4 weeks, have you noticed any limitation in the range of motion of one or both hips?
- ▶ Do you have hip osteoarthritis (OA)? (If you do, was the diagnosis made by a rheumatologist or a general practitioner?)

**Questions about the knee**

- ▶ During the past 4 weeks, have you had knee pain on most days?
- ▶ During the past 4 weeks, have you had knee pain while climbing down stairs or walking down slopes?
- ▶ During the past 4 weeks, have you had swelling in one or both knees?
- ▶ Do you have knee OA? (If you do, was the diagnosis made by a rheumatologist or a general practitioner?)

knee items were positive, the weightbearing posteroanterior semiflexed view and lateral view were obtained. In subjects with one or more positive hip items, an anteroposterior view of the pelvis and Lequesne's "false profile" view were obtained. All films were sent to a single reader (BM) for scoring using the Kellgren–Lawrence method,<sup>25</sup> which distinguishes five stages (from stage 0: normal x rays of the hip/knee, to stage 4: advanced hip/knee OA).

**Statistical analysis**

The following sociodemographic and radiographic data were analysed: age, sex, number of subjects in the household, occupation and radiographic stage.

Various diagnostic criteria for OA were used to compute positive predictive values (PPVs) of the screening questionnaire directly from the data collected by the non-healthcare professional interviewer. The negative predictive value (NPV) was estimated from the sample of 140 subjects with negative screens. For both PPV and NPV, 95% CIs were computed.

Sensitivity and specificity of the screening questionnaire could not be computed directly from the data, because not all subjects with negative screens were evaluated. We computed direct estimates using the data from the random sample of subjects with negative screens who were evaluated,<sup>26</sup> as well as corrected estimates taking verification bias into account.<sup>27</sup>

Prevalence estimates for radiographic symptomatic OA of the knee and hip were computed, with correction for sampling fractions, and their 95% CIs were determined. Subjects who underwent confirmation testing were considered to represent a random sample of those with positive and negative screens. Therefore, the corrected prevalence estimate was computed by taking into account the number of subjects with positive screens who underwent confirmation testing, the total number of subjects with negative screens and among them the number who underwent confirmation testing, the numbers of true and false positives and the sample size.<sup>28 29</sup>

**Table 1** American College of Rheumatology Criteria for classification of hip and knee idiopathic osteoarthritis.<sup>22 23</sup>

Knee	Hip
Clinical and radiographic knee pain	Combined clinical and radiographic hip pain
and at least 1 of 3:	and
Age >50 years	Femoral and/or acetabular osteophytes on radiograph
Stiffness <30 minutes	Or
Crepitus	ESR ≤20 mm/1st h
and	and
Osteophytes	Axial joint space narrowing on radiograph

ESR, erythrocyte sedimentation rate.

**RESULTS****Screening results**

In 2005, 8341 phone numbers in the Alpes Maritimes (n = 4645) and Bretagne (n = 3696) regions of France were called by non-healthcare professionals. Of the 4879 calls that were answered, 1380 resulted in the random identification of a person aged 40–75 years, based on the next birthday method, who agreed to participate to the study (20% refused to participate, 30% were out of the age range and 21.7% were false telephone numbers). Among these 1380 subjects, 479 (211 in Alpes-Maritimes and 268 in Bretagne) had a positive screen for symptomatic knee or hip OA; mean age 58.3 years and 68% of the group were women. Among these 479 subjects, 309 (65%) accepted screening by a rheumatologist, which was positive in 306 subjects, for knee OA in 210, hip OA in 194 and both in 98.

Among these 306 subjects, because of loss to follow-up 109 only underwent confirmation testing. Sixty-nine patients showed OA (40 knees and 36 hips) with a Kellgren–Lawrence grade of ≥1; 50 patients (20 hips and 35 knees) showed a grade of ≥2. Fifty four per cent of this subjects had had a prior OA diagnosis made by a GP or a rheumatologist. No differences were found between the two geographical areas. Up to 2 months elapsed between the two screens.

Of the 901 subjects who had negative findings from the screen performed by the non-healthcare professional, 140 were selected at random and screened by a rheumatologist. The screen was positive in 10 subjects, who underwent confirmation testing. The radiographs confirmed the diagnosis of symptomatic OA in two of these subjects.

We compared the patients who were lost to the study either between the first and the second telephone screens or between the second screen and confirmation testing and the patients who completed the study procedures. No differences were found in age (p = 0.08) or sex (p = 0.9).

**Performance of the full screening procedure**

The two-step screening procedure had 87% sensitivity (95% CI 79% to 95%) and 92% specificity (95% CI 91% to 93%) for detecting knee OA. For detecting hip OA, sensitivity was 93% (95% CI 86% to 100%) and specificity was 93% (95% CI 92% to 94%).

Of the 1380 subjects interviewed by non-healthcare professionals, 1311 (95%) answered all eight questionnaire items. At least one item yielded a positive answer in 479 subjects, with no difference between the two geographical areas. Among 109 subjects who underwent confirmation process, 73 had a positive item for knee OA and 53 for hip OA. Screening by a rheumatologist was positive for knee OA in 70 (70/73, 95.9%)

**Table 2** Positive and negative predictive value of the screening procedure

Screening procedure	ACR criteria (clinical and radiological)	
	PPV (%) (95% CI)	NPV (%) (95% CI)
Hip	56 (43 to 68)	99 (95 to 100)
Knee	51 (39 to 62)	98 (94 to 100)

ACR, American College of Rheumatology; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

patients and for hip OA in 51 (51/53, 96.2%) patients detected "positive" by non-healthcare professional screening.

The NPV of the full screening procedure was 99% for the hip and 98% for the knee. The PPV of the full screening procedure was 56% for hip and 51% for knee (table 2).

The PPV of screening by non-healthcare professionals was 46% for hip OA and 62% for knee OA. The item with the highest PPV was a previous diagnosis of OA (78% for knee OA and 61% for hip OA). PPVs were lowest for knee swelling (58%) and hip pain (50%).

Age had no influence on performance characteristics ( $p=0.18$ ). A previous diagnosis of OA was significantly associated with radiographic scores of 3 or 4, both at the hip ( $p=0.002$ ) and at the knee ( $p=0.01$ ).

The PPV of screening by rheumatologists was 47% for hip OA and 65% for knee OA. The item with the highest PPV was a previous diagnosis of knee OA (86%) and the item with the lowest PPV was hip pain (45%) in the screening by rheumatologists.

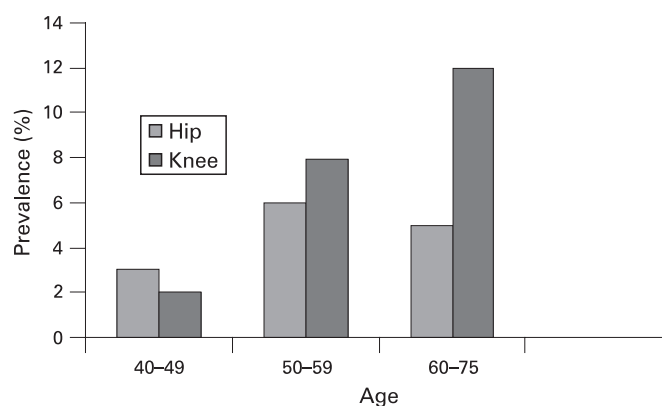
### Prevalence estimates of knee and hip OA

Corrected prevalence estimates for symptomatic OA in the general population were 9% (95% CI 7.7% to 10.3%) for knee OA and 9% (95% CI 7.8% to 10.2%) for hip OA. These estimates were computed using a Kellgren–Lawrence score of  $\geq 1$  to define OA. When we used a radiographic score of  $\geq 2$  to define OA, corrected prevalence estimates were 7.6% (95% CI 6.4% to 8.8%) for knee OA and 5% (95% CI 3.9% to 6.1%) for hip OA. Figure 2 shows the distribution of knee and hip OA cases by age group.

### DISCUSSION

We developed and tested a two-step procedure for identifying cases of symptomatic hip and knee OA in the general population. Our results show that cases of symptomatic hip and knee OA can be detected using a limited set of items including a self-reported diagnosis of OA, symptoms and ACR classification criteria.<sup>23, 24</sup> We have successfully used the same method to screen for rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies.<sup>19, 20</sup>

Screening instruments for knee or hip OA have performed poorly, particularly when used in single-step procedures.<sup>18</sup> The validity in the general population and in primary-care settings of questionnaires based only on ACR clinical criteria has been challenged.<sup>30–33</sup> ACR criteria were not designed as epidemiological tools, although they are often as such. Their usefulness depends on the objective being pursued.<sup>23</sup> In epidemiological studies of OA, clinical ACR criteria may underestimate disease prevalence. They are as insensitive for use in community, though specific, an opinion expressed by several authors. Their performance seems linked to disease severity.<sup>14, 33</sup> Furthermore, restricting the definition of symptomatic radiographic OA to subjects with current symptoms excludes those with radiographic abnormalities but intermittent symptoms. The most important feature may be persistent pain accompanied by

**Figure 2** Hip and knee osteoarthritis prevalences by age.

functional impairment during a defined period. The choice of the time frame used to assess knee pain may affect the results of prevalence estimates for symptomatic knee OA. The time frame varied across studies (6 weeks,<sup>13</sup> 1 month<sup>11, 34</sup>) and current knee pain in other studies. We used a questionnaire on symptoms over the past 4 weeks and previous diagnosis, according to a two-step procedure with confirmation testing. This procedure allowed us to detect hip and knee OA, while ruling out specific inflammatory diseases and other non-articular causes of knee and hip symptoms.

It has been shown that minor changes in item content can modify prevalence estimates.<sup>33</sup> The wording of our questionnaire items has been widely used to estimate the prevalence of symptomatic knee or hip OA.<sup>11, 35, 36</sup> Knee pain was the single feature most strongly associated with the presence of definite radiological osteophytes in our study and in earlier work.<sup>37</sup> Hip pain, however, was not associated with osteophytes in our study, possibly because many patients have difficulty recognising hip pain as such. We specified the main locations of hip pain (groin or upper thigh), in keeping with earlier studies such as the SOF (Study of Osteoporotic Fractures) and the NHANES I.<sup>12, 34</sup>

Sensitivity of ACR clinical criteria for knee OA is 95% and specificity is 69%.<sup>23</sup> ACR criteria for hip OA are clinical, biological and radiological; they have 89% sensitivity and 91% specificity.<sup>24</sup> Knee pain in subjects older than 50 years is nearly always caused by OA, whereas hip pain may reflect many other conditions.

Ideally, a screening tool should be both sensitive, so that few cases are missed (whether for clinical trials or healthcare planning) and specific, so that few of the confirmation tests are unnecessary. Our goal was to develop a screening procedure that was suitable for large populations and did not require an initial examination by a doctor. Sensitivity and specificity of our screening questionnaire are satisfactory and better than those of previously reported clinical questionnaires.<sup>18, 38</sup>

Our study establishes that trained non-healthcare professionals can reliably administer our screening questionnaire. Of 309 subjects interviewed by rheumatologists, 306 had a positive screen (96.2% for knee OA and 95.9% for hip OA). Thus, rheumatologist screening could be omitted, which would substantially reduce the cost of screening. To improve the sensitivity of our questionnaire, we considered that a single positive item was sufficient to classify a person as having a positive screen. Of the 140 subjects with negative screens administered by non-healthcare professionals, only 10 (7.1%) had a positive rheumatologist-administered screen and of those 10 only 2 (2/140, 1.4%) had OA by confirmation testing. Other

## Extended report

reports also found high concordance rates between trained metrologists and rheumatologists.<sup>38–41</sup>

Our questionnaire had only eight items. Although a larger number of items might improve performance, a brief questionnaire is more likely to be accepted by the interviewee. Therefore, we discarded several of the items related to knee/hip pain and activities that were used in major OA studies. The excellent PPVs obtained with our questionnaire support this decision.

A potential limitation of our approach to screening for symptomatic OA is that, in addition to OA, several other conditions may cause local or referred knee or hip pain. Therefore, some of the subjects classified as having symptomatic OA in our study may in fact have had asymptomatic radiographic OA and pain due to another condition. These false positive cases would result in overestimation of the PPV of our questionnaire. This limitation is shared by similar reported studies. To limit its impact, we used an item about previous diagnosis of OA and we performed physical examinations in subjects who underwent radiographs. Another limitation of our study is that 35% of subjects with a positive screen administered by non-healthcare professionals failed to undergo the rheumatologist interview. Up to 2 months elapsed between the two screens in our study. Shortening this interval to 2 weeks might reduce the attrition rate. However, our results strongly suggest that the rheumatologist screen may be unnecessary. Several subjects were lost to follow-up between screening and confirmation steps with possible under- or overestimations of OA prevalence rates linked to possible selection of patients with knee/hip symptoms. But the statistical method used shows that losses to follow-up patients are not different from others. The absence of differences in sex and age between the two groups reinforces this hypothesis.

Whereas many studies report raw prevalence estimates, we computed corrected estimates that took into account the performance of the screening procedure. Methodological and age distribution differences complicate comparisons with earlier works. However, our results for knee OA are similar to those obtained in NHANES III<sup>15</sup>; neither study included patellofemoral OA. Prevalence estimates vary depending on whether Kellgren–Lawrence scores of 1 or 2 are included in the definition of OA. A clear and preferably standardised definition of OA is a prerequisite for comparisons of estimates across studies. To limit potential difficulties in differentiating Kellgren–Lawrence scores of 1 and 2 at the knee, radiographs should be read by experienced doctors using a standardised procedure.

The use of a questionnaire alone to identify subjects with knee OA for epidemiological surveys or clinical trials seems unrealistic.<sup>18</sup> A physical examination and radiographs are needed for the definite diagnosis.

This pilot study shows that a two-step procedure is effective and feasible for identifying cases of symptomatic knee or hip OA. This approach is less costly than routine evaluations by a doctor. Furthermore, our results provide the first prevalence estimates for symptomatic hip and knee OA in two French regions. Finally, it yields valuable information for estimating the size of population-based samples needed to evaluate the nationwide prevalence of hip and knee OA. It is the tool used for the 3000 OA study which is currently taking place in France.

**Acknowledgements:** The data presented in this paper are part of a project conducted under the auspices of the Scientific Committee for the 3000 Osteoarthritis Study Group and supported by grants from the Nice University Hospital, Nancy University Hospital, the Scientific Board, the Epidemiology Committee and the Quality of Life Group of the French Society of Rheumatology, INSERM and pharmaceutical

firms (Almiral, Genevrier, Grünenthal, Negma-Lerads, Pfizer, Pierre Fabre, Sanofi-Aventis). This survey was conducted with the active collaboration of the following investigators and interviewers: V Bouzerau (Nice); N Le Duff and G Beguin (Brest).

**Funding:** This survey was supported by the Nice University Hospital, Nice, France.

**Competing interests:** None.

**Ethics approval:** Approved by local institutional review boards and the independent ethics committees of Nice, France.

## REFERENCES

1. **Reginster JY.** The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;**41**(Suppl 1):3–6.
2. **Salaffi F, de Angelis R, Grassi W.** On behalf of Marche Pain Prevalence Investigation Group (MAPPING) Study. Prevalence of musculoskeletal conditions in an Italian population sample: results of a regional community-based study. The MAPPING study. *Clin Exp Rheumatol* 2005;**23**:819–28.
3. **Mannoni A, Briganti MP, Di Bari M, Ferrucci L, Costanzo S, Semi U, et al.** Epidemiological profile of symptomatic osteoarthritis in older adults: a population based study in Dicomano, Italy. *Ann Rheum Dis* 2003;**62**:576–8.
4. **van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA.** Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 1989;**48**:271–80.
5. **Bagge E, Bjelle A, Eden S, Svanborg A.** Osteoarthritis in the elderly: clinical and radiological findings in 79 and 85 year olds. *Ann Rheum Dis* 1991;**50**:535–9.
6. **Jacobsson L, Lindgarde F, Manthorpe R.** The commonest rheumatic complaints of over six weeks' duration in a twelve-month period in a defined Swedish population. Prevalences and relationships. *Scand J Rheumatol* 1989;**18**:353–60.
7. **van Schaaardenburg D, Van den Brande KJ, Ligthart GJ, Breedveld FC, Hazes JM.** Musculoskeletal disorders and disability in persons aged 85 and over: a community survey. *Ann Rheum Dis* 1994;**53**:807–11.
8. **Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, Aslanidis SI, Georgountzos AI, Kaziolas GO, et al.** The ESORDIG Study Group. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol* 2006;**33**:2507–13.
9. **RIVM.** *Nationale Kompas Volksgezondheid*. Available at [http://www.rivm.nl/vtv/object\\_document/o1778n18371.html](http://www.rivm.nl/vtv/object_document/o1778n18371.html) (accessed 18 July 2008).
10. **Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al.** Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;**41**:778–99.
11. **Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meeman RF.** The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. *Arthritis Rheum* 1987;**30**:914–8.
12. **Nevitt MC, Lane NE, Scott JC, Hochberg MC, Pressman AR, Genant HK, et al.** Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum* 1995;**38**:907–16.
13. **Dillon CF, Rasch EK, Gu Q, Hirsch R.** Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the third national health and nutrition examination survey 1991–94. *J Rheumatol* 2006;**33**:2271–9.
14. **Jordan J, Luta G, Renner J, Dragomir A, Hochberg M, Fryer J.** Knee pain and knee osteoarthritis severity in self-reported task specific disability: The Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* 1997;**24**:1344–9.
15. **Chou CT, Pei L, Chang DM, Lee CF, Schumacher HR, Liang MH.** Prevalence of rheumatic diseases in Taiwan: a population study of urban, suburban, rural differences. *J Rheumatol* 1994;**21**:302–6.
16. **Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, Aliabadi P, Yu W, Qin M, et al.** Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: the Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:2065–71.
17. **Nevitt MC, Xu L, Zhang Y, Lui LY, Yu W, Lane NE, et al.** Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:1773–9.
18. **La Valley M, McAlindon TE, Evans S, Chaisson CE, Felson DT.** Problems in the development and validation of questionnaire-based screening instruments for ascertaining cases with symptomatic knee osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:1105–13.
19. **Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al.** Prevalence of rheumatoid arthritis in France—2001. *Ann Rheum Dis* 2005;**64**:1427–30.
20. **Saraux A, Guillemin F, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al.** Prevalence of spondylarthropathies in France—2001. *Ann Rheum Dis* 2005;**64**:1431–5.
21. **Guillemin F, Saraux A, Fardellone P, Guggenbuhl P, Behier JM, Coste J.** Epidemiology Committee of the French Society of Rheumatology. Detection of cases of inflammatory rheumatic disorders: performance of a telephone questionnaire designed for use by patient interviewers. *Ann Rheum Dis* 2003;**62**:957–63.
22. **Salmon CT, Nichols JS.** The next-birthday method of respondent selection. *Public Opinion Quarterly* 1983;**47**:270–6.
23. **Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al.** Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986;**29**:1039–49.
24. **Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al.** The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1991;**34**:505–14.



25. **Kellgren JH**, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1957;**16**:494–501.
26. **Begg CB**, Greenes RA. Assessment of diagnostic tests when disease verification is subject to selection bias. *Biometrics* 1983;**39**:207–15.
27. **Harel O**, Zhou XH. Multiple imputation for correcting verification bias. *Stat Med* 2007;**26**:3057–77.
28. **Levy PS**, Lemeshow S. Selected topics in sample design and estimation methodology. In: Groves RM, Kalton G, Rao JNK, *et al*, eds. *Sampling of populations. Methods and applications*. Chichester: Wiley, 1999:425–53.
29. **Pickels A**, Dunn G. Prevalence of disease, estimation from screening data. In: Gail MH, Benichou J, eds. *Encyclopedia of epidemiologic methods*. Chichester: Wiley, 2000:3484–90.
30. **Schouten JS**, Valkenburg HA. Classification criteria: methodological considerations and results from a 12 year following study in the general population. *J Rheumatol Suppl* 1995;**43**:44–5.
31. **Bierma-Zeinstra S**, Bohnen A, Ginai A, Prins A, Verhaar J. Validity of American College of Rheumatology criteria for diagnosing hip osteoarthritis in primary care research. *J Rheumatol* 1999;**26**:1129–33.
32. **Peat G**, Thomas E, Duncan R, Wood L, Hay E, Croft P. Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Ann Rheum Dis* 2006;**65**:1363–7.
33. **O'Reilly SC**, Muir KR, Doherty M. Screening for pain in knee osteoarthritis: which question? *Ann Rheum Dis* 1996;**55**:931–3.
34. **Anderson JJ**, Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol* 1988;**128**:179–89.
35. **Felson DT**, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman RN, Aliabadi P, *et al*. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1995;**38**:1500–5.
36. **National Center for Health Statistics**. *Basic data on arthritis knee, hip, and sacroiliac joints in adults ages 25–74 years. United States, 1971–1975*. Rockville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1979. (Vital and health statistics. Series 11, no 213) (DHEW publications no (PHS) 79-1661).
37. **Spector TD**, Hart DJ, Byrne J, Harris PA, Dacre JE, Doyle DV. Definition of osteoarthritis of the knee for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis* 1993;**9**:790–4.
38. **March LM**, Schwarz JM, Carrae BH, Bagge E. Clinical validation of self-reported osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;**6**:87–93.
39. **Hart DJ**, Spector TD, Brown P, Wilson P, Doyle DV, Silman AJ. Clinical signs of early osteoarthritis: reproducibility and relation to x ray changes in 541 women in the general population. *Ann Rheum Dis* 1991;**50**:467–70.
40. **Lethbridge-Cejku M**, Scott WW Jr, Reichle R, Ettinger WH, Zonderman A, Costa P, *et al*. Association of radiographic features of osteoarthritis of the knee with knee pain: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Arthritis Care Res* 1995;**8**:182–8.
41. **Cushnaghan J**, Cooper C, Dieppe P, Kirwan J, McAlindon T, McCrae F. Clinical assessment of osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 1990;**49**:768–70.

### BMJ Masterclasses

BMJ Masterclasses are educational meetings designed specifically to meet the learning needs of doctors. They help doctors keep up to date with the latest evidence and recent guidelines in major clinical areas, enabling them to use the latest evidence to make better decisions. The latest evidence, recent guidelines and best practice are delivered in an interactive and informative manner by leading experts. The speakers are specifically chosen as highly-skilled communicators who can authoritatively enthuse the audience and interpret the latest research and guidelines into practical tips for busy doctors. BMJ Masterclasses have proved a huge hit with clinicians, with many saying they have influenced their clinical practice.

<http://masterclasses.bmj.com/>

**BMJ**  
**masterclasses**  
Putting the latest evidence based medicine into practice



## Screening for hip and knee osteoarthritis in the general population: predictive value of a questionnaire and prevalence estimates

C H Roux, A Saraux, B Mazieres, et al.

*Ann Rheum Dis* 2008 67: 1406-1411 originally published online December 12, 2007  
doi: 10.1136/ard.2007.075952

---

Updated information and services can be found at:  
<http://ard.bmj.com/content/67/10/1406.full.html>

- 
- References** *These include:*  
This article cites 37 articles, 16 of which can be accessed free at:  
<http://ard.bmj.com/content/67/10/1406.full.html#ref-list-1>
- Article cited in:  
<http://ard.bmj.com/content/67/10/1406.full.html#related-urls>
- Email alerting service** Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

- 
- Topic Collections** Articles on similar topics can be found in the following collections
- [Epidemiology](#) (1073 articles)
  - [Degenerative joint disease](#) (3599 articles)
  - [Musculoskeletal syndromes](#) (3857 articles)
  - [Osteoarthritis](#) (743 articles)
  - [Clinical diagnostic tests](#) (1020 articles)
  - [Pain \(neurology\)](#) (737 articles)
  - [Radiology](#) (910 articles)
  - [Radiology \(diagnostics\)](#) (639 articles)

---

### Notes

---

To request permissions go to:  
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:  
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:  
<http://group.bmj.com/subscribe/>

## a) Discussion

Une bonne connaissance épidémiologique de la pathologie est nécessaire pour une meilleure compréhension de celle-ci. Elle est également indispensable pour mettre en place des politiques de santé adaptées, ce qui est d'autant plus crucial dans l'arthrose depuis qu'elle est devenue une priorité de santé publique en France. Ce sont ces données épidémiologiques qui vont permettre d'étudier les facteurs de risques de la maladie et donc permettre une meilleure connaissance de cette dernière et une meilleure prise en charge. Notre étude s'est intéressée à la population générale de deux départements français que sont la Bretagne et les Alpes maritimes. 8341 foyers ont été contactés par téléphone après tirage au sort sur les listings de France Telecom, pour garantir la meilleure représentativité possible, un deuxième tirage au sort a été effectué au sein même du ménage. Parmi eux 1380 sujets âgés de 45 à 80 ans ont répondu. Ainsi 479 ont été screenés positivement dont 109 ont pu être évalués. 55 présentaient une arthrose radiologique symptomatique dont 35 pour le genou et 20 pour la hanche. La prévalence était de 7,6% (6,4%–8,8%) pour le genou et 5% (3,9%–6,1%) pour la hanche. Cette étude a permis d'évaluer les propriétés intrinsèques du questionnaire de détection. Ce dernier présente une sensibilité de 87% (95% CI 79% à 95%) et une spécificité de 92% (95% CI 91% à 93%) pour la détection d'une arthrose symptomatique de genou et une sensibilité de 93% (95% CI 86% à 100%) et une spécificité de 93% (95% CI 92% à 94%) pour la hanche.

Cette étude qui a apporté les premiers résultats de prévalence de l'arthrose radiologique symptomatique en population générale française a représenté l'étape indispensable à la réalisation d'une étude de prévalence nationale [51]. Elle a permis de tester en population générale les questionnaires de détection ainsi qu'une méthodologie déjà employée et validée dans les rhumatismes inflammatoires [410]. L'étude de prévalence nationale a permis par la suite de constituer une cohorte (KHOALA) de cas prévalents représentatifs de la population générale d'arthrose symptomatique des membres inférieurs [52]. Il s'agit de la seule cohorte de cas prévalents d'arthrose de hanche et de genou au niveau national et international (centres participants : Amiens, Brest, Nancy, Nice, Paris, Toulouse). Elle est actuellement à sa cinquième année de suivi. La cohorte KHOALA bénéficie de

nombreux soutiens institutionnels dont la SFR, l'INSERM et le CHU de Nancy mais aussi industriels. Son conseil scientifique est composé de : Coste J, Euller-Ziegler L, Fardellone P, Fautrel B, Guillemin F, Mazieres B, Pouchot J, Saraux A, Rat AC, Roux CH.

## A. Schuss

### a) Hypothèse de travail

De nombreuses méthodes d'imagerie sont à notre disposition dans l'arthrose du genou (échographie, scanner, IRM et radiographie). Cependant la radiographie conventionnelle est généralement considérée comme la méthode la plus appropriée et la plus accessible pour le diagnostic de la gonarthrose [12 , 411]et pour évaluer la progression de la destruction du cartilage par l'intermédiaire de la mesure du pincement articulaire.

Dans les différentes études publiées, la mesure de la progression de l'arthrose du genou a généralement été réalisée sur des radiographies de genoux de face en extension (clichés antéro-postérieurs)[412]. Les différentes études portant notamment sur les chondroprotecteurs présentent des résultats hétérogènes, en terme d'action sur la progression du pincement articulaire. Ceci étant probablement lié à des différences dans les méthodes de lecture radiologique et dans les méthodes de réalisation des radiographies (problème de reproductibilité) malgré des tentatives de standardisation des procédures. La mesure du pincement fémoro-tibial étant dépendante de nombreuses variables dont le degré de flexion, de charge, la rotation du genou et l'alignement du plateau tibial [25,413,414].

Une position radio-anatomique claire et reproductible est nécessaire pour pouvoir évaluer le degré d'atteinte de l'articulation et pour pouvoir évaluer la progression du pincement dans des études prospectives [414]. Il a été montré que lorsque la position anatomique était rigoureusement standardisée, l'épaisseur de l'interligne au point le plus pincé restait le paramètre le plus déterminant pour évaluer la progression de l'arthrose [415]. Cependant, lorsque les radiographies sont réalisées

en des sites différents et ce malgré une lecture centralisée une certaine hétérogénéité apparaît dans la qualité de la réalisation. Cela pose le problème de disposer d'une technique permettant de limiter cette hétérogénéité.

Il a été montré que la réalisation de radiographies en flexion permettait de mieux mettre en évidence les lésions arthrosiques et notamment le pincement fémoro-tibial [25].

Le Lyon Schuss, qui est une variante du Schuss traditionnel, semble pouvoir apporter un gain en terme de reproductibilité pour la mesure du pincement articulaire ainsi qu'une meilleure sensibilité au changement par rapport aux clichés en extension [415].

L'hétérogénéité relative en termes de qualité et de possibilité d'interprétation et le coût des clichés en extension réalisés en pratique courante fait poser la question de leur utilité notamment dans une étude de prévalence.

Le but de ce travail est de démontrer que la démarche qui consiste à réaliser une radiographie du genou en Schuss n'est pas moins sensible pour détecter une arthrose fémoro-tibiale que la réalisation de deux clichés conjoints (Schuss et cliché en extension).

## **a) Manuscrit 2 (en cours de finalisation)**

Titre : Comparaison de la valeur diagnostique du cliché en Schuss seul versus l'association Schuss + Face en extension pour le diagnostic de la gonarthrose fémoro-tibiale dans l'étude de prévalence précédant la cohorte Khoala.

### **Introduction:**

Malgré le développement récent de nouvelles techniques d'imagerie les radiographies restent l'outil de référence pour le diagnostic et le suivi d'une gonarthrose.

L'association systématique pour l'exploration d'une arthrose du genou d'un cliché de face et d'un cliché avec degré de flexion constant reste le bilan de référence.

L'objectif de notre étude est de comparer l'apport diagnostique de l'association de ces deux clichés par rapport au Schuss seul.

### **Matériel et méthodes :**

Notre étude a porté sur les 3707 sujets âgés de 40 à 75 ans qui ont participé à l'étude de prévalence nationale ayant permis la constitution de la cohorte Khoala. Pour obtenir une homogénéité de sévérité de la gonarthrose (stade 0 à 4), nous avons inclus dans la présente étude les premiers participants quel que soit leur stade de Kellgren et Lawrence (KL).

Une lecture anonymisée des clichés de Face en extension et de Schuss a été réalisée par un rhumatologue expert (BM). L'analyse a porté sur la comparaison des stades de KL ( $KL \geq 2$ ) pour chaque genou mais aussi sur la détection des ostéophytes (par localisation Condyle Interne (CI), Externe (CE), Plateau Tibial Interne (PTI) ou Externe (PTE) classés de 0 à 3), pincement (de 0 à 4) et condensation osseuse (CI, CE, PTI, PTE).

Le nombre de sujets nécessaires (300) a été calculé pour mettre en évidence une différence de positivité des clichés de 0.05 pour une fréquence d'arthrose moyenne de 30%, une corrélation (phi) entre les résultats des clichés égale à 0.80 avec une puissance de 80 et un risque  $\alpha$  de 5%.

## Résultats:

stades KL	Face en extension seul		Schuss seul (issu lecture simultanée)	
	GD n (%)	GG n(%)	GD n(%)	GG n (%)
0	142 (47)	158 (52)	96 (32)	98 (33)
1	69 (23)	78 (26)	101 (34)	123 (41)
2	52 (17)	32 (11)	42 (14)	32 (11)
3	30 (10)	28 (9)	38 (13)	28 (9)
4	8 (3)	7 (2)	22 (7)	18 (6)
<b>Pincement</b>				
0	204 (69)	196 (65)	111 (37)	139 (46)
1	75 (25)	76 (25)	118 (40)	104 (35)
2	12 (4)	17 (6)	31 (10)	25 (8)
3	1 (0.)	5 (2)	18 (6)	15 (5)
4	5 (2)	6 (2)	20 (7)	18 (6)
<b>Ostéophytes CI</b>				
0	271 (91)	266 (88)	212 (71)	222 (74)
1	22 (7)	23(8)	59 (20)	54 (18)
2	6 (2)	12 (4)	28 (9)	24 (8)
3	0	0	0	1 (0.)
<b>Ostéophytes CE</b>				
0	279 (93)	279 (93)	229 (77)	242 (81)
1	18 (6)	18 (6)	52 (17)	45 (15)
2	3 (1)	4 (1)	17 (6)	12 (4)
3	0	0	1 (0.)	1 (0.)
<b>Ostéophytes PTI</b>				
0	224 (75)	228 (76)	157 (53)	184 (61)
1	60 (20)	58 (19)	101 (34)	81 (27)
2	15 (5)	14 (5)	39 (13)	36 (12)
3	1 (.0)	1 (0.)	1 (0.)	0
<b>Ostéophytes PTE</b>				
0	248 (83)	252 (84)	194 (65)	217 (73)
1	41 (14)	40 (13)	81 (27)	62 (21)
2	7 (2)	9 (3)	22 (7)	19 (6)
3	2 (1)	9 (3)	2 (1)	1 (0.)

Figure 1: Description des stades de KL, pincement, ostéophytes en fonction du type de cliché et par genou.

stades KL	Face en extension seule		P	Schuss seul (issu lecture simultanée)		P
	GD % (n)	GG % (n)		GD % (n)	GG % (n)	
KL ≥ 2	30 (90)	22 (67)	0.0001	34 (102)	26 (78)	0.001
<b>Ostéophytes:</b>						
<b>CI</b>	2 (6)	4 (12)	0.0001	9 (28)	8 (24)	0.03
<b>CE</b>	1 (3)	1 (4)	0.0006	6 (18)	4 (11)	0.05
<b>PTI</b>	5 (16)	5 (14)	0.0001	13 (40)	12 (36)	0.0012
<b>PTE</b>	3 (9)	3 (9)	0.005	8 (24)	6 (19)	0.06
<b>Pincement</b>	6 (18)	9 (27)	0.0001	66 (22)	19 (56)	0.0002

Figure 2: Comparaison des stades KL ainsi que du pincement, et des ostéophytes entre les clichés de face en extension et les clichés en Schuss seuls. Résultats portant sur les condensations osseuses non significatifs (NS) et non montrés.

KL	Face en extension + Schuss		Schuss (lecture 2 ans)		p
	GD % (n)	GG % (n)	GD % (n)	GG % (n)	
KL ≥ 2	34 (105)	27 (82)	25 (76)	19 (59)	0.0001
ostéophytes					
CI	12 (35)	11 (34)	11 (33)	12 (35)	NS
CE	6 (18)	5 (15)	8 (24)	6 (17)	NS
PTI	15 (46)	15.5 (47)	16 (49)	13 (40)	NS
PTE	10 (31)	9 (28)	10 (31)	8 (23)	NS
Pincement	23 (70)	24 (71)	23 (71)	18 (55)	NS

Figure 3: Comparaison entre clichés de face en extension associé au Schuss et le Schuss seul pour ce qui est des stades de KL ainsi que du pincement et des ostéophytes en fonction de leur localisation.

### Discussion :

Pour la classification de KL nos résultats montrent une supériorité modeste de l'association par rapport au cliché en Schuss seul. Il n'y a en revanche pas de différences pour le pincement tout comme pour les ostéophytes qui sont un point clé important du diagnostic de l'arthrose. La condensation est un élément de la gonarthrose de moindre intérêt pour le diagnostic. L'absence de différence pour les ostéophytes met bien en évidence la problématique du KL notamment pour les stades 1 et 2. L'association des deux clichés semble augmenter le nombre de stade 1 au détriment des stades 0. L'obésité semble être un facteur à prendre en compte pour la lecture du Schuss, ce qui confirme les données de la littérature.



**Conclusion :**

Notre étude ne montre pas de différence pour la détection d'ostéophytes et d'un pincement fémoro tibial entre l'association cliché de face debout antéropostérieur et Schuss par rapport au cliché en Schuss seul. Le Schuss en augmentant le nombre des stades 0 aux dépens des stades 1 (dit incertains) est probablement un outil plus spécifique. Au vu de ces résultats, pour la détection d'une arthrose fémoro-tibiale, le cliché en Schuss seul paraît suffisant en pratique courante. Ce qui doit être pris en considération compte tenu du coût des clichés et de l'irradiation en résultant. Chez les obèses, l'association de clichés de Face et en Schuss semble préférable.

### **c) Discussion**

La radiographie conventionnelle reste ancrée dans nos pratiques comme l'examen de référence pour le diagnostic de la gonarthrose. L'IRM malgré ses plus grandes sensibilité et spécificité notamment pour détecter des lésions cartilagineuses ne peut être envisagée comme un examen de première intention compte tenu de son prix, de son accessibilité difficile et de la complexité de son interprétation bien qu'elle permette d'analyser les différents tissus constituant l'articulation. L'association clichés de face en flexion (Schuss) et de face en extension reste le protocole de référence pour le diagnostic de la gonarthrose. De nombreux rhumatologues, depuis de nombreuses années avaient intégré dans leur pratique la réalisation d'un Schuss seul en lieu et place de l'association compte tenu du surcote de celle-ci et de son irradiation plus importante, et aussi de l'impression d'un apport limité du cliché en extension. Notre travail confirme effectivement que le Schuss seul pourrait être suffisant pour le diagnostic de gonarthrose en pratique courante, avec une possible limitation chez l'obèse. En revanche, pour les études cliniques, l'association devra être conseillée puisque le Schuss a plutôt tendance à diminuer le nombre de KL étiquetés stades 1 au profit des stades 0 et donc d'être ainsi moins discriminant. A une époque où l'économie de la santé devient une préoccupation de premier plan, l'intérêt de ces résultats ne peut en être que renforcé. Ce travail a fait l'objet de deux présentations sous forme de poster lors du congrès de la Société Française de Rhumatologie en décembre 2013.

## **B. Caractérisation d'un modèle reproductible de chondrogenèse à partir d'une lignée de cellules souches humaines du tissu adipeux**

### **b) Hypothèse de travail**

De multiples tissus adultes contiennent des populations de cellules souches qui ont la capacité de se régénérer après des traumatismes, maladies ou tout simplement sous l'effet de l'âge. Ces cellules peuvent être retrouvées dans des tissus qui servent de réservoir. Par exemple, la moelle osseuse contient des cellules souches mésenchymateuses multipotentes qui contribuent à la régénération de tissu mésenchymateux tels que l'os, le cartilage, le muscle, le ligament, le tendon, le tissu adipeux... [364-367]. Ces cellules souches mésenchymateuses (MSC, Mesenchymal Stem Cells) constituent un outil de choix pour l'étude de l'engagement cellulaire vers différents lignages notamment adipocytaires, ostéoblastiques mais aussi chondrocytaires. Outre cet intérêt, elles permettent aussi d'étudier l'effet de traitements spécifiques.

Classiquement obtenues à partir de la moelle osseuse mais au prix de prélèvements douloureux pour les patients, avec l'obtention d'un nombre limité de cellules à chaque prélèvement, elles présentent aussi une diminution de leur capacité proliférative au fil du temps cependant sans apparition d'anomalies chromosomiques [368].

Une alternative étudiée est celle de l'obtention de chondrocytes lors d'arthroscopies sur cartilage sain. Elle comporte plusieurs difficultés. Celle de faire une arthroscopie sur un genou normal, mais aussi la perte rapide des caractéristiques morphologiques et biologiques des chondrocytes [416].

Ainsi, trouver d'autres sources de cellules souches facilement exploitables et présentant des capacités de différenciation chondrogénique stable reste un important

challenge d'autant que ces dernières années ont vu fleurir des travaux portant sur l'opportunité d'utiliser ces cellules dans la réparation de cartilage.

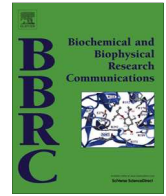
Le tissu adipeux est une source alternative d'obtention des MSC (lipoaspiration), elles sont ainsi obtenues de façon moins invasive et en plus grande quantité que lors des prélèvements de moelle osseuse. Il a été montré que les MSC originaires du tissu adipeux pouvaient se différencier en plusieurs types cellulaires dont le chondrocyte et avaient des caractéristiques similaires à celles obtenues à partir de la moelle osseuse [222, 369].

Le potentiel de ces cellules est très attractif d'autant plus que le tissu adipeux est abondant et la procédure d'obtention est peu invasive [417]. Cependant, leur durée de vie limitée, le petit nombre de cellules obtenues après prélèvement et la faible capacité de ces cellules à supporter les procédures de congélation- décongélation limite leur utilisation. De plus, elles vont nécessiter pour obtenir une chondrogenèse satisfaisante l'adjonction de facteurs de croissance tels que TGF $\beta$ , BMP ou encore IGF [216].

Récemment, notre laboratoire a isolé à partir de tissu adipeux blanc obtenu par exérèse chirurgicale et provenant de nouveau-nés ou d'enfants âgés de moins de 8 ans les cellules "human Multipotent Adipose-Derived Stem" (hMADS) [366, 379]. Ces cellules ont une haute capacité d'auto-renouvellement *in vitro* ainsi que la capacité de se différencier en de nombreux types de cellules mésenchymateuses dont les ostéoblastes, et les adipocytes [379, 380]. De plus, elles ont la capacité de maintenir leur propriété après les procédures de congélation/décongélation [366, 379].

Dans cette étude, nous avons caractérisé le potentiel chondrogénique des cellules hMADS en le comparant à celui des cellules mésenchymateuses originaires de la moelle osseuse à travers l'étude de l'expression des marqueurs majeurs de la chondrogenèse. Pour montrer leur potentiel en tant qu'outil pharmacologique, nous avons testé l'effet de l'IL-1 et de la nicotine sur la chondrogenèse.

a) **Manuscrit 3**



## Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: A powerful pharmacological tool



Christian Roux<sup>a,b,c,d</sup>, Didier F. Pisani<sup>a,b,c</sup>, Hédi Ben Yahia<sup>a,b,c</sup>, Mansour Djedaini<sup>a,b,c</sup>, Guillaume E. Beranger<sup>a,b,c</sup>, Jean-Claude Chambard<sup>a,b,c</sup>, Damien Ambrosetti<sup>f</sup>, Jean-François Michiels<sup>e,f</sup>, Véronique Breuil<sup>d</sup>, Gérard Ailhaud<sup>a,b,c</sup>, Liana Euller-Ziegler<sup>d</sup>, Ez-Zoubir Amri<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> University Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France

<sup>b</sup> CNRS, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France

<sup>c</sup> Inserm, iBV, U1091, 06100 Nice, France

<sup>d</sup> Service de Rhumatologie, Hospital l'Archet 1 CHU, 06200 Nice, France

<sup>e</sup> University of Nice Sophia Antipolis, UFR Médecine, Nice F-06189, France

<sup>f</sup> Anatomopathology Service, Pasteur Hospital, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 September 2013

Available online 14 October 2013

#### Keywords:

Chondrocyte  
hMADS  
hBM-MSC  
Differentiation

### ABSTRACT

Chondrogenesis has been widely investigated *in vitro* using bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) or primary chondrocytes. However, their use raises some issues partially circumvented by the availability of Adipose tissue-derived MSCs. Herein; we characterized the chondrogenic potential of human Multipotent Adipose-Derived Stem (hMADS) cells, and their potential use as pharmacological tool. hMADS cells are able to synthesize matrix proteins including COMP, Aggrecan and type II Collagen. Furthermore, hMADS cells express BMP receptors in a similar manner to BM-MSC, and BMP6 treatment of differentiated cells prevents expression of the hypertrophic marker type X Collagen. We tested whether IL-1 $\beta$  and nicotine could impact chondrocyte differentiation. As expected, IL-1 $\beta$  induced ADAMTS-4 gene expression and modulated negatively chondrogenesis while these effects were reverted in the presence of the IL-1 receptor antagonist. Nicotine, at concentrations similar to those observed in blood of smokers, exhibited a dose dependent increase of Aggrecan expression, suggesting an unexpected protective effect of the drug under these conditions. Therefore, hMADS cells represent a valuable tool for the analysis of *in vitro* chondrocyte differentiation and to screen for potentially interesting pharmacological drugs.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Increase of life span is accompanied by an increase of age-related diseases including osteoarthritis. It is the most common cause of rheumatic complaints and is characterized by extensive remodeling of subchondral bone and permanent destruction of articular cartilage leading to joint pain [1]. Development of cellular models is of great interest to decipher differentiation mechanisms and to screen for drugs. Human mesenchymal stem cells (hMSCs), originally isolated from bone marrow (BM-MSC), are multipotent adult stem cells. They are able to differentiate into various cell types, such as osteoblasts, adipocytes and chondrocytes, with the ability to undergo extensive self-renewal *in vitro* [2].

Even though the plasticity of adult stem cells is frequently debated [3], spontaneous *in vitro* chondrogenic differentiation [4] or differentiation in the presence of growth factors such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), bone morphogenetic proteins (BMPs) or insulin-like growth factor-1 (IGF-1) has been reported [5]. Unfortunately, the use of BM-MSCs has some limitations associated with patient discomfort and the pain of bone marrow harvesting. Furthermore, the self-renewal capacity of BM-MSCs is low and can only be passaged *in vitro* for a limited number of times before senescence and growth arrest [6]. Alternatively, chondrocytes obtained arthroscopically from healthy articular cartilage lose rapidly their morphological and biochemical characteristics [7]. Therefore, finding other sources of easily accessible cells which exhibit stable chondrogenic differentiation capacities represent an important goal.

It has been shown that adipose tissue-derived stem cells (ATSC) obtained from either lipoaspirate or lipectomy can differentiate into various cells types, including chondrocytes [8]. The potential

\* Corresponding author at: iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis, Tour Pasteur, UFR Médecine, 28, Avenue de Valombrose, 06189 Nice, France. Fax: +33 493 81 70 58.

E-mail address: [amri@unice.fr](mailto:amri@unice.fr) (E.-Z. Amri).

of using these cells is attractive as subcutaneous fat is abundant and the procedure to obtain samples is minimally invasive for the patients [9]. However, the limited life span (2–3 weeks), the limited amount of cells obtained after isolation from individuals, and the inability of the cells to withstand freezing/thawing, represent important drawbacks for a routine use. In addition, while BM-MSCs produced BMP-2, 4 and 6 endogenously, ATSC showed rarely expression of these BMPs and required the presence of exogenous BMPs for their differentiation [10].

Recently, human Multipotent Adipose-Derived Stem (hMADS) cells have been isolated and characterized from adipose tissue of young donors and can be maintained *ex vivo* using an original procedure [11–13]. hMADS cells display extensive self-renewal capacity *in vitro*, exhibit a normal diploid karyotype and maintain the capacity to undergo differentiation into many mesenchymal cell types, including chondrocytes [12–14]. hMADS cells are able to freeze/thawing procedure with no loss of multipotency properties [12–13].

In this study, we have characterized the chondrogenic potential of hMADS cells compared to that of BM-MSCs based on the expression of various markers, i.e. Aggrecan, COMP, type I and X Collagens (Col I, Col X) as well as specific staining of the extracellular matrix. Furthermore, as hMADS cells were responsive to drugs known to affect cartilage degradation, i.e. IL-1 $\beta$  and nicotine, they represent a valuable pharmacological tool for drug screening.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Cell culture media, serum, buffers, and trypsin were purchased from Lonza (Verviers, Belgium), other cell culture reagents were from Sigma–Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). BMP6, IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 3 were purchased from Peprotech (France).

### 2.2. Cell culture

The establishment and characterization of the multipotency of hMADS cells have been extensively described [13–14]. Briefly, these cells, isolated from white adipose tissue removed from surgical scraps of infants undergoing surgery, did not enter senescence while exhibiting a diploid karyotype, were non-transformed though expressing significant telomerase activity, did not show any chromosomal abnormalities after 140 population doublings, and maintained their differentiation properties after 160–200 population doublings [13–14]. hMADS cells were able to withstand freeze/thaw procedures and their differentiation could be directed under different culture conditions into various lineages [12–13]. In the experiments reported herein, hMADS cells established from male infant were used between passages 15 and 30 corresponding to 35–80 population doublings. hBM-MSC were purchased from Cambrex (Paris, France) and used as recommended by the manufacturer.

Cultures were performed either as mono-layer (2D) or as three dimensional (3D) pellets. For 2D analysis, hBM-MSC or hMADS cells were seeded, in 12 multi-well plates, at a density of  $25 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/low glucose (1.5 g/l), supplemented with 10% FCS, 15 mM HEPES, 2.5 ng/ml hFGF-2, 60  $\mu$ g/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin defined as growth medium. hFGF-2 was removed when cell reached confluence. At day 2 post-confluence (designated day 0), cells were induced to differentiate in the presence of DMEM/high glucose (4.5 g/l) supplemented with 500  $\mu$ M ascorbic acid, 10  $\mu$ g/ml insulin, 5.5  $\mu$ g/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, 1 mM sodium pyruvate, 40  $\mu$ g/ml L-proline, 100 nM dexamethasone and 10 ng/

ml TGF- $\beta$ 3 (defined as differentiation medium). When indicated, BMP6 was added at 10 ng/ml.

For 3D analysis, hMADS cells were seeded at  $5 \times 10^5$  cells per 15-ml polypropylene tube and centrifuged 5 min at 1000 rpm. The resulting cell pellet was maintained in growth medium for 3 days and chondrogenesis was induced in the differentiation medium described above. The tube's lid was left open to allow gas exchange. The cells were then treated or not with BMP6.

IL-1 $\beta$ , anti-IL1 $\beta$ R and nicotine were added at the indicated doses for the indicated periods. The media were changed every 3 days and analyzed at the indicated days.

### 2.3. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

These procedures follow MIQE recommendations [15]. Total RNA was extracted using TRI-Reagent kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's instructions. Quality control for purity and integrity of RNA were tested by UV spectrophotometry on a NanoDrop 1000 device and by SYBR Gold-stained agarose analysis (Invitrogen). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT) was conducted as described previously [16–17]. Primer sequences, designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), are listed in [Supplementary Table 1](#) and were tested for their specificity, efficiency, reproducibility and dynamic range. For quantitative PCR (qPCR), final reaction volume was 10  $\mu$ l using SYBR qPCR premix Ex TaqII from Takara (Ozyme) and assays were run on a StepOne Plus ABI real-time PCR machine (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston). The expression of selected genes was normalized to that of TATA-box binding protein (TBP) and 36B4 housekeeping genes and quantified using the comparative- $\Delta\Delta C_t$  method.

### 2.4. Histological analysis and immunohistochemistry

Cell pellets were fixed in phosphate buffered formaldehyde, then dehydrated through a series of ethanol concentrations, cleared with xylene, embedded in paraffin and 5  $\mu$ m sections were prepared. For histological examination, the sections were stained using Haematoxylin–Erythrosine–Safran (HES) for morphology analysis and alcian blue for proteoglycan detection. Indirect immunostaining assay was performed as described previously [18] using rabbit anti-type II $\alpha$  Collagen antibodies (Millipore, France).

### 2.5. Statistical analysis

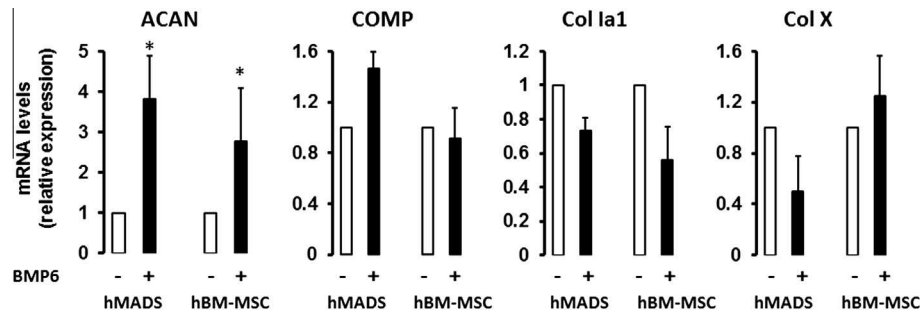
Data are expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean (sem) and are analyzed using the 2-tailed student's *t* test. Differences were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Analysis of hBM-MSCs and hMADS cells chondrogenesis

Chondrogenic differentiation of hBM-MSCs and hMADS was evaluated by qRT-PCR based on the expression of chondrogenic markers including Aggrecan (ACAN), Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), alpha chain of type I Collagen (Col 1a1) and type X Collagen (Col X).

Cell culture in mono-layer (2D) was performed in the presence of growth factors that are known to induce the chondrogenic differentiation such as TGF- $\beta$ 3 and BMP6. hMADS cells, as well as hBM-MSC, expressed BMP and TGF $\beta$  receptors, BMPR1A, BMPR2, TGF $\beta$ 1, 2 and 3 (data not shown). Chronic treatment between



**Fig. 1.** Expression of molecular markers in differentiated hMADS and hBM-MSC cells: effect of BMP6. hMADS cells and hBM-MSC were seeded in mono layer (2D) culture in multiwell plates and induced to differentiate into chondrocytes in the differentiation medium in the absence or presence of 10 ng/ml BMP6 for 21 days. RNA was analysed for the expression of aggrecan (ACAN), Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), type Ia1 Collagen (Col a1) and type X Collagen (Col X) by quantitative RT-PCR. Results are representative of three independent experiments performed on different series of cells. \* $P < 0.05$  versus day non-treated cells.

days 0 and 14 with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 in the absence or the presence of 10 ng/ml BMP6, was performed in order to analyze its effect on gene expression. The data showed no differences between hMADS cells and hBM-MSC (Fig. 1). Indeed, TGF- $\beta$ 3 differentiated hMADS and hBM-MSC cells expressed chondrogenic markers, and BMP6 treatment induced a significant increase of ACAN and COMP mRNA levels in hMADS cells and to a lower extent in hBM-MSC (Fig. 1). However, Col Ia1 and Col X mRNA levels were down regulated (Fig. 1).

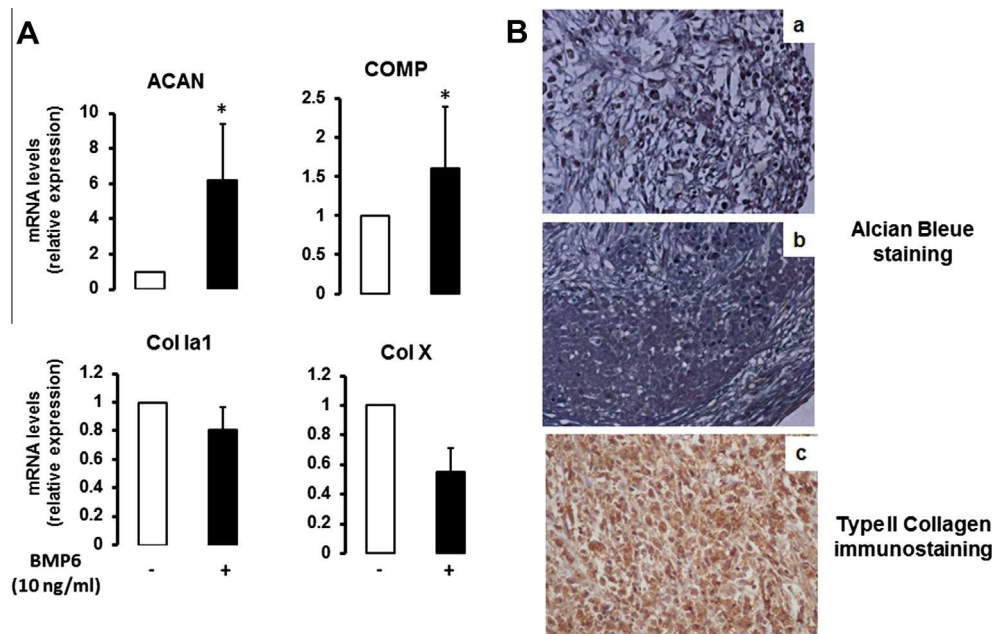
### 3.2. hMADS cells chondrogenesis in pellets (3D)

We subsequently analyzed whether hMADS cells were able to differentiate into chondrocytes in a three-dimension assay. For that purpose, hMADS cells were maintained in pellets as described in the Material and Methods section for 21 days in the differentiation medium supplemented with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 and in the absence or the presence of 10 ng/ml BMP6. As expected, differentiated cells expressed chondrogenic markers (Fig. 2). Furthermore,

BPM6 treatment induced a significant increase of ACAN and COMP mRNA levels and a decrease in those of Col Ia1 and X (Fig. 2A).

To confirm the differentiation of hMADS cells to cartilage cell morphology in response to TGF- $\beta$ 3 and BMP6, samples were evaluated using alcyan blue staining. Control pellets without TGF- $\beta$ 3 and BMP6 appeared very small in size and rather loose (Fig. 2Ba). Treatment of hMADS cells with TGF- $\beta$ 3 alone (not shown) or TGF- $\beta$ 3 and BMP6 resulted in mostly compact high density cultures (Fig. 2Bb). hMADS cells cultured in the presence of TGF- $\beta$ 3 and BMP6 differentiated into cartilage cells that exhibited distinct deep blue and orange staining representative of polysaccharides and proteoglycans reflecting an improved quantity of synthesized extracellular matrix. The presence of vacuoles confirmed the formation of cartilage-like structures. Moreover, differentiated hMADS cells did express type II Collagen as shown by specific immunostaining (Fig. 2Bc).

In order to further characterize hMADS-derived chondrocytes, we investigated whether these cells were responsive to well-known effectors of chondrogenesis, such as IL-1 $\beta$  and nicotine.



**Fig. 2.** Analysis of the chondrogenic potential of hMADS cells in a 3D assay. (A) Chondrogenic differentiation of hMADS cells was performed in pellet (3D) culture as described in Materials and Methods section in the absence or presence of 10 ng/ml BMP6. At day 21, RNA was analysed for the expression of ACAN, COMP, Col a1 and Col X by quantitative RT-PCR. Results are representative of three independent experiments performed on different series of cells. \* $P < 0.05$  versus day non-treated cells. (B) Histological examination of the pellet sections with Haematoxylin–Erythrosine–Safran for morphology, Alcyan blue and safranin for proteoglycans (Ba). Indirect immunostaining assay was performed using rabbit anti-type II $\alpha$  Collagen antibodies (Bc).



### 3.3. Effect of nicotine on chondrogenesis

A recent report has described a positive effect of nicotine on the chondrogenic differentiation [19]. hMADS cells were induced to differentiate into chondrocytes in 12 multi-well plates in the presence of 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 and 10 ng/ml BMP6 during 14 days. Cells were treated with various amounts of nicotine during the whole differentiation process and RNA was extracted and analyzed at day 14. ACAN mRNA levels significantly increased in a dose dependent manner to nicotine (Fig. 4) and a tendency to an increase in those of COMP was observed. In parallel, Col 1a1 and Col X mRNA levels were not affected or showed a slight trend to decrease at 25 ng/ml nicotine.

### 3.4. Effect of IL-1 $\beta$ on chondrogenesis gene expression

hMADS cells were induced to differentiate into chondrocytes in 12 multi-well plates in differentiation medium containing 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 and 10 ng/ml BMP6 during 14 days. Cells were exposed for the last two days (day 12 to day 14) to 10 ng/ml IL-1 $\beta$ . ACAN and COMP mRNA levels were down regulated in presence of IL-1 $\beta$  and this effect was reversed by the interleukin-1 receptor antagonist, anakinra (Fig. 3). Col 1a1 and X mRNA levels were regulated in a similar way but to a lower extent.

Interestingly, IL-1 $\beta$  treatment led to an up regulation of ADAMTS-4 mRNA levels which was reversed by the IL-1 receptor antagonist. An inverse situation was observed for ADAMTS-5 mRNA levels, for which we observed a down regulation in presence of IL-1 $\beta$  reversed by IL-1 receptor antagonist.

## 4. Discussion

The results reported herein clearly show that established hMADS cells are able to differentiate into chondrocytes under appropriate serum-free medium and in two and three dimension conditions. Moreover, these cells possess properties similar to those of commonly used human bone-marrow derived chondrocytes. Differentiated hMADS cells expressed cartilaginous matrix containing collagenous and proteoglycans as demonstrated by gene expression and histological and immune-staining analysis.

*In vitro* chondrocyte formation using hBM-MSCs has been described; intensive investigations showed that the combination of TGF $\beta$  and BMP was the most appropriate condition for chondrogenesis including MSCs from adipose tissues [10,20–22]. In our study, the combination of TGF- $\beta$ 3 and BMP6 regulated the expression of chondrogenic genes in a similar way both in hMSCs and hMADS.

Several reports have indicated that chondrocytes differentiated from adipose-derived MSCs, embryonic stem cells and BM-MSC show a higher capacity to express *in vitro* chondrogenic markers

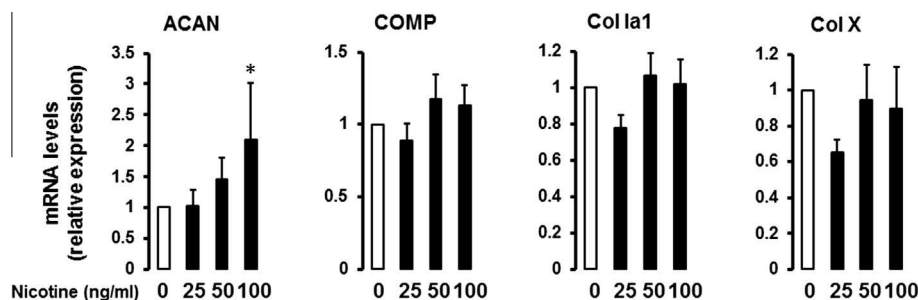
including Aggrecan (ACAN) than natural articular chondrocytes [23–24]. In our study, ACAN expression appeared higher in hMADS cells than in BM-MSCs.

A number of studies have clearly shown that MSCs undergoing chondrogenic differentiation become hypertrophic chondrocytes [25–27]. It has been shown that BMPs including BMP4 plays an important role in maintaining a chondrogenic phenotype, both by enhancing matrix production and suppressing the production of type X Collagen (Col X) [28]. By stimulating matrix production, BMPs impairs chondrocyte dedifferentiation and thus prevents chondrocyte hypertrophy. In the present study, hypertrophic markers such as Col X were down regulated in the presence of BMP6 and TGF- $\beta$ 3 in both hMADS cells and hBM-MSCs. The down regulation of Col X was more pronounced in hMADS cells than BM-MSC in agreement with previous studies using MSCs derived from adipose tissues [29]. Thus, with regard to the expression of chondrocytes markers, hMADS cells appear as a suitable model of chondrogenesis.

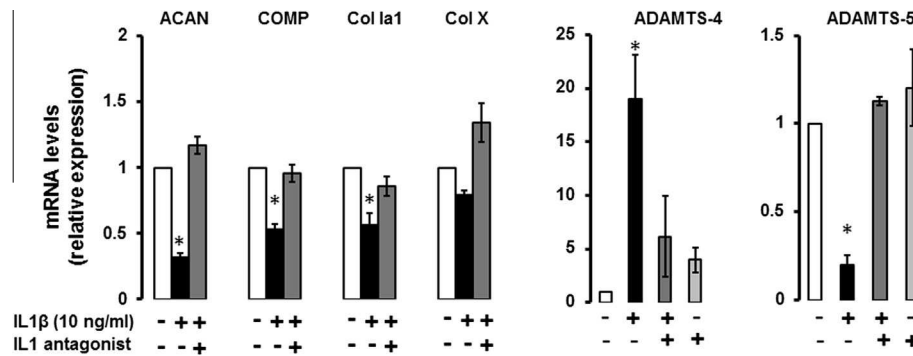
IL-1 is a major pro-inflammatory cytokine involved in cartilage and bone loss during the pathogenesis of arthritis. IL-1 inhibits the cartilage-specific, type II Collagen production and induces cartilage ACAN degeneration by aggrecanases (ADAMTS). In this way, the induction of ADAMTS-4 (or aggrecanase 1) gene expression and the inhibition of ACAN and COMP expression by IL-1 $\beta$  observed in hMADS cells are in agreement with previous studies [30], indicating that differentiated hMADS is also a model of cartilage degeneration. Of interest, in hMADS cells, ADAMTS-5 (aggrecanase 2) expression is regulated in an opposite way in response to IL1. This result is in agreement with previous studies demonstrating that, by contrast to the *in vivo* situation, ADAMTS-5 is not regulated *in vitro* by catabolic cytokines, including IL1, but seems to be constitutively expressed [31].

Inhibition of the IL-1 $\beta$  pathway by a specific IL-1 receptor antagonist is present endogenously in cartilage in physiological condition, and is an already used strategy in clinic to prevent cartilage degradation during osteoarthritis pathogenesis [32–33]. One of the classically used molecules in therapy is the recombinant anakinra, an analog of the physiological human IL-1Ra [34]. Reversion by anakinra of IL-1 $\beta$  effect in differentiated hMADS cells, demonstrated clearly that these cells can be used in pharmacological screening in order to find new anti-arthrosic compounds.

A more controversial situation is the association between smoking and osteoarthritis, as some reports have suggested that smoking protected against osteoarthritis [35] whereas others have shown deleterious effects of smoking [36]. For instance a significant positive effect of nicotine has been reported on the proliferation of human articular chondrocytes with an up-regulation of Collagen synthesis *in vitro* [19,37]. However, a toxic effect at higher doses has also been reported [38]. Nicotine treatment of differentiating hMADS cells led to a further induction of ACAN mRNA expression with no effect on the other markers indicating that this



**Fig. 3.** Effect of nicotine on gene expression in hMADS-derived chondrocytes. hMADS cells chondrogenic differentiation in mono layer culture in the differentiation medium supplemented with 10 ng/ml BMP6 during 14 days in the presence of various amounts of nicotine. RNA was analysed for the expression of ACAN, COMP, Col 1a1 and Col X by quantitative RT-PCR. Results are representative of two independent experiments performed on different series of cells. \* $P < 0.05$  versus day non-treated cells.



**Fig. 4.** Effect of IL-1 $\beta$  on gene expression in hMADS-derived chondrocytes. hMADS cells were induced to differentiate in differentiation medium containing 10 ng/ml BMP6 during 14 days. Cells were exposed for the last two days to 10 ng/ml IL-1 $\beta$  in the absence or presence of interleukin-1 receptor antagonist anakinra. RNA was analysed for the expression of ACAN, COMP, Col a1, Col X, ADAMTS-4 and 5 by quantitative RT-PCR. Results are representative of two independent experiments performed on different series of cells. \* $P < 0.05$  versus day non-treated cells.

drug may promote a specific effect without affecting the whole process of chondrogenesis. Even if a slight chondrogenic effect is displayed by nicotine treated hMADS cells, these results are only partially in agreement with the study of Ying et al [19]. Indeed, in their study a positive effect was found on type II Collagen but not on ACAN expression. Moreover, this nicotine characteristic is in discordance with the fact that nicotine is a well-known inductor of pro-inflammatory IL-1 and PGE2 pathway, 2 cartilage degradation pathways. It is possible that *in vitro*, a positive effect of nicotine was found due to the activation of pro-chondrogenic TGF $\beta$  pathway, as it is demonstrated in other models that nicotine is able to induce further of these pathways [39].

We showed in this study that hMADS cells are able to differentiate into chondrocytes in a two and three-dimension assay and to express typical chondrocyte markers including cartilage specific Collagen type II. Furthermore, hMADS cells respond to different pharmacological stimuli affecting chondrocyte properties. Therefore, due to their remarkable properties, i.e. displaying extensive self-renewal capacity, exhibiting a normal diploid karyotype, maintaining the capacity to undergo differentiation even after extensive expansion and resisting to freezing/thawing procedure with no loss of multipotent properties, hMADS cells represent a valuable and reproducible tool for the analysis of *in vitro* chondrocyte differentiation and for the screening of potentially interesting drugs.

## Acknowledgments

This work was supported by CNRS, by Centre Hospitalier Universitaire de Nice and by the "Fondation pour la Recherche Médicale" (grant DVO20081013470).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.012>.

## References

- [1] T. Neogi, The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* 21 (2013) 1145–1153.
- [2] P. Bianco, X. Cao, P.S. Frenette, J.J. Mao, P.G. Robey, P.J. Simmons, C.Y. Wang, The meaning, the sense and the significance, translating the science of mesenchymal stem cells into medicine, *Nat. Med.* 19 (2013) 35–42.
- [3] A.J. Wagers, I.L. Weissman, Plasticity of adult stem cells, *Cell* 116 (2004) 639–648.
- [4] D. Bosnakovski, M. Mizuno, G. Kim, T. Ishiguro, M. Okumura, T. Iwanaga, T. Kadosawa, T. Fujinaga, Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system, *Exp. Hematol.* 32 (2004) 502–509.
- [5] N. Indrawattana, G. Chen, M. Tadokoro, L.H. Shann, H. Ohgushi, T. Tateishi, J. Tanaka, A. Bunyaratvej, Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 914–919.
- [6] A.G. Via, A. Frizziero, F. Oliva, Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources, *Muscles Ligaments Tendons J.* 2 (2012) 154–162.
- [7] M. Schnabel, S. Marlovits, G. Eckhoff, I. Fichtel, L. Gotzen, V. Vecsei, J. Schlegel, Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture, *Osteoarthritis Cartilage* 10 (2002) 62–70.
- [8] J. Gimble, F. Guilak, Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential, *Cytotherapy* 5 (2003) 362–369.
- [9] P.C. Baer, H. Geiger, Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity, *Stem Cells Int.* 2012 (2012) 812693.
- [10] T. Hennig, H. Lorenz, A. Thiel, K. Goetzke, A. Dickhut, F. Geiger, W. Richter, Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF $\beta$  receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6, *J. Cell. Physiol.* 211 (2007) 682–691.
- [11] A.M. Rodriguez, C. Elabd, E.Z. Amri, G. Ailhaud, C. Dani, The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Biochimie* 87 (2005) 125–128.
- [12] A.M. Rodriguez, C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E.Z. Amri, C. Dani, G. Ailhaud, Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 255–263.
- [13] A.M. Rodriguez, D. Pisani, C.A. Dechesne, C. Turc-Carel, J.Y. Kurzenne, B. Wdziedzinski, A. Villageois, C. Bagnis, J.P. Breittmayer, H. Groux, G. Ailhaud, C. Dani, Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 1397–1405.
- [14] L.E. Zaragosi, G. Ailhaud, C. Dani, Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells, *Stem cells* 24 (2006) 2412–2419.
- [15] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622.
- [16] C. Elabd, C. Chiellini, M. Carmona, J. Galitzky, O. Cochet, R. Petersen, L. Penicaud, K. Kristiansen, A. Bouloumie, L. Casteilla, C. Dani, G. Ailhaud, E.Z. Amri, Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes, *Stem Cells* 27 (2009) 2753–2760.
- [17] D.F. Pisani, M. Djedaini, G.E. Beranger, C. Elabd, M. Scheidele, G. Ailhaud, E.Z. Amri, Differentiation of human adipose-derived stem cells into "brite" (brown-in-white) adipocytes, *Front Endocrinol. (Lausanne)* 2 (2011) 87.
- [18] F. Burel-Vandenbos, M. Benchetrit, C. Miquel, D. Fontaine, R. Auvergne, C. Lebrun-Frenay, N. Cardot-Leccia, J.F. Michiels, V. Paquis-Flucklinger, T. Virolle, EGFR immunolabeling pattern may discriminate low-grade gliomas from gliosis, *J. Neurooncol.* 102 (2011) 171–178.
- [19] X. Ying, S. Cheng, Y. Shen, X. Cheng, F. An Rompis, W. Wang, Z. Lin, Q. Chen, W. Zhang, D. Kou, L. Peng, X.Q. Tian, C.Z. Lu, Nicotine promotes proliferation and collagen synthesis of chondrocytes isolated from normal human and osteoarthritis patients, *Mol. Cell. Biochem.* 359 (2012) 263–269.
- [20] B. Johnstone, T.M. Hering, A.I. Caplan, V.M. Goldberg, J.U. Yoo, In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells, *Exp. Cell Res.* 238 (1998) 265–272.
- [21] I. Sekiya, D.C. Colter, D.J. Prockop, BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 (2001) 411–418.
- [22] B.T. Estes, A.W. Wu, F. Guilak, Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6, *Arthritis Rheum.* 54 (2006) 1222–1232.

- [23] R. Seda Tigli, S. Ghosh, M.M. Laha, N.K. Shevde, L. Daheron, J. Gimble, M. Gumusderelioglu, D.L. Kaplan, Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3 (2009) 348–360.
- [24] M.M. Ansar, E. Esfandiariy, M. Mardani, B. Hashemibeni, S.H. Zarkesh-Esfahani, M. Hatef, A. Kabiri, A comparative study of aggrecan synthesis between natural articular chondrocytes and differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells in 3D culture, *Adv. Biomed. Res.* 1 (2012) 24.
- [25] R.S. Tuan, Stemming cartilage degeneration: adult mesenchymal stem cells as a cell source for articular cartilage tissue engineering, *Arthritis Rheum.* 54 (2006) 3075–3078.
- [26] A.F. Steinert, S.C. Ghivizzani, A. Rethwilm, R.S. Tuan, C.H. Evans, U. Noth, Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage, *Arthritis Res. Ther.* 9 (2007) 213.
- [27] K. Pelttari, A. Winter, E. Steck, K. Goetzke, T. Hennig, B.G. Ochs, T. Aigner, W. Richter, Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice, *Arthritis Rheum.* 54 (2006) 3254–3266.
- [28] A. Steinert, M. Weber, A. Dimmler, C. Julius, N. Schutze, U. Noth, H. Cramer, J. Eulert, U. Zimmermann, C. Hendrich, Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate, *J. Orthop. Res.* 21 (2003) 1090–1097.
- [29] A.T. Mehlhorn, H. Schmal, S. Kaiser, G. Lepski, G. Finkenzeller, G.B. Stark, N.P. Sudkamp, Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture, *Tissue Eng.* 12 (2006) 1393–1403.
- [30] J. Sylvester, M. El Mabrouk, R. Ahmad, A. Chaudry, M. Zafarullah, Interleukin-1 induction of aggrecanase gene expression in human articular chondrocytes is mediated by mitogen-activated protein kinases, *Cell. Physiol. Biochem.* 30 (2012) 563–574.
- [31] A.J. Fosang, F.M. Rogerson, Identifying the human aggrecanase, *Osteoarthritis Cartilage* 18 (2010) 1109–1116.
- [32] W.P. Arend, C. Gabay, Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist, *Arthritis Res.* 2 (2000) 245–248.
- [33] C. Gabay, C. Lamacchia, G. Palmer, IL-1 pathways in inflammation and human diseases, *Nat. Rev. Rheumatol.* 6 (2010) 232–241.
- [34] R.M. Fleischmann, J. Tesser, M.H. Schiff, J. Schechtman, G.R. Burmester, R. Bennett, D. Modafferi, L. Zhou, D. Bell, B. Appleton, Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 65 (2006) 1006–1012.
- [35] F.V. Wilder, B.J. Hall, J.P. Barrett, Smoking and osteoarthritis: is there an association? the clearwater osteoarthritis study, *Osteoarthritis Cartilage* 11 (2003) 29–35.
- [36] S. Amin, J. Niu, A. Guermazi, M. Grigoryan, D.J. Hunter, M. Clancy, M.P. LaValley, H.K. Genant, D.T. Felson, Cigarette smoking and the risk for cartilage loss and knee pain in men with knee osteoarthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 18–22.
- [37] L. Gullahorn, L. Lippiello, R. Karpman, Smoking and osteoarthritis: differential effect of nicotine on human chondrocyte glycosaminoglycan and collagen synthesis, *Osteoarthritis Cartilage* 13 (2005) 942–943.
- [38] K.S. Kim, S.T. Yoon, J.S. Park, J. Li, M.S. Park, W.C. Hutton, Inhibition of proteoglycan and type II collagen synthesis of disc nucleus cells by nicotine, *J. Neurosurg.* 99 (2003) 291–297.
- [39] K. Jensen, D. Nizamutdinov, M. Guerrier, S. Afroze, D. Dostal, S. Glaser, General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis, *Faseb J.* 26 (2012) 4778–4787.

### c) Discussion

Nos résultats mettent en évidence la capacité des cellules hMADS à se différencier en chondrocytes en présence de facteurs de croissance à la fois dans des modèles de culture en deux et trois dimensions. Elles expriment une matrice cartilagineuse contenant du collagène et des protéoglycanes comme cela a été démontré avec l'étude de l'expression des principaux gènes de la chondrogenèse ainsi qu'avec les études histologiques et immunohistologiques. Il est intéressant de noter que nos cellules présentent des caractéristiques chondrogéniques similaires aux MSC originaires de la moelle osseuse.

Il est bien connu que la chondrogenèse issue de MSC, qu'elles soient originaires de la moelle osseuse ou encore du tissu adipeux entraîne le développement de chondrocytes hypertrophiques [418,419]. Le rôle des BMPs pour le maintien du phénotype chondrogénique est important et a déjà été décrit, elles stimulent la formation de la matrice et diminuent la formation de collagène de type X qui est un marqueur de l'hypertrophie chondrocytaire [420]. Dans notre étude, l'expression du collagène de type X est diminué en présence de facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ 3 et BMP6 que ce soit avec les MSC originaires de la moelle osseuse ou encore avec les hMADS mais de façon encore plus marquée avec ces dernières, ce qui renforce la validité de notre modèle puisque cette propriété a déjà été décrite avec les MSC originaires du tissu adipeux [421].

Pour compléter la validation de notre modèle de chondrogenèse et montrer que ces cellules pouvaient aussi représenter un outil pharmacologique intéressant, nous avons testé l'effet de l'IL-1 et de son antagoniste sur l'expression des gènes. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire dont le rôle délétère dans l'arthrose est connu depuis de nombreuses années. Elle inhibe la production de collagène de type 2 et induit la dégradation de l'aggrécane à travers la stimulation d'une aggrécanease (ADAMTS 4)[422]. C'est ce que nous retrouvons dans notre étude.

Pour confirmer leur capacité pharmacologique, nous avons étudié l'effet de la nicotine sur la chondrogenèse de nos cellules. L'effet du tabac reste encore très débattu dans l'arthrose que ce soit en clinique ou *in vitro*, domaine dans lequel on ne dispose que de peu d'études. Nous retrouvons un effet positif sur la production

d'aggrécane mais pas sur les autres marqueurs de la chondrogenèse à une dose équivalente à celle d'un paquet par jour chez un fumeur. Ce qui pourrait peut-être traduire un effet spécifique de la nicotine et expliquer l'hétérogénéité de la littérature.

Nos résultats ne sont que partiellement en adéquation avec ceux de l'équipe de Ying qui retrouvait un effet positif de la nicotine sur la synthèse du collagène de type 2 mais pas sur l'aggrécane [423].

En fait, l'action de la nicotine sur le cartilage est probablement plus complexe. Elle est certes connue pour avoir un effet pro-inflammatoire par stimulation des voies des IL-1 et PGE2 qui sont deux voies bien connues dans la dégradation cartilagineuse mais elle aurait aussi une action de stimulation sur la synthèse de TGF  $\beta$  ainsi que de son récepteur TGF  $\beta$ RII [424].

Nous avons démontré la capacité de nos cellules à obtenir, sous la stimulation de facteurs de croissance classiquement utilisés dans la chondrogenèse *in vitro*, une chondrogenèse similaire à celle obtenue avec des MSC originaires de la moelle osseuse. L'ensemble de ces observations montrent que les cellules hMADS représentent un puissant outil reproductible de l'étude de la différenciation chondrogénique et potentiellement intéressant pour la réalisation de tests pharmacologiques dans le domaine de l'arthrose.

## A. Rôle de l'ocytocine dans l'arthrose

### a) Hypothèse de travail

Les populations occidentales sont âgées. Le vieillissement est associé à des modifications immunologiques, hormonales, métaboliques, et à des changements pour la masse maigre, et la densité minérale osseuse qui s'accompagnent d'une augmentation de la masse grasse.

Différentes pathologies rhumatologiques augmentent en fréquence avec l'âge. C'est le cas de l'arthrose et aussi de l'ostéoporose. L'arthrose qui est la pathologie musculo-squelettique la plus fréquente est considérée comme une priorité de santé publique de par ses conséquences en terme de dégradation de la santé perçue et aussi en raison de son coût direct et indirect. Le vieillissement attendu de nos populations ne pourra que renforcer cette situation. Sa physiopathologie reste largement méconnue malgré des progrès récents et malgré une prise en charge bien codifiée, on ne dispose pas de véritable traitement curatif.

Depuis de nombreuses années, un éventuel lien entre ostéoporose et arthrose est discuté. Il s'agit en effet de deux pathologies liées à l'âge mais aussi à des facteurs génétiques et environnementaux pouvant être communs, notamment le déficit en œstrogènes [425,426], et faisant intervenir des cellules : ostéoblastes et chondrocytes qui dérivent d'un progéniteur commun qui est la cellule souche mésenchymateuse [427-430].

L'ocytocine est une hormone exprimée dans un grand nombre de cellules dont les ostéoblastes et les adipocytes [6]. Son rôle dans l'ostéoporose a été démontré [7]. A ce jour aucune donnée sur son éventuel rôle dans l'arthrose n'a été publiée.

Du fait de ces différents éléments et de ce que les chondrocytes et les ostéoblastes possèdent un précurseur commun, nous avons testés l'effet de l'ocytocine sur la chondrogenèse.

## **b) Manuscrit 4**

## Oxytocin enhances chondrocyte differentiation

Christian Roux<sup>1,2,3,4</sup>, Didier F. Pisani<sup>1,2,3</sup>, Hédi Ben Yahia<sup>1,2,3</sup>, Mansour Djedaini<sup>1,2,3</sup>, Rayane Ghandour<sup>1,2,3</sup>, Jean-Claude Chambard<sup>1,2,3</sup>, Damien Ambrosetti<sup>5,6</sup>, Jean-François Michiels<sup>5,6</sup>, Véronique Breuil<sup>4</sup>, Gérard Ailhaud<sup>1,2,3</sup>, Liana Euller-Ziegler<sup>4</sup> and Ez-Zoubir Amri<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France. <sup>2</sup>CNRS, iBV UMR 7277, 06100 Nice, France. <sup>3</sup>Inserm, iBV, U1091, 06100 Nice, France. <sup>4</sup>Service de Rhumatologie, Hopital l'Archet CHU, 06200 Nice, <sup>5</sup>University of Nice Sophia Antipolis, UFR Médecine, Nice, F-06189. <sup>6</sup>Anatomopathology Service, Pasteur Hospital, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France.

\*Correspondence should be addressed to: Dr. Ez-Zoubir Amri, iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis, Tour Pasteur, UFR Médecine, 28, avenue de Valombrose, 06189 Nice Cedex 2, France

Tel: +33 493 37 70 82; Fax: +33 493 81 70 58; E-mail: amri@unice.fr

Key words:

Chondrocyte, hMADS, oxytocin, differentiation



## **Abstract**

Osteoarthritis is a highly debilitating chronic whole joint disease affecting mainly the aging population. This affection represents tremendous burdens for public health care systems. The exact pathogenesis has yet to be elucidated. Osteoarthritis is generally considered to have a complicated framework including genetic, hormonal, metabolic and biomechanical factors. The contemporary paradigm of osteoarthritis considers involvement of all joint tissues. Oxytocin, which belongs to the pituitary hormone family, is involved in several central and peripheral functions. It has been shown, that oxytocin acts on muscle and subchondral bone which are important structures in osteoarthritis physiopathology. The question remains about the third important tissue of the joint: the cartilage. We show here an oxytocin action on the chondrocyte, the unique cell type in mature cartilage. Oxytocin induces a significant increase of aggrecan, COMP, Sox9 and Col X mRNA levels in human multipotent adipose-derived stem cells (hMADS) and to a lesser extent in human bone marrow stem cell hBM-MSc. However, the expression of the fibrous tissue marker type I collagen was down regulated by oxytocin treatment. Interestingly, oxytocin treatment attenuates the negative effect of IL-1 $\beta$  on ADAMTS-4 mRNA level which is responsible for aggrecan degradation. Taken together, these results indicate that oxytocin represents a positive modulator of chondrocyte formation and holds promise as a potential therapy for osteoarthritis.

## **Introduction**

Osteoarthritis (OA), the most common form of over 100 types of arthritis, is a highly debilitating chronic disease affecting mainly the aging population. This affection represents tremendous burdens for public health care system. OA is characterized by cartilage erosion, development of osteophytes, changes in the subchondral bone and synovial fluid, and the involvement of a variety of inflammatory components [1]. The exact pathogenesis has yet to be elucidated. OA is generally considered to have a complicated framework that includes genetic, hormonal, metabolic and biomechanical factors. Specific risk factors such as age, gender, race, trauma, obesity, genetic factors, estrogens deficiency, nutritional deficiencies ... have been identified [2-6]. Human life expectancy has increased continuously in industrialized countries leading to disorders commonly considered as being age-related, such as osteoarthritis, osteoporosis, atherosclerosis and neurodegenerative diseases. Currently, treatment of OA has been primarily restricted to analgesics which have limited efficacy and side-effects. Development of new therapies would be of great interest in terms of public health and may lead to reduction of the costs of medical treatment of bone and cartilage diseases.

The chondrocyte, the unique cell type in mature cartilage, maintains a stable equilibrium between the synthesis and the degradation of matrix components. During aging and related disorders, such as Rheumatoid arthritis (RA) which causes progressive destruction of articular and osteoarthritis, this equilibrium is disrupted, and the rate of loss of collagens and proteoglycans from the matrix exceeds the rate of deposition of newly synthesized molecules. The cartilage destruction in osteoarthritis is believed to be chondrocyte mediated in response to biomechanical

insult, which may occur directly or indirectly through the production of cytokines and cartilage matrix-degrading proteinases in cartilage and other joint tissues [7-8].

In a previous work, we showed that oxytocin (OT) inhibited adipocyte and stimulated osteoblast differentiation. Plasma OT levels were lower in ovariectomized (OVX) mice and rats compared to sham-operated controls and OT plasma levels were significantly lower in postmenopausal women who developed osteoporosis than in their healthy counterparts [9]. Daily subcutaneous OT injection for 8 weeks prevented bone loss in OVX mice by enhancing bone microarchitecture and biomechanical strength and reduced marrow adiposity. These findings have been confirmed by Tamma *et al.* who demonstrated that OT and OT-receptor knock-out mice develop osteoporosis [10].

As chondrocytes and osteoblasts display a common progenitor, we have tested whether OT affects chondrogenesis. For this purpose, we used human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells which exhibit both a normal karyotype and high self-renewal ability, are able to differentiate into various lineages, including adipocytes, osteoblasts and chondrocytes, and can also, support *in vivo* regenerative processes [9,11-15]. Herein, we show that OT enhances chondrocyte differentiation of hMADS cells as well as of bone-marrow derived mesenchymal stromal cells. These effects allowed an increase in the extracellular matrix formation.

## **Materials and methods**

### *Reagents*

Cell culture media, serum, buffers, and trypsin were purchased from Lonza (Verviers, Belgium), other cell culture reagents were from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin

Fallavier, France). BMP6, IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 3 were purchased from Peprotech (France).

### *Cell culture*

The establishment and characterization of the multipotency of hMADS cells have been extensively described [12-13]. Briefly, these cells, isolated from white adipose tissue removed from surgical scraps of infants undergoing surgery, did not enter senescence while exhibiting a diploid karyotype, were non-transformed though expressing significant telomerase activity, did not show any chromosomal abnormalities after 140 population doublings, and maintained their differentiation properties after 160–200 population doublings [12-13]. In the experiments reported herein, hMADS cells established from male infant were used between passages 15 and 30 corresponding to 35 to 80 population doublings. hBM-MSCs were purchased from Cambrex (Paris, France) and used as recommended by the manufacturer.

Cultures were performed either as mono-layer (2D) or as three dimensional (3D) pellets. For 2D analysis, hBM-MSCs or hMADS cells were seeded, in 12 multi-well plates, at a density of  $25 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Low glucose (1.5 g/l), supplemented with 10% FCS, 15 mM HEPES, 2.5 ng/ml hFGF-2, 60  $\mu$ g/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin defined as growth medium. hFGF-2 was removed when cell reached confluence. At day 2 post-confluence (designated day 0), cells were induced to differentiate in the presence of DMEM/High glucose (4.5 g/l) supplemented with 500  $\mu$ M Ascorbic acid, 10  $\mu$ g/ml insulin, 5.5  $\mu$ g/ml Transferrin, 5 ng/ml Selenium, 1 mM Sodium Pyruvate, 40  $\mu$ g/ml L-Proline, 100 nM dexamethasone, 10 ng/ml BMP6 and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 (defined as differentiation medium).

For 3D analysis, hMADS cells were seeded at  $5 \times 10^5$  cells per 15-ml polypropylene tube and centrifuged 5 minutes at 1000 rpm. The resulting cell pellet was maintained in growth medium for 3 days and chondrogenesis was induced in the differentiation medium described above. The tube's lid was left open to allow gas exchange. The media were changed every 3 days and analyzed at the indicated days.

Oxytocin (30 nM) was added each day during the differentiation process. IL-1 $\beta$  was added at the indicated doses at day 14 and gene expression was analyzed 24 hours later.

#### *Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

These procedures follow MIQE recommendations [16]. Total RNA was extracted using TRI-Reagent kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's instructions. Quality control for purity and integrity of RNA were tested by UV spectrophotometry on a NanoDrop 1000 device and by SYBR Gold-stained agarose analysis (Invitrogen). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT) was conducted as described previously [17-18]. Primer sequences, designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), are listed in Supplementary Table 1 and were tested for their specificity, efficiency, reproducibility and dynamic range. For quantitative PCR (QPCR), final reaction volume was 10  $\mu$ l using SYBR qPCR premix Ex TaqII from Takara (Ozyme) and assays were run on a StepOne Plus ABI real-time PCR machine (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston). The expression of selected genes was normalized to that of TATA-box binding protein (TBP) and 36B4 housekeeping genes and quantified using the comparative- $\Delta$ Ct method.

### *Histological analysis and Immunohistochemistry*

Cell pellets were fixed in Phosphate Buffered Formaldehyde, then dehydrated through a series of ethanol concentrations, cleared with Xylene, embedded in paraffin and 5  $\mu\text{m}$  sections were prepared. For histological examination, the sections were stained using Haematoxylin-Erythrosine-Safran (HES) for morphology analysis and Alcian Blue for proteoglycan detection. Indirect immunostaining assay was performed as described previously [19] using rabbit anti-type II $\alpha$  collagen antibodies (Millipore, France).

Toluidine staining: The metachromatic dyes are often used to help histochemically characterize glycoaminoglycans and other non-neutral polysaccharides. The cells in monolayers were rinsed three times with PBS times and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. The fixed cells were rinsed for 10 min with running tap water and for 5 min with distilled water. Then, the fixed cells were incubated with toluidine blue solution for 10 min at room temperature and washed with distilled water.

### *Statistical analysis*

Data are expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean (sem) and are analyzed using the 2-tailed Student's *t* test. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

## **Results:**

### *Analysis of hMADS cells chondrogenesis in presence of oxytocin*

We showed previously that hMADS cells did express OT receptors. hMADS cells were induced, at day 0, to differentiate into chondrocytes in the differentiation medium in the absence or presence of 30 nM OT or 300 nM carbetocin, a stable oxytocin analogue. The cell morphology was observed throughout the entire culture interval using toluidine blue staining revealing glycoprotein secretion around the cell and in the cytoplasm. As shown in figure 1, OT and carbetocin induced an increase in the glycoaminoglycans in the extracellular environment indicating the formation of a cartilage matrix at days 10 and 20 suggesting that activation of OT pathway indeed enhanced chondrogenesis.

### *Effects of OT on gene expression of hMADS cells and BM-MSC*

Chondrogenic differentiation of hMADS cells and hBM-MSCs was evaluated by qRT-PCR based on the expression of chondrogenic gene markers including Aggrecan (ACAN), Cartilage oligomeric matrix protein (COMP, alpha chain of type I Collagen (Col Ia1), type X Collagen (Col X) and Sox9.

Cell culture in mono-layer (2D) was performed in the presence of differentiation medium supplemented or not with 30 nM OT. Differentiated hMADS cells and hBM-MSC expressed chondrogenic markers and OT treatment exerted similar effects in both cell types (Figure 2A and B). Indeed, OT induced a significant increase of ACAN, COMP, Sox9 and Col X mRNA levels in hMADS cells and to a lesser extent in hBM-MSC. However, the expression of the fibrous tissue marker type I collagen (Col I) was down regulated by OT treatment (Figure 2).

### *Effects of OT on hMADS cells chondrogenesis in pellets*

We used a cell pellet culture model which requires a high cell density to create compact cell-cell contacts mimicking the cellular condensation process occurring *in vivo*. For that purpose, hMADS cells were maintained in pellets [15] as described in the Material and Methods section for 21 days in the differentiation medium in the absence or the presence of 30 nM OT. As expected, differentiated cells expressed chondrogenic markers (Figure 3A). Furthermore, OT treatment induced a significant increase of ACAN and Col X mRNA expression, a tendency to increased COMP mRNA levels and no variations in Col Ia1 mRNA levels (Figure 3A).

Next, to further evaluate the chondrogenic potential of OT, we performed immunocytochemistry assays on cells differentiated in pellets for 21 days. Specific immunostaining showed that hMADS cells cultured in the presence of OT exhibited an improvement of distinct yellow staining representative of Sox9 and Col II (Figure 3B), in comparison with hMADS without OT, clearly demonstrating an increase in the expression of Sox9 and type II collagen which develops a dense filamentous matrix network deposited over the cells. To confirm the action of OT on the differentiation of hMADS cells, samples were evaluated using Alcian Blue, safranin and toluidine stain. Control pellets without OT appeared very small in size and rather loose. Treatment of hMADS cells with OT resulted in mostly compact high density cultures (data not showed).

Altogether, these results suggested that OT enhanced hMADS cells chondrogenesis.

### *Effect of IL-1 $\beta$ on chondrogenesis gene expression in the presence of OT*

As IL-1 is a major pro-inflammatory cytokine involved in cartilage and bone loss, we aimed to test whether OT was able to reverse the effects of IL1. For this purpose,



hMADS cells were induced to differentiate into chondrocytes in 12 multi-well plates in differentiation medium during 14 days and exposed for the last day (day 14 to day 15) to 10 ng/ml IL-1 $\beta$ . ACAN and COMP mRNA levels were down regulated in presence of IL-1 $\beta$  and (Figure 4). Col X mRNA levels was regulated in an opposite way. In presence of OT, ACAN down regulation was increased and improvement of Col X amplified.

IL-1 $\beta$  treatment led, as expected, to an up regulation of ADAMTS-4 mRNA levels. Interestingly, presence of OT attenuates this up regulation (Figure 4).

## **Discussion**

The results reported herein show that OT exerted a positive effect on chondrogenesis of two independent cell models in a 2- as well as a 3-dimentionel culture system. Of note, hMADS cells, as well as hBM-MSc, expressed OT and BMP receptors (BMPR1A, BMPR1 $\beta$ , BMPR2) with an increase of BMPR1 $\beta$ , BMPR2 and OTR in presence of OT. OT seems to a play a role antagonizing the deletrious effects IL-1 $\beta$ .

In our previous work, we showed that OT inhibited adipocyte and stimulated osteoblast differentiation and that subcutaneous OT administration reversed bone loss in ovariectomized mice, an animal mimicking menopause, by enhancing bone microarchitecture and biomechanical strength and reducing marrow adiposity [9].

OT belongs to the pituitary hormone family and regulates the function of peripheral target organs. Furthermore, OT modulates a wide range of behaviors, such as social recognition, love, and fear [20-24].

Furthermore, several observations link osteoporosis with osteoarthritis: i) both diseases are affected by genetic and environmental factors, or the interaction between them, ii) normal aging is associated with both a high incidence of osteoporosis and osteoarthritis; more precisely, it appears that estrogen deficiency plays an important role in the pathophysiology of both diseases [25-26], and iii) osteoblasts and chondrocytes derive from a common progenitor, the mesenchymal stem cell [27-30].

Adult articular cartilage is composed of relatively small number of chondrocytes (2–5% per volume) interspersed within a unique matrix composed of type II and other collagens, a proteoglycan called aggrecan, and hyaluronic acid. Articular cartilage is avascular and hypoxic, and thus articular chondrocytes display a low rate of turnover. During the OA process, activation of catabolic enzymes including matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases leads to softening of the articular cartilage. A low-grade inflammatory response ensues, characterized by the cytokines TNF $\alpha$  and interleukin-1, which likely further drives expression of catabolic enzymes such as ADAMTS-4 [31-32]. With respect to these observations, we found that OT was able to attenuate the effects of IL-1 $\beta$  as shown by the reduction in the levels of ADAMTS-4 mRNA levels. It is tempting to postulate that OT exerts its effects on the modulation of chondrogenesis, at least in part, through the reversion of the deleterious effects of IL-1 $\beta$  and normalization of the inflammatory process. Further analysis is required to shed some light on the mechanisms involved in these positive effects of OT. Moreover, analysis of the effects of OT *in vivo*, using animal models such as rat anterior cruciate ligament transaction or mono-iodo-acetate treatment are important to show its potential therapeutic against osteoarthritis.

## **Acknowledgments**

This work was supported by CNRS, by Centre Hospitalier Universitaire de Nice and by the "Fondation pour la Recherche Médicale" (grant DVO20081013470).

## References

- [1] J.A. Buckwalter, C. Saltzman, T. Brown, The impact of osteoarthritis: implications for research, *Clin Orthop Relat Res* (2004) S6-15.
- [2] R.J. Goekoop, M. Kloppenburg, H.M. Kroon, L.E. Dirkse, T.W. Huizinga, R.G. Westendorp, J. Gussekloo, Determinants of absence of osteoarthritis in old age, *Scand J Rheumatol* 40 (2011) 68-73.
- [3] L. Sharma, D. Kapoor, S. Issa, Epidemiology of osteoarthritis: an update, *Curr Opin Rheumatol* 18 (2006) 147-156.
- [4] D.T. Felson, J. Goggins, J. Niu, Y. Zhang, D.J. Hunter, The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment, *Arthritis Rheum* 50 (2004) 3904-3909.
- [5] D.T. Felson, C.E. Chaisson, Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis, *Baillieres Clin Rheumatol* 11 (1997) 671-681.
- [6] J.J. Anderson, D.T. Felson, Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work, *Am J Epidemiol* 128 (1988) 179-189.
- [7] C. Vinatier, D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, D. Noel, Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors, *Trends Biotechnol* 27 (2009) 307-314.
- [8] D. Mrugala, N. Dossat, J. Ringe, B. Delorme, A. Coffy, C. Bony, P. Charbord, T. Haupl, J.P. Daures, D. Noel, C. Jorgensen, Gene expression profile of multipotent mesenchymal stromal cells: Identification of pathways common to TGFbeta3/BMP2-induced chondrogenesis, *Cloning Stem Cells* 11 (2009) 61-76.
- [9] C. Elabd, A. Basillais, H. Beaupied, V. Breuil, N. Wagner, M. Scheideler, L.E. Zaragosi, F. Massiera, E. Lemichez, Z. Trajanoski, G. Carle, L. Euler-Ziegler, G. Ailhaud, C.L. Benhamou, C. Dani, E.Z. Amri, Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis, *Stem Cells* 26 (2008) 2399-2407.
- [10] R. Tamma, G. Colaianni, L.L. Zhu, A. DiBenedetto, G. Greco, G. Montemurro, N. Patano, M. Strippoli, R. Vergari, L. Mancini, S. Colucci, M. Grano, R. Faccio, X. Liu, J. Li, S. Usmani, M. Bachar, I. Bab, K. Nishimori, L.J. Young, C.

- Buettner, J. Iqbal, L. Sun, M. Zaidi, A. Zallone, Oxytocin is an anabolic bone hormone, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 7149-7154.
- [11] A.M. Rodriguez, C. Elabd, E.Z. Amri, G. Ailhaud, C. Dani, The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Biochimie* 87 (2005) 125-128.
- [12] A.M. Rodriguez, D. Pisani, C.A. Dechesne, C. Turc-Carel, J.Y. Kurzenne, B. Wdziekonski, A. Villageois, C. Bagnis, J.P. Breitmayer, H. Groux, G. Ailhaud, C. Dani, Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse, *J Exp Med* 201 (2005) 1397-1405.
- [13] L.E. Zaragosi, G. Ailhaud, C. Dani, Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells, *Stem Cells* 24 (2006) 2412-2419.
- [14] C. Elabd, C. Chiellini, A. Massoudi, O. Cochet, L.E. Zaragosi, C. Trojani, J.F. Michiels, P. Weiss, G. Carle, N. Rochet, C.A. Dechesne, G. Ailhaud, C. Dani, E.Z. Amri, Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells, *Biochem Biophys Res Commun* 361 (2007) 342-348.
- [15] C. Roux, D.F. Pisani, H.B. Yahia, M. Djedaini, G.E. Beranger, J.C. Chambard, D. Ambrosetti, J.F. Michiels, V. Breuil, G. Ailhaud, L. Euller-Ziegler, E.Z. Amri, Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: A powerful pharmacological tool, *Biochem Biophys Res Commun* 440 (2013) 786-791.
- [16] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin Chem* 55 (2009) 611-622.
- [17] C. Elabd, C. Chiellini, M. Carmona, J. Galitzky, O. Cochet, R. Petersen, L. Penicaud, K. Kristiansen, A. Bouloumie, L. Casteilla, C. Dani, G. Ailhaud, E.Z. Amri, Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes, *Stem Cells* 27 (2009) 2753-2760.
- [18] D.F. Pisani, M. Djedaini, G.E. Beranger, C. Elabd, M. Scheideler, G. Ailhaud, E.Z. Amri, Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes, *Front Endocrinol (Lausanne)* 2 (2011) 87.

- [19] F. Burel-Vandenbos, M. Benchetrit, C. Miquel, D. Fontaine, R. Auvergne, C. Lebrun-Frenay, N. Cardot-Leccia, J.F. Michiels, V. Paquis-Flucklinger, T. Virolle, EGFR immunolabeling pattern may discriminate low-grade gliomas from gliosis, *J Neurooncol* 102 (2011) 171-178.
- [20] J.A. Russell, G. Leng, A.J. Douglas, The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy, *Front Neuroendocrinol* 24 (2003) 27-61.
- [21] I.D. Neumann, Oxytocin: the neuropeptide of love reveals some of its secrets, *Cell Metab* 5 (2007) 231-233.
- [22] M. Kosfeld, M. Heinrichs, P.J. Zak, U. Fischbacher, E. Fehr, Oxytocin increases trust in humans, *Nature* 435 (2005) 673-676.
- [23] P. Kirsch, C. Esslinger, Q. Chen, D. Mier, S. Lis, S. Siddhanti, H. Gruppe, V.S. Mattay, B. Gallhofer, A. Meyer-Lindenberg, Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans, *J Neurosci* 25 (2005) 11489-11493.
- [24] E. Andari, J.R. Duhamel, T. Zalla, E. Herbrecht, M. Leboyer, A. Sirigu, Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 4389-4394.
- [25] G. Duque, B.R. Troen, Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome, *J Am Geriatr Soc* 56 (2008) 935-941.
- [26] Y.H. Sniekers, H. Weinans, G.J. van Osch, J.P. van Leeuwen, Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis, *Arthritis Res Ther* 12 (2010) R182.
- [27] L.J. Zhao, H. Jiang, C.J. Papasian, D. Maulik, B. Drees, J. Hamilton, H.W. Deng, Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis, *J Bone Miner Res* 23 (2008) 17-29.
- [28] I.R. Reid, Relationships between fat and bone, *Osteoporos Int* 19 (2008) 595-606.
- [29] S.A. Shapses, C.S. Riedt, Bone, body weight, and weight reduction: what are the concerns?, *J Nutr* 136 (2006) 1453-1456.
- [30] C.J. Rosen, M.L. Bouxsein, Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone?, *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 (2006) 35-43.

- [31] F. Berenbaum, Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!), *Osteoarthritis Cartilage* 21 (2013) 16-21.
- [32] J.P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, S.B. Abramson, Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets, *Arthritis Rheum* 44 (2001) 1237-1247.

## Figure legends

### **Figure 1: Effects of oxytocin and carbetocin on extracellular matrix formation.**

hMADS cells were seeded in mono layer (2D) culture in multiwell plates and induced to differentiate into chondrocytes in the differentiation medium for 10 or 20 days in the absence or presence of 30 nM OT or 300 nM carbetocin (cb). Cells were fixed and stained. Photographs of monolayers are representative of three independent experiments.

### **Figure 2: Effect of oxytocin on hBM-MSCs and hMADS cells chondrogenesis**

hMADS cells and hBM-MSC were seeded in mono layer (2D) culture in multiwell plates and induced to differentiate into chondrocytes in the differentiation medium for 21 days in the absence or presence of 30 nM OT. RNA was analyzed for the expression of aggrecan (ACAN), Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), Sox9, type Ia1 Collagen (Col Ia1) and type X Collagen (Col X) by quantitative RT-PCR. Results are representative of three independent experiments performed on different series of cells. \*P < 0.05 versus day non-treated cells.

### **Figure 3: Analysis of OT effect on hMADS chondrogenesis in a 3D assay.**

A: Chondrogenic differentiation of hMADS cells was performed in pellet (3D) culture as described in Materials and Methods section in the absence or presence of 30 nM OT. At day 21, RNA was analyzed for the expression of ACAN, COMP, Col Ia1 and Col X by quantitative RT-PCR. Results are representative of three independent experiments performed on different series of cells. \*P < 0.05 versus day non-treated cells. B: Immunostaining examination of the pellet sections with Haematoxylin-



Indirect immunostaining assay was performed using rabbit anti-type II $\alpha$  collagen and Sox9 antibodies (Bc).

**Figure 4: Effect of IL-1 $\beta$  on gene expression in hMADS-derived chondrocytes with or without OT.**

hMADS cells were induced to differentiate in differentiation medium during 15 days with or without OT. Cells were exposed for the last day to 10 ng/ml IL-1 $\beta$ . RNA was analyzed for the expression of ACAN, COMP, Col a1, Col X, ADAMTS-4 and 5 by quantitative RT-PCR. Results are representative of three independent experiments performed on different series of cells. \*P < 0.05 versus day non-treated cells

**Supplementary Table 1:** Sequence of primers used for gene expression analysis.

gene	complete name	forward primer	reverse primer
Col Ia1	Collagen type I	ACCTGCGTGTACCCCACTCA	CCGCCATACTCGAACTGGAA
Col X	Collagen type X	AGGAATGCCTGTGTCTGCTT	ACAGGCCTACCCAAACATGA
ACAN	Aggrecan	TCGAGGACAGCGAGGCC	AGGGTGTAGCGTGTAGAGA
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	CAATGAACAGCGACCCAG G	TCACATGGAACGTGCCCTC
ADAMTS4	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4	CCCCAGACCCCGAAGAGCCA	CCCGCTGCCAGGCACAGAAG
ADAMTS5	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5	TATGACAAGTGCGGAGTATG	TTCAGGGCTAAATAGGCAGT
Sox 9	SRY-related HMG-BOX gene 9	CAGTACCCGCACTTGCAACAAC	ACTTGTAATCCGGGTGGTCCTT
TBP	tata-box binding protein	CACGAACCACGGCACTGATT	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC
36B4	60S acidic ribosomal protein P0	TGCATCAGTACCCCATCTATCAT	AGGCAGATGGATCAGCCAAGA

**Figure 1**

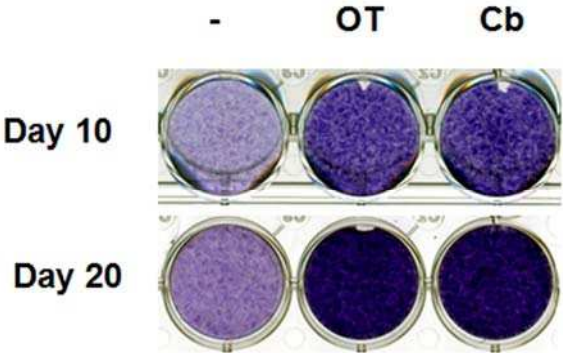


Figure 2

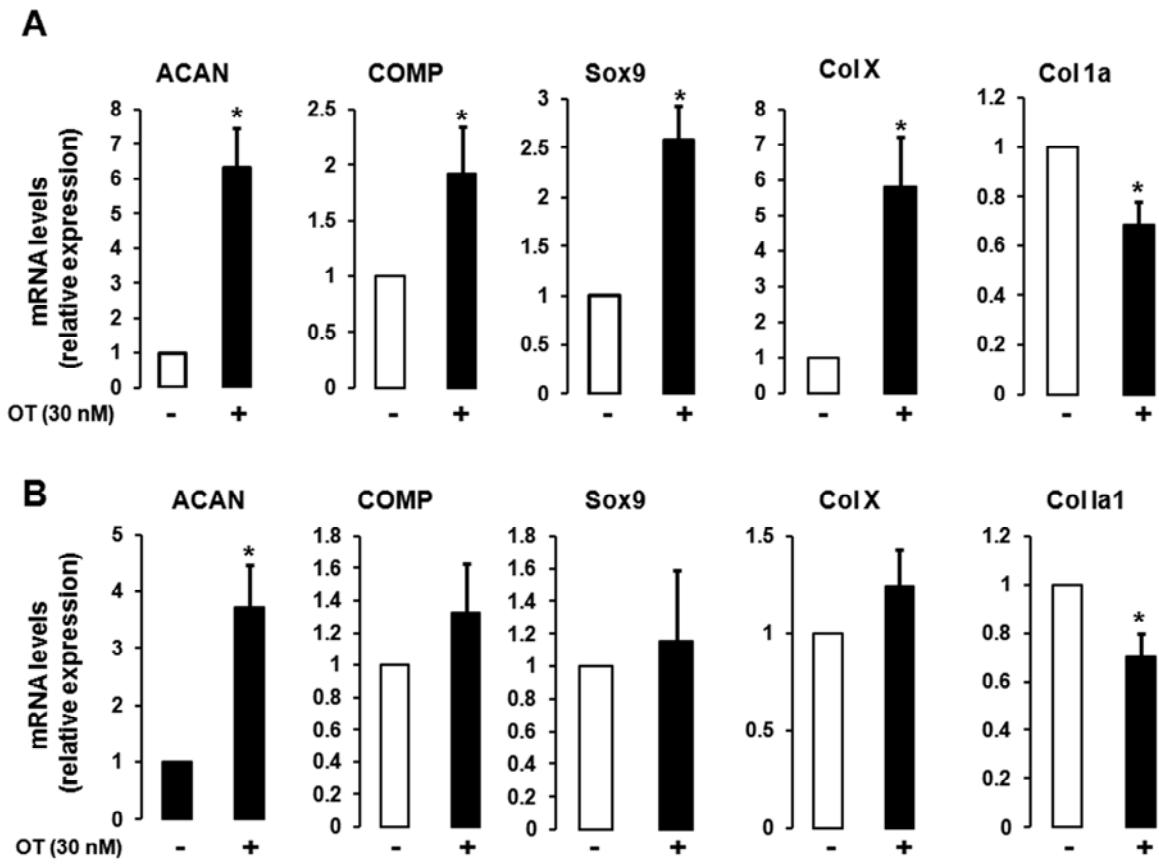


Figure 3

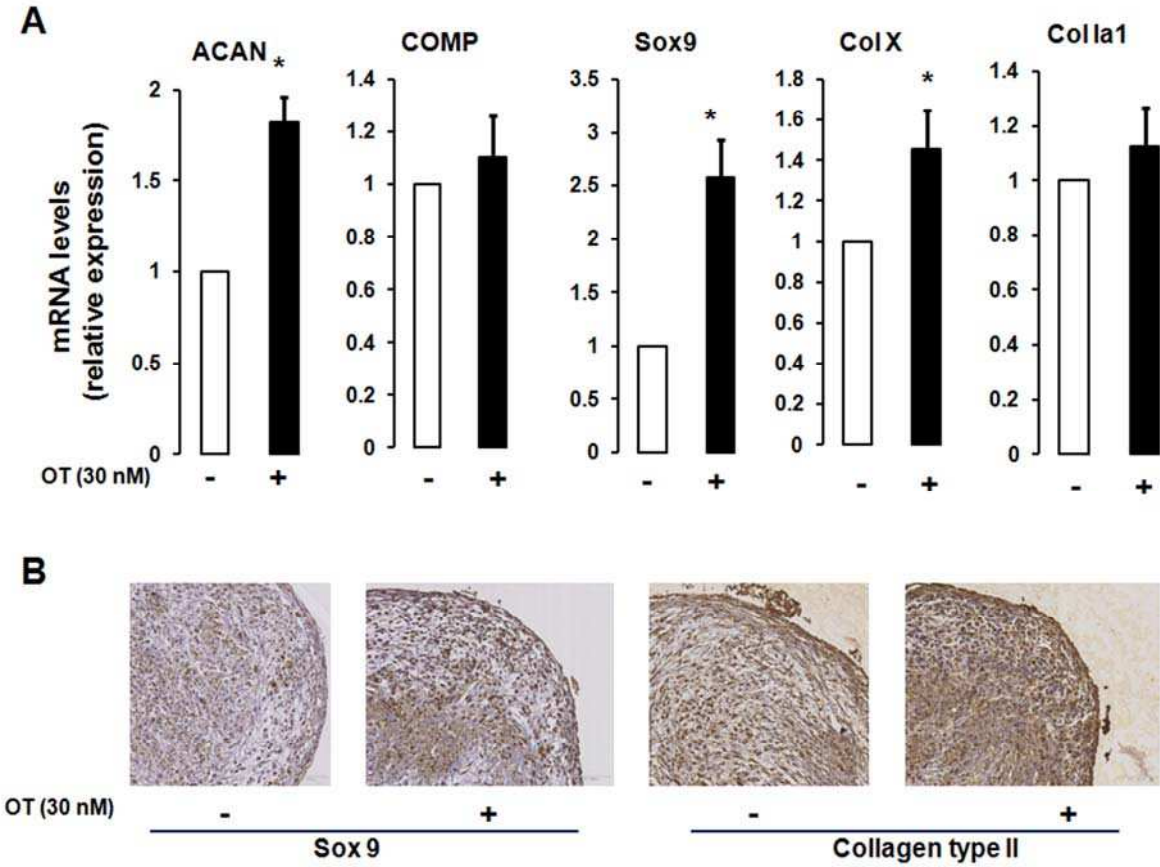
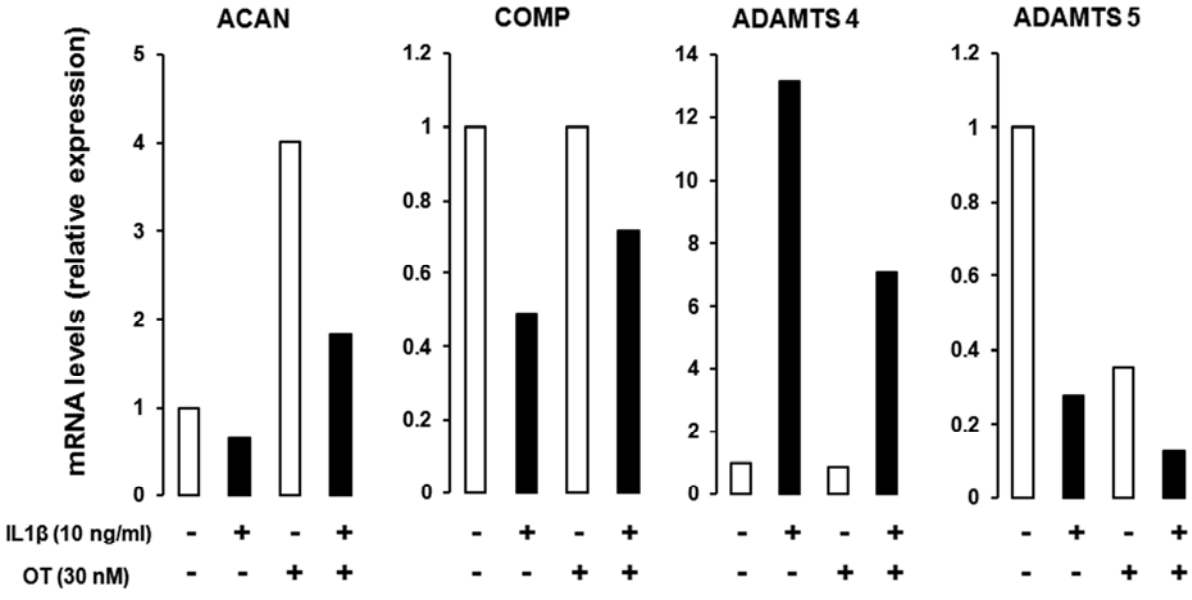


Figure 4



## b) Discussion

Nous avons montré dans notre travail que l'ocytocine avait un rôle dans la différenciation chondrocytaire à travers sa capacité à augmenter l'expression de marqueurs chondrogéniques tels que l'aggrecane et Sox9 mais aussi comme cela a été montré par l'immuno-coloration avec le col11.

Ces dernières années ont vu s'effriter le dogme de l'opposition entre l'ostéoporose et l'arthrose considérées pour certains comme deux maladies opposées, l'une touchant l'os dur et l'autre touchant l'os mou. Les preuves d'une physiopathologie finalement proche ont été mises en avant avec notamment la présence de progéniteurs communs.

Notre laboratoire avait déjà démontré au préalable le rôle positif de l'ocytocine dans l'ostéoporose [7]. Nos résultats montrent de façon intéressante que cette hormone semble avoir un rôle positif aussi dans l'arthrose. On retrouve des récepteurs à l'ocytocine dans de nombreux tissus de l'organisme. Il est bien connu que le tissu adipeux possède ces récepteurs. Le rôle du tissu adipeux, au travers de l'action des adipokines, commence à être mis en avant dans l'arthrose. Certains évoquent ainsi la possibilité d'une maladie systémique. Il a été mis en évidence que le tissu adipeux sécrétait des cytokines et autres molécules pro-inflammatoires dont le TNF $\alpha$ , l'Il-6 et l'Il-1 et les adipokines... mais aussi des cytokines anti inflammatoires telles que l'Il10 et L'Il1Ra [431]. Des travaux ont montré que l'injection d'ocytocine chez les souris permettait de réduire la quantité de tissu adipeux (Manuscrit en cours de soumission). Il est possible que l'action de l'ocytocine se fasse entre autres par une action sur ces cytokines inflammatoires. Dans notre travail, nous montrons que la présence d'ocytocine influe sur l'action de l'IL-1. Cela mériterait d'être exploré *in vivo*.

## I. DISCUSSION

Compte tenu du vieillissement attendu de la population des pays occidentaux, en France en 2035, les personnes de plus de 75 ans devraient représenter 13,6% de la population (contre 8,5% en 2007). L'arthrose dont la fréquence augmente avec l'âge va poser un véritable problème de santé publique. Elle représente d'ailleurs déjà une priorité de santé publique. Il s'agit de la pathologie dont la prévalence est la plus élevée en Rhumatologie. Elle est responsable d'une morbidité majeure, elle constitue une cause majeure d'invalidité mais aussi de mortalité [1-5]. Sa fausse image de parent pauvre de la Rhumatologie vient d'une méconnaissance de la maladie sous ses aspects épidémiologiques et physiopathologiques, et aussi de l'absence de traitement curatif.

Les données épidémiologiques sont essentielles, car elles permettent une meilleure connaissance de la maladie et donc contribuent aux avancées cliniques, thérapeutiques et fondamentales et à la conduite des différentes politiques de santé publique. En France, jusqu'à peu il n'existait aucune donnée épidémiologique en population générale sur l'arthrose des membres inférieurs. Les travaux que j'ai conduit ont permis d'apporter les premiers chiffres de prévalence en population générale que ce soit pour la gonarthrose fémoro-patellaire symptomatique mais aussi pour la coxarthrose symptomatique. Il s'agissait de l'étape préalable essentielle à la réalisation d'une étude de prévalence nationale et surtout à la constitution d'une cohorte de cas prévalents d'arthrose symptomatique de hanche et de genou. La constitution de cette cohorte nationale qui en est à sa cinquième année de suivi est l'opportunité de réaliser des projets ancillaires et ainsi répondre à des questions encore restées sans réponse notamment sur l'épidémiologie de cette maladie. Etant membre de son conseil scientifique, je compte profiter de cette opportunité en particulier avec deux études en cours portant sur le rôle du tabac dans l'arthrose et sur l'association entre arthrose des membres inférieurs et arthrose des mains.



La deuxième partie de mon travail de thèse a porté sur l'aspect clinique de la maladie et notamment sur l'évaluation des outils diagnostiques à notre disposition. Pour le diagnostic d'une gonarthrose, il est communément reconnu de faire pratiquer au patient un cliché de face debout en charge et un cliché postéro antérieur en flexion de 30° dit en Schuss. Cette association de clichés représente un coût pour la société compte tenu de la fréquence de la maladie mais aussi d'une irradiation supplémentaire surtout qu'il s'agit souvent de sujets présentant une arthrose diffuse et donc susceptibles de nécessiter de multiples autres clichés. Nous avons donc comparé la valeur diagnostic d'un cliché en Schuss seul versus l'association cliché en Schuss et en extension. Nos résultats viennent d'être présentés au congrès français de Rhumatologie, ils montrent que la réalisation d'un cliché en Schuss pourrait être suffisante pour la diagnostic d'une gonarthrose. Ces résultats sont à mettre en perspective du coût que représente la réalisation systématique de clichés en extension en sus compte tenu de la fréquence de la pathologie.

Ces dernières années ont vu croître le nombre de publications relatives à la physiopathologie de l'arthrose avec une avancée notable de sa connaissance. Cependant, de nombreux aspects restent incompris. La partie fondamentale de mon travail de thèse a porté sur deux aspects étroitement liés. Il s'agissait de démontrer un rôle de l'ocytocine dans l'arthrose. Le rôle de l'ocytocine ayant déjà été démontré dans l'ostéoporose par notre laboratoire, ostéoblastes et chondrocytes possédant le même progéniteur. La première étape dont nous venons de publier les résultats a porté sur la mise en évidence des capacités chondrogéniques des cellules hMADS et en tant qu'outil pharmacologique potentiellement intéressant [432]. Ce qui nous a permis par la suite dans une deuxième étape de tester l'effet de l'ocytocine dans un modèle cellulaire aux caractéristiques intéressantes et adaptées pour tester l'effet d'une hormone. Nos résultats sont intéressants puisqu'ils montrent un effet positif de l'ocytocine sur la constitution de la matrice avec l'augmentation de l'aggrecane, du Sox9 et du Col11.

Cet effet *in vitro*, doit être confirmé par une étude *in vivo* réalisée chez l'animal en collaboration avec l'équipe du Professeur Gillet (Nancy). Dans cette étude, nous avons choisi un modèle de rat ligamentoplasté. Quatre groupes ont été constitués : deux groupes de rats ayant subi une ligamentoplastie avec ou sans injection

quotidienne d'ocytocine et deux groupes opérés et sans ligamentoplastie avec ou sans injection d'ocytocine pendant 28 jours. Les analyses sont en cours et non encore disponibles à cette date.

Enfin, une partie de cette étude a portée sur le dosage de l'ocytocine chez des patients présentant une arthrose digitale érosive sévère. Il s'agit d'une étude ancillaire d'ADEM (PHRC régional visant à tester l'efficacité du methotrexate dans l'arthrose digitale). Les résultats sont là aussi en cours d'analyse à ce jour.

## II. PERSPECTIVES

Nous avons mis en avant avec notre étude portant sur la comparaison de deux protocoles diagnostics de la gonarthrose que la réalisation d'un cliché en Schuss seul était suffisant pour le diagnostic d'une gonarthrose en pratique courante. Cette étude va être suivie de l'analyse du caractère prédictif du Schuss seul sur l'évolution de la fonctionnalité mais aussi sur l'évolution structurale en comparaison à l'association du Schuss et du cliché antéro-postérieur de Face. Cette étude est en cours et devrait renforcer la décision de ne pratiquer en routine qu'un seul cliché. Ce qui pourrait permettre une économie substantielle compte tenu de la fréquence de cette pathologie.

Mon implication au sein de la cohorte Khoala et mes travaux sur l'épidémiologie et notamment l'épidémiologie de l'arthrose vont me permettre de poursuivre l'étude de l'épidémiologie spatiale et descriptive de l'arthrose avec des travaux déjà engagés (cités au préalable) et à venir.

Alors que les solutions thérapeutiques dans l'arthrose sont finalement peu nombreuses et surtout d'une efficacité discutable puisqu'il est question de dérembourser un certain nombre de traitements utilisés en pratique courante, l'étude ADEM (PHRC régional dont CHU de Nice est promoteur) que j'ai mené et qui vise à tester l'efficacité du méthotrexate dans l'arthrose digitale érosive pourrait amener un

espoir thérapeutique pour ces formes sévères d'arthrose. L'analyse est à ce jour en cours.

Mes travaux sur les cellules hMADS, ont montré qu'elles représentent un outil intéressant pour étudier la chondrogenèse et notamment l'influence de facteurs tels que la nicotine, l'ocytocine ou d'autres. De par leurs caractéristiques et notamment leur capacité d'auto-renouvellement ces cellules sont un outil intéressant pour des tests pharmacologiques comme nous l'avons fait avec la nicotine. Nous avons révélé un rôle de l'ocytocine sur la chondrogenèse et ainsi montré qu'outre son action dans l'ostéoporose elle pourrait aussi avoir un rôle dans l'arthrose. Une extension de ce travail pourrait être une étude IRM haut champs (7 Tesla) chez l'animal que nous pourrions faire en collaboration avec d'autres équipes et qui permettrait de mettre en évidence de façon précise les différences d'évolution structurales chez les rats qu'ils soient traités ou pas par ocytocine.

Nos travaux offrent aussi la possibilité de prolonger notre recherche particulièrement quant au rôle du tissu adipeux dans l'arthrose, en profitant ainsi de l'expertise de mon laboratoire d'accueil, les données récentes de la littérature montrent qu'il est un des acteurs important de la physiopathologie de l'arthrose, notamment au travers de la synthèse des adipokines. Il s'agit donc là d'une voie de recherche particulièrement prometteuse qui ne demande qu'à être explorée.

### III. Références :

1. Sharma L, Kapoor D, Issa S: **Epidemiology of osteoarthritis: an update.** *Curr Opin Rheumatol* 2006, **18**(2):147-156.
2. Felson DT: **An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis.** *Radiol Clin North Am* 2004, **42**(1):1-9, v.
3. Nuesch E, Dieppe P, Reichenbach S, Williams S, Iff S, Juni P: **All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study.** *BMJ* 2011, **342**:d1165.
4. Hochberg MC: **Mortality in osteoarthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 2008, **26**(5 Suppl 51):S120-124.
5. Haugen IK, Ramachandran VS, Misra D, Neogi T, Niu J, Yang T, Zhang Y, Felson DT: **Hand osteoarthritis in relation to mortality and incidence of cardiovascular disease: data from the Framingham Heart Study.** *Ann Rheum Dis* 2013.
6. Zingg HH, Laporte SA: **The oxytocin receptor.** *Trends Endocrinol Metab* 2003, **14**(5):222-227.
7. Elabd C, Basillais A, Beaupied H, Breuil V, Wagner N, Scheideler M, Zaragosi LE, Massiera F, Lemichez E, Trajanoski Z *et al*: **Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis.** *Stem Cells* 2008, **26**(9):2399-2407.
8. Tamma R, Colaianne G, Zhu LL, DiBenedetto A, Greco G, Montemurro G, Patano N, Strippoli M, Vergari R, Mancini L *et al*: **Oxytocin is an anabolic bone hormone.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(17):7149-7154.
9. Sellam J, Berenbaum F: **[Arthrosis].** *Rev Prat* 2011, **61**(5):675-685; quiz 686.
10. Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Gray R *et al*: **The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**(11):1601-1610.
11. Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Feldman D *et al*: **The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip.** *Arthritis Rheum* 1991, **34**(5):505-514.
12. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M *et al*: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**(8):1039-1049.
13. Abhishek A, Doherty M: **Diagnosis and clinical presentation of osteoarthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 2013, **39**(1):45-66.
14. Kwok WY, Kloppenburg M, Marshall M, Nicholls E, Rosendaal FR, van der Windt DA, Peat G: **Comparison of clinical burden between patients with erosive hand osteoarthritis and inflammatory arthritis in symptomatic community-dwelling adults: the Keele clinical assessment studies.** *Rheumatology (Oxford)* 2013.
15. Marshall M, Peat G, Nicholls E, van der Windt D, Myers H, Dziedzic K: **Subsets of symptomatic hand osteoarthritis in community-dwelling older adults in the United Kingdom: prevalence, inter-relationships, risk factor profiles and clinical characteristics at baseline and 3-years.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013.

16. Cushnaghan J, Dieppe P: **Study of 500 patients with limb joint osteoarthritis. I. Analysis by age, sex, and distribution of symptomatic joint sites.** *Ann Rheum Dis* 1991, **50**(1):8-13.
17. Zhang W, Doherty M, Leeb BF, Alekseeva L, Arden NK, Bijlsma JW, Dincer F, Dziedzic K, Hauselmann HJ, Kaklamanis P *et al*: **EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of hand osteoarthritis: report of a task force of ESCISIT.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68**(1):8-17.
18. Lafeber FP, van Spil WE: **Osteoarthritis year 2013 in review: biomarkers; reflecting before moving forward, one step at a time.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(10):1452-1464.
19. Hunter DJ, Zhang YQ, Tu X, Lavalley M, Niu JB, Amin S, Guermazi A, Genant H, Gale D, Felson DT: **Change in joint space width: hyaline articular cartilage loss or alteration in meniscus?** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(8):2488-2495.
20. Guermazi A, Burstein D, Conaghan P, Eckstein F, Hellio Le Graverand-Gastineau MP, Keen H, Roemer FW: **Imaging in osteoarthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 2008, **34**(3):645-687.
21. Buckland W: **Radiographic assessment of osteoarthritis: comparison between existing methodologies.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**(4):430-433.
22. Buckland-Wright C: **Which radiographic techniques should we use for research and clinical practice?** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**(1):39-55.
23. Lynch JA, Buckland-Wright JC, Macfarlane DG: **Precision of joint space width measurement in knee osteoarthritis from digital image analysis of high definition macroradiographs.** *Osteoarthritis Cartilage* 1993, **1**(4):209-218.
24. Buckland-Wright C: **Protocols for precise radio-anatomical positioning of the tibiofemoral and patellofemoral compartments of the knee.** *Osteoarthritis Cartilage* 1995, **3 Suppl A**:71-80.
25. Piperno M, Hellio Le Graverand MP, Conrozier T, Bochu M, Mathieu P, Vignon E: **Quantitative evaluation of joint space width in femorotibial osteoarthritis: comparison of three radiographic views.** *Osteoarthritis Cartilage* 1998, **6**(4):252-259.
26. Mazuca SA, Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Hunter DJ, Jackson CG, Kraus VB, Link TM, Schnitzer TJ, Vaz A, Charles HC: **Performance of a non-fluoroscopically assisted substitute for the Lyon schuss knee radiograph: quality and reproducibility of positioning and sensitivity to joint space narrowing in osteoarthritic knees.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(12):1555-1559.
27. Peterfy C, Li J, Zaim S, Duryea J, Lynch J, Miaux Y, Yu W, Genant HK: **Comparison of fixed-flexion positioning with fluoroscopic semi-flexed positioning for quantifying radiographic joint-space width in the knee: test-retest reproducibility.** *Skeletal Radiol* 2003, **32**(3):128-132.
28. Buckland-Wright JC, Wolfe F, Ward RJ, Flowers N, Hayne C: **Substantial superiority of semiflexed (MTP) views in knee osteoarthritis: a comparative radiographic study, without fluoroscopy, of standing extended, semiflexed (MTP), and schuss views.** *J Rheumatol* 1999, **26**(12):2664-2674.
29. Vignon E, Conrozier T, Piperno M, Richard S, Carrillon Y, Fantino O: **Radiographic assessment of hip and knee osteoarthritis. Recommendations: recommended guidelines.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**(4):434-436.
30. Preville AM, Lavigne P, Buschmann MD, Hardin J, Han Q, Djerroud L, Savard P: **Electroarthrography: a novel method to assess articular cartilage and diagnose osteoarthritis by non-invasive measurement of load-induced electrical potentials at the surface of the knee.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013.
31. Mosher TJ, Walker EA, Petscavage-Thomas J, Guermazi A: **Osteoarthritis year 2013 in review: imaging.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(10):1425-1435.
32. Klauser AS, Faschingbauer R, Kupferthaler K, Feuchnter G, Wick MC, Jaschke WR, Mur E: **Sonographic criteria for therapy follow-up in the course of ultrasound-guided intra-**

- articular injections of hyaluronic acid in hand osteoarthritis.** *Eur J Radiol* 2012, **81**(7):1607-1611.
33. Kortekaas MC, Kwok WY, Reijnierse M, Huizinga TW, Kloppenburg M: **In erosive hand osteoarthritis more inflammatory signs on ultrasound are found than in the rest of hand osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(6):930-934.
  34. Arden N, Nevitt MC: **Osteoarthritis: epidemiology.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**(1):3-25.
  35. **The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium.** *World Health Organ Tech Rep Ser* 2003, **919**:i-x, 1-218, back cover.
  36. Rabenda V, Manette C, Lemmens R, Mariani AM, Struvay N, Reginster JY: **Prevalence and impact of osteoarthritis and osteoporosis on health-related quality of life among active subjects.** *Aging Clin Exp Res* 2007, **19**(1):55-60.
  37. Kellgren JH: **Osteoarthrosis in patients and populations.** *Br Med J* 1961, **2**(5243):1-6.
  38. Byers PD, Contepomi CA, Farkas TA: **A post mortem study of the hip joint. Including the prevalence of the features of the right side.** *Ann Rheum Dis* 1970, **29**(1):15-31.
  39. Kellgren JH, Lawrence JS: **Radiological assessment of osteo-arthrosis.** *Ann Rheum Dis* 1957, **16**(4):494-502.
  40. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA: **Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations.** *Ann Rheum Dis* 1989, **48**(4):271-280.
  41. Bagge E, Bjelle A, Eden S, Svanborg A: **Osteoarthritis in the elderly: clinical and radiological findings in 79 and 85 year olds.** *Ann Rheum Dis* 1991, **50**(8):535-539.
  42. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG *et al*: **Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(5):778-799.
  43. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF: **The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study.** *Arthritis Rheum* 1987, **30**(8):914-918.
  44. Nevitt MC, Lane NE, Scott JC, Hochberg MC, Pressman AR, Genant HK, Cummings SR: **Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(7):907-916.
  45. Maurer K: **Basic data on arthritis knee, hip, and sacroiliac joints in adults ages 25-74 years.** *Vital Health Stat 11* 1979(213):1-31.
  46. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G: **A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(9):769-781.
  47. Felson DT: **Epidemiology of hip and knee osteoarthritis.** *Epidemiol Rev* 1988, **10**:1-28.
  48. Mannoni A, Briganti MP, Di Bari M, Ferrucci L, Costanzo S, Serni U, Masotti G, Marchionni N: **Epidemiological profile of symptomatic osteoarthritis in older adults: a population based study in Dicomano, Italy.** *Ann Rheum Dis* 2003, **62**(6):576-578.
  49. Salaffi F, De Angelis R, Grassi W: **Prevalence of musculoskeletal conditions in an Italian population sample: results of a regional community-based study. I. The MAPPING study.** *Clin Exp Rheumatol* 2005, **23**(6):819-828.
  50. Andrianakos A, Trontzas P, Christoyannis F, Kaskani E, Nikolia Z, Tavaniotou E, Georgountzos A, Krachtis P: **Prevalence and management of rheumatoid arthritis in the general population of Greece--the ESORDIG study.** *Rheumatology (Oxford)* 2006, **45**(12):1549-1554.
  51. Guillemin F, Rat AC, Mazieres B, Pouchot J, Fautrel B, Euller-Ziegler L, Fardellone P, Morvan J, Roux CH, Verrouil E *et al*: **Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey.** *Osteoarthritis Cartilage* 2011, **19**(11):1314-1322.

52. Guillemin F, Rat AC, Roux CH, Fautrel B, Mazieres B, Chevalier X, Euller-Ziegler L, Fardellone P, Verrouil E, Morvan J *et al*: **The KHOALA cohort of knee and hip osteoarthritis in France.** *Joint Bone Spine* 2012, **79**(6):597-603.
53. Wilson MG, Michet CJ, Jr., Ilstrup DM, Melton LJ, 3rd: **Idiopathic symptomatic osteoarthritis of the hip and knee: a population-based incidence study.** *Mayo Clin Proc* 1990, **65**(9):1214-1221.
54. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM: **Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(8):1134-1141.
55. Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, Mallon KP: **Knee osteoarthritis and physical functioning: evidence from the NHANES I Epidemiologic Followup Study.** *J Rheumatol* 1991, **18**(4):591-598.
56. Maleki-Fischbach M, Jordan JM: **New developments in osteoarthritis. Sex differences in magnetic resonance imaging-based biomarkers and in those of joint metabolism.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(4):212.
57. Dougados M, Gueguen A, Nguyen M, Berdah L, Lequesne M, Mazieres B, Vignon E: **Radiological progression of hip osteoarthritis: definition, risk factors and correlations with clinical status.** *Ann Rheum Dis* 1996, **55**(6):356-362.
58. Ledingham J, Dawson S, Preston B, Milligan G, Doherty M: **Radiographic progression of hospital referred osteoarthritis of the hip.** *Ann Rheum Dis* 1993, **52**(4):263-267.
59. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN, Aliabadi P, Levy D: **The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(10):1500-1505.
60. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM: **Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products.** *J Biol Chem* 2000, **275**(50):39027-39031.
61. Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im HJ, Bursch LS, Yan SD: **Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(8):2376-2385.
62. Aigner T, Rose J, Martin J, Buckwalter J: **Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology.** *Rejuvenation Res* 2004, **7**(2):134-145.
63. Forsyth CB, Cole A, Murphy G, Bienias JL, Im HJ, Loeser RF, Jr.: **Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005, **60**(9):1118-1124.
64. Kellgren JH, Moore R: **Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes.** *Br Med J* 1952, **1**(4751):181-187.
65. Tanko LB, Sondergaard BC, Oestergaard S, Karsdal MA, Christiansen C: **An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage.** *Climacteric* 2008, **11**(1):4-16.
66. Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, Chaisson CE, Klein R, Wilson PW, Felson DT: **Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(10):1867-1873.
67. Barrett-Connor E: **Postmenopausal estrogen therapy and selected (less-often-considered) disease outcomes.** *Menopause* 1999, **6**(1):14-20.
68. Felson DT, Nevitt MC: **The effects of estrogen on osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 1998, **10**(3):269-272.
69. Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Kannel WB: **Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. The Framingham Osteoarthritis Study.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**(4):525-532.
70. Samanta A, Jones A, Regan M, Wilson S, Doherty M: **Is osteoarthritis in women affected by hormonal changes or smoking?** *Br J Rheumatol* 1993, **32**(5):366-370.

71. Oliveria SA, Felson DT, Klein RA, Reed JI, Walker AM: **Estrogen replacement therapy and the development of osteoarthritis.** *Epidemiology* 1996, **7**(4):415-419.
72. Nevitt MC, Felson DT: **Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence.** *Ann Rheum Dis* 1996, **55**(9):673-676.
73. Nevitt MC, Felson DT, Williams EN, Grady D: **The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(4):811-818.
74. Carbone LD, Nevitt MC, Wildy K, Barrow KD, Harris F, Felson D, Peterfy C, Visser M, Harris TB, Wang BW *et al*: **The relationship of antiresorptive drug use to structural findings and symptoms of knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(11):3516-3525.
75. Berenbaum F: **Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!).** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(1):16-21.
76. Stecher RM: **Heberden's notes; the importance of osteoarthritis of the fingers to the practicing physician.** *Practitioner* 1948, **161**(963):176-179.
77. Loughlin J: **Genetic epidemiology of primary osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2001, **13**(2):111-116.
78. Keen RW, Hart DJ, Lanchbury JS, Spector TD: **Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(8):1444-1449.
79. Willenberg E, Kaliski D, Krumbholz S: **[Justification of bitemporal decompressive trepanation with duroplasty in severe closed craniocerebral injury].** *Zentralbl Neurochir* 1978, **39**(2):191-196.
80. Uitterlinden AG, Burger H, van Duijn CM, Huang Q, Hofman A, Birkenhager JC, van Leeuwen JP, Pols HA: **Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(7):1456-1464.
81. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Nishioka J, Ohkubo I, Hukuda S: **Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis.** *J Rheumatol* 1998, **25**(1):134-137.
82. Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, van Leeuwen JP, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Pols HA: **Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(7):1913-1922.
83. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D: **Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study.** *BMJ* 1996, **312**(7036):940-943.
84. Roberts J, Burch TA: **Osteoarthritis prevalence in adults by age, sex, race, and geographic area.** *Vital Health Stat 11* 1966(15):1-27.
85. Suarez-Almazor ME, Soucek J, Kelly PA, O'Malley K, Byrne M, Richardson M, Pak C: **Ethnic variation in knee replacement: patient preferences or uninformed disparity?** *Arch Intern Med* 2005, **165**(10):1117-1124.
86. Solomon L, Beighton P, Lawrence JS: **Osteoarthrosis in a rural South African Negro population.** *Ann Rheum Dis* 1976, **35**(3):274-278.
87. Lane NE, Lin P, Christiansen L, Gore LR, Williams EN, Hochberg MC, Nevitt MC: **Association of mild acetabular dysplasia with an increased risk of incident hip osteoarthritis in elderly white women: the study of osteoporotic fractures.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(2):400-404.
88. Andriacchi TP: **Dynamics of knee malalignment.** *Orthop Clin North Am* 1994, **25**(3):395-403.
89. Herold G, Stephan B, Menzel T: **[Adverse effects of administration of carbohydrates during long-term parenteral feeding].** *Infusionsther Klin Ernahr* 1979, **6**(4):220-222.
90. Barr RJ, Gregory JS, Reid DM, Aspden RM, Yoshida K, Hosie G, Silman AJ, Alesci S, Macfarlane GJ: **Predicting OA progression to total hip replacement: can we do better than risk factors**



- alone using active shape modelling as an imaging biomarker? *Rheumatology (Oxford)* 2012, **51**(3):562-570.
91. Wise BL, Niu J, Yang M, Lane NE, Harvey W, Felson DT, Hietpas J, Nevitt M, Sharma L, Torner J *et al*: **Patterns of compartment involvement in tibiofemoral osteoarthritis in men and women and in whites and African Americans.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012, **64**(6):847-852.
  92. Cooper C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D, Dieppe PA: **Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(5):995-1000.
  93. Sowers MF, Hochberg M, Crabbe JP, Muhich A, Crutchfield M, Updike S: **Association of bone mineral density and sex hormone levels with osteoarthritis of the hand and knee in premenopausal women.** *Am J Epidemiol* 1996, **143**(1):38-47.
  94. Sowers M, Lachance L, Jamadar D, Hochberg MC, Hollis B, Crutchfield M, Jannausch ML: **The associations of bone mineral density and bone turnover markers with osteoarthritis of the hand and knee in pre- and perimenopausal women.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(3):483-489.
  95. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ: **Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis.** *Ann Intern Med* 2000, **133**(5):321-328.
  96. Roos H, Lauren M, Adalberth T, Roos EM, Jonsson K, Lohmander LS: **Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(4):687-693.
  97. Englund M, Paradowski PT, Lohmander LS: **Association of radiographic hand osteoarthritis with radiographic knee osteoarthritis after meniscectomy.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(2):469-475.
  98. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H: **High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(10):3145-3152.
  99. Doherty M, Watt I, Dieppe P: **Influence of primary generalised osteoarthritis on development of secondary osteoarthritis.** *Lancet* 1983, **2**(8340):8-11.
  100. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y *et al*: **Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors.** *Ann Intern Med* 2000, **133**(8):635-646.
  101. Manninen P, Riihimaki H, Heliovaara M, Makela P: **Overweight, gender and knee osteoarthritis.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996, **20**(6):595-597.
  102. Anderson JJ, Felson DT: **Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work.** *Am J Epidemiol* 1988, **128**(1):179-189.
  103. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF: **Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study.** *Ann Intern Med* 1988, **109**(1):18-24.
  104. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B, Aliabadi P, Levy D: **Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(4):728-733.
  105. Spector TD, Hart DJ, Doyle DV: **Incidence and progression of osteoarthritis in women with unilateral knee disease in the general population: the effect of obesity.** *Ann Rheum Dis* 1994, **53**(9):565-568.
  106. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ: **Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis.** *Am J Med* 1999, **107**(6):542-548.

107. Schouten JS, van den Ouweland FA, Valkenburg HA: **A 12 year follow up study in the general population on prognostic factors of cartilage loss in osteoarthritis of the knee.** *Ann Rheum Dis* 1992, **51**(8):932-937.
108. Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ: **Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study.** *Ann Intern Med* 1992, **116**(7):535-539.
109. **Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(9):1905-1915.
110. Fernandes L, Hagen KB, Bijlsma JW, Andreassen O, Christensen P, Conaghan PG, Doherty M, Geenen R, Hammond A, Kjekens I *et al*: **EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(7):1125-1135.
111. Aaboe J, Bliddal H, Messier SP, Alkjaer T, Henriksen M: **Effects of an intensive weight loss program on knee joint loading in obese adults with knee osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2011, **19**(7):822-828.
112. Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Sangha O, Liang MH, Grodstein F: **Total hip replacement due to osteoarthritis: the importance of age, obesity, and other modifiable risk factors.** *Am J Med* 2003, **114**(2):93-98.
113. Vingard E, Alfredsson L, Malchau H: **Lifestyle factors and hip arthrosis. A case referent study of body mass index, smoking and hormone therapy in 503 Swedish women.** *Acta Orthop Scand* 1997, **68**(3):216-220.
114. Cooper C, Inskip H, Croft P, Campbell L, Smith G, McLaren M, Coggon D: **Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity.** *Am J Epidemiol* 1998, **147**(6):516-522.
115. Apold H, Meyer HE, Espehaug B, Nordsletten L, Havelin LI, Flugsrud GB: **Weight gain and the risk of total hip replacement a population-based prospective cohort study of 265,725 individuals.** *Osteoarthritis Cartilage* 2011, **19**(7):809-815.
116. Sharma AR, Jagga S, Lee SS, Nam JS: **Interplay between Cartilage and Subchondral Bone Contributing to Pathogenesis of Osteoarthritis.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**(10):19805-19830.
117. Issa RI, Griffin TM: **Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation.** *Pathobiol Aging Age Relat Dis* 2012, **2**(2012).
118. Spector TD, Hart DJ, Nandra D, Doyle DV, Mackillop N, Gallimore JR, Pepys MB: **Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(4):723-727.
119. Sowers M, Jannausch M, Stein E, Jamadar D, Hochberg M, Lachance L: **C-reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(8):595-601.
120. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T: **Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow-up of the ROAD study.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(11):1217-1226.
121. Karvonen-Gutierrez CA, Sowers MR, Heeringa SG: **Sex dimorphism in the association of cardiometabolic characteristics and osteophytes-defined radiographic knee osteoarthritis among obese and non-obese adults: NHANES III.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(7):614-621.
122. Lee S, Kim TN, Kim SH: **Sarcopenic obesity is more closely associated with knee osteoarthritis than is nonsarcopenic obesity: a cross-sectional study.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**(12):3947-3954.
123. Yusuf E: **Metabolic factors in osteoarthritis: obese people do not walk on their hands.** *Arthritis Res Ther* 2012, **14**(4):123.

124. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: **Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance.** *Science* 1993, **259**(5091):87-91.
125. Berenbaum F, Eymard F, Houard X: **Osteoarthritis, inflammation and obesity.** *Curr Opin Rheumatol* 2013, **25**(1):114-118.
126. Toussiroot E, Streit G, Wendling D: **The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases.** *Curr Med Chem* 2007, **14**(10):1095-1100.
127. Koskinen A, Vuolteenaho K, Nieminen R, Moilanen T, Moilanen E: **Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients.** *Clin Exp Rheumatol* 2011, **29**(1):57-64.
128. Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, Cho HL: **Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis.** *Clin Rheumatol* 2009, **28**(12):1431-1435.
129. Chaisson CE, Zhang Y, Sharma L, Kannel W, Felson DT: **Grip strength and the risk of developing radiographic hand osteoarthritis: results from the Framingham Study.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(1):33-38.
130. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, Katz BP, Mazucca SA, Braunstein EM, Byrd D: **Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women?** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(11):1951-1959.
131. Sattler M, Dannhauer T, Hudelmaier M, Wirth W, Sanger AM, Kwok CK, Hunter DJ, Eckstein F: **Side differences of thigh muscle cross-sectional areas and maximal isometric muscle force in bilateral knees with the same radiographic disease stage, but unilateral frequent pain - data from the osteoarthritis initiative.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(6):532-540.
132. Wang Y, Wluka AE, Berry PA, Siew T, Teichtahl AJ, Urquhart DM, Lloyd DG, Jones G, Cicuttini FM: **Increase in vastus medialis cross-sectional area is associated with reduced pain, cartilage loss, and joint replacement risk in knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**(12):3917-3925.
133. Sharma L, Dunlop DD, Cahue S, Song J, Hayes KW: **Quadriceps strength and osteoarthritis progression in malaligned and lax knees.** *Ann Intern Med* 2003, **138**(8):613-619.
134. Bridges AJ, Smith E, Reid J: **Joint hypermobility in adults referred to rheumatology clinics.** *Ann Rheum Dis* 1992, **51**(6):793-796.
135. Kraus VB, Li YJ, Martin ER, Jordan JM, Renner JB, Doherty M, Wilson AG, Moskowitz R, Hochberg M, Loeser R *et al*: **Articular hypermobility is a protective factor for hand osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(7):2178-2183.
136. Buckwalter JA, Lane NE: **Athletics and osteoarthritis.** *Am J Sports Med* 1997, **25**(6):873-881.
137. Hansen P, English M, Willick SE: **Does running cause osteoarthritis in the hip or knee?** *PM R* 2012, **4**(5 Suppl):S117-121.
138. Vingard E, Alfredsson L, Goldie I, Hogstedt C: **Sports and osteoarthrosis of the hip. An epidemiologic study.** *Am J Sports Med* 1993, **21**(2):195-200.
139. Kujala UM, Kaprio J, Sarna S: **Osteoarthritis of weight bearing joints of lower limbs in former elite male athletes.** *BMJ* 1994, **308**(6923):231-234.
140. Kujala UM, Kettunen J, Paananen H, Aalto T, Battie MC, Impivaara O, Videman T, Sarna S: **Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(4):539-546.
141. Spector TD, Harris PA, Hart DJ, Cicuttini FM, Nandra D, Etherington J, Wolman RL, Doyle DV: **Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**(6):988-995.
142. Kirkhorn S, Greenlee RT, Reeser JC: **The epidemiology of agriculture-related osteoarthritis and its impact on occupational disability.** *WMJ* 2003, **102**(7):38-44.
143. Fackrell HB, Wiseman GM: **Properties of the gamma haemolysin of Staphylococcus aureus 'Smith 5R'.** *J Gen Microbiol* 1976, **92**(1):11-24.

144. Lawrence JS: **Rheumatism in cotton operatives.** *Br J Ind Med* 1961, **18**:270-276.
145. Hadler NM, Gillings DB, Imbus HR, Levitin PM, Makuc D, Utsinger PD, Yount WJ, Slusser D, Moskovitz N: **Hand structure and function in an industrial setting.** *Arthritis Rheum* 1978, **21**(2):210-220.
146. Sandmark H, Hogstedt C, Lewold S, Vingard E: **Osteoarthrosis of the knee in men and women in association with overweight, smoking, and hormone therapy.** *Ann Rheum Dis* 1999, **58**(3):151-155.
147. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Hannan MT, Kannel WB, Meenan RF: **Does smoking protect against osteoarthritis?** *Arthritis Rheum* 1989, **32**(2):166-172.
148. Hochberg MC, Lawrence RC, Everett DF, Cornoni-Huntley J: **Epidemiologic associations of pain in osteoarthritis of the knee: data from the National Health and Nutrition Examination Survey and the National Health and Nutrition Examination-I Epidemiologic Follow-up Survey.** *Semin Arthritis Rheum* 1989, **18**(4 Suppl 2):4-9.
149. Amin S, Niu J, Guermazi A, Grigoryan M, Hunter DJ, Clancy M, LaValley MP, Genant HK, Felson DT: **Cigarette smoking and the risk for cartilage loss and knee pain in men with knee osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**(1):18-22.
150. Hui M, Doherty M, Zhang W: **Does smoking protect against osteoarthritis? Meta-analysis of observational studies.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(7):1231-1237.
151. Pearce F, Hui M, Ding C, Doherty M, Zhang W: **Does smoking reduce the progression of osteoarthritis? Meta-analysis of observational studies.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013, **65**(7):1026-1033.
152. McAlindon TE, Jacques P, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B, Rush D, Levy D, Felson DT: **Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis?** *Arthritis Rheum* 1996, **39**(4):648-656.
153. McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B, Rush D, Wilson PW, Jacques P: **Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study.** *Ann Intern Med* 1996, **125**(5):353-359.
154. Neogi T, Booth SL, Zhang YQ, Jacques PF, Terkeltaub R, Aliabadi P, Felson DT: **Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(4):1255-1261.
155. Misra D, Booth SL, Tolstykh I, Felson DT, Nevitt MC, Lewis CE, Torner J, Neogi T: **Vitamin K deficiency is associated with incident knee osteoarthritis.** *Am J Med* 2013, **126**(3):243-248.
156. Oka H, Akune T, Muraki S, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Sasaki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: **Association of low dietary vitamin K intake with radiographic knee osteoarthritis in the Japanese elderly population: dietary survey in a population-based cohort of the ROAD study.** *J Orthop Sci* 2009, **14**(6):687-692.
157. Wang W, Wei S, Luo M, Yu B, Cao J, Yang Z, Wang Z, Goldring MB, Chen J: **Oxidative stress and status of antioxidant enzymes in children with Kashin-Beck disease.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013.
158. Kurz B, Jost B, Schunke M: **Dietary vitamins and selenium diminish the development of mechanically induced osteoarthritis and increase the expression of antioxidative enzymes in the knee joint of STR/1N mice.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(2):119-126.
159. Liu YZ, Jackson AP, Cosgrove SD: **Contribution of calcium-containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(10):1333-1340.
160. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Kannel W, Meenan RF: **The prevalence of chondrocalcinosis in the elderly and its association with knee osteoarthritis: the Framingham Study.** *J Rheumatol* 1989, **16**(9):1241-1245.

161. Schneider DL, Barrett-Connor E, Morton DJ, Weisman M: **Bone mineral density and clinical hand osteoarthritis in elderly men and women: the Rancho Bernardo study.** *J Rheumatol* 2002, **29**(7):1467-1472.
162. Javaid MK, Arden NK: **Bone and osteoarthritis: what is the relationship?***Arthritis Rheum* 2013, **65**(6):1418-1420.
163. Foss MV, Byers PD: **Bone density, osteoarthrosis of the hip, and fracture of the upper end of the femur.** *Ann Rheum Dis* 1972, **31**(4):259-264.
164. Hardcastle SA, Gregson CL, Deere KC, Davey Smith G, Dieppe P, Tobias JH: **High bone mass is associated with an increased prevalence of joint replacement: a case-control study.** *Rheumatology (Oxford)* 2013, **52**(6):1042-1051.
165. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Tobin JD: **Bone mineral density and osteoarthritis: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12** Suppl A:S45-48.
166. Nevitt MC, Zhang Y, Javaid MK, Neogi T, Curtis JR, Niu J, McCulloch CE, Segal NA, Felson DT: **High systemic bone mineral density increases the risk of incident knee OA and joint space narrowing, but not radiographic progression of existing knee OA: the MOST study.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(1):163-168.
167. Zhang Y, Hannan MT, Chaisson CE, McAlindon TE, Evans SR, Aliabadi P, Levy D, Felson DT: **Bone mineral density and risk of incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in women: the Framingham Study.** *J Rheumatol* 2000, **27**(4):1032-1037.
168. Bergink AP, Uitterlinden AG, Van Leeuwen JP, Hofman A, Verhaar JA, Pols HA: **Bone mineral density and vertebral fracture history are associated with incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in elderly men and women: the Rotterdam Study.** *Bone* 2005, **37**(4):446-456.
169. Hart DJ, Cronin C, Daniels M, Worthy T, Doyle DV, Spector TD: **The relationship of bone density and fracture to incident and progressive radiographic osteoarthritis of the knee: the Chingford Study.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(1):92-99.
170. Arden NK, Nevitt MC, Lane NE, Gore LR, Hochberg MC, Scott JC, Pressman AR, Cummings SR: **Osteoarthritis and risk of falls, rates of bone loss, and osteoporotic fractures. Study of Osteoporotic Fractures Research Group.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(7):1378-1385.
171. Prieto-Alhambra D, Nogues X, Javaid MK, Wyman A, Arden NK, Azagra R, Cooper C, Adachi JD, Boonen S, Chapurlat RD *et al*: **An increased rate of falling leads to a rise in fracture risk in postmenopausal women with self-reported osteoarthritis: a prospective multinational cohort study (GLOW).** *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(6):911-917.
172. Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, Levy D, Felson DT: **Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. The Framingham Study.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**(12):1671-1680.
173. Hart DJ, Mootosamy I, Doyle DV, Spector TD: **The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study.** *Ann Rheum Dis* 1994, **53**(3):158-162.
174. Johnston JD, Masri BA, Wilson DR: **Computed tomography topographic mapping of subchondral density (CT-TOMASD) in osteoarthritic and normal knees: methodological development and preliminary findings.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(10):1319-1326.
175. Lo GH, Tassinari AM, Driban JB, Price LL, Schneider E, Majumdar S, McAlindon TE: **Cross-sectional DXA and MR measures of tibial periarticular bone associate with radiographic knee osteoarthritis severity.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(7):686-693.
176. Ding C, Cicuttini F, Jones G: **Tibial subchondral bone size and knee cartilage defects: relevance to knee osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(5):479-486.
177. Acheson RM, Collart AB: **New Haven survey of joint diseases. XVII. Relationship between some systemic characteristics and osteoarthrosis in a general population.** *Ann Rheum Dis* 1975, **34**(5):379-387.

178. Hart DJ, Doyle DV, Spector TD: **Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study.** *J Rheumatol* 1995, **22**(6):1118-1123.
179. Frey MI, Barrett-Connor E, Sledge PA, Schneider DL, Weisman MH: **The effect of noninsulin dependent diabetes mellitus on the prevalence of clinical osteoarthritis. A population based study.** *J Rheumatol* 1996, **23**(4):716-722.
180. Rannou F, Poiraudou S: **Non-pharmacological approaches for the treatment of osteoarthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010, **24**(1):93-106.
181. Arden NK, Leyland KM: **Osteoarthritis year 2013 in review: clinical.** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(10):1409-1413.
182. Roddy E, Zhang W, Doherty M: **Aerobic walking or strengthening exercise for osteoarthritis of the knee? A systematic review.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(4):544-548.
183. Roddy E, Doherty M: **Changing life-styles and osteoarthritis: what is the evidence?** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**(1):81-97.
184. Cheng Y, Wu K, Cheng Z, Zhu Y, Yang ZG, Ma H, Wang SW, Jiang ZL: **[Randomized controlled study on the treatment of knee osteoarthritis with different acupuncture methods at different stages].** *Zhongguo Zhen Jiu* 2013, **33**(6):508-512.
185. Macfarlane GJ, Paudyal P, Doherty M, Ernst E, Lewith G, MacPherson H, Sim J, Jones GT: **A systematic review of evidence for the effectiveness of practitioner-based complementary and alternative therapies in the management of rheumatic diseases: osteoarthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2012, **51**(12):2224-2233.
186. Zhang W, Doherty M, Leeb BF, Alekseeva L, Arden NK, Bijlsma JW, Dincer F, Dziedzic K, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G *et al*: **EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT).** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**(3):377-388.
187. Zhang W, Doherty M, Arden N, Bannwarth B, Bijlsma J, Gunther KP, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Jordan K, Kaklamanis P *et al*: **EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT).** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(5):669-681.
188. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P, Gunther K, Hauselmann H, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P *et al*: **EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT).** *Ann Rheum Dis* 2003, **62**(12):1145-1155.
189. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M *et al*: **OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(2):137-162.
190. Goldring MB, Marcu KB: **Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(3):224.
191. P CXaR: **Cartilage articulaire normal: anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement.** *EMC-Orthopédie* 2005, **2**(1):41-58.
192. Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Redini F: **Proteoglycans: key partners in bone cell biology.** *Bioessays* 2007, **29**(8):758-771.
193. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ: **Articular cartilage and osteoarthritis.** *Instr Course Lect* 2005, **54**:465-480.
194. Madry H, Luyten FP, Facchini A: **Biological aspects of early osteoarthritis.** *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012, **20**(3):407-422.
195. Chevalier X: **[Physiopathogenesis of osteoarthritis. The arthritis cartilage].** *Presse Med* 1998, **27**(2):81-87.

196. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: **Matrix metalloproteinases: role in arthritis.** *Front Biosci* 2006, **11**:529-543.
197. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM: **Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3.** *Nat Genet* 1996, **12**(4):390-397.
198. Chun JS, Oh H, Yang S, Park M: **Wnt signaling in cartilage development and degeneration.** *BMB Rep* 2008, **41**(7):485-494.
199. Chang SH, Oh CD, Yang MS, Kang SS, Lee YS, Sonn JK, Chun JS: **Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signaling.** *J Biol Chem* 1998, **273**(30):19213-19219.
200. Yoon YM, Oh CD, Kim DY, Lee YS, Park JW, Huh TL, Kang SS, Chun JS: **Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C-alpha, Erk-1, and p38 MAPK signaling pathways.** *J Biol Chem* 2000, **275**(16):12353-12359.
201. Woods A, Wang G, Beier F: **Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions.** *J Cell Physiol* 2007, **213**(1):1-8.
202. Reginster JY, Bruyere O, Lecart MP, Henrotin Y: **Naturocetic (glucosamine and chondroitin sulfate) compounds as structure-modifying drugs in the treatment of osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2003, **15**(5):651-655.
203. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ: **The role of growth factors in cartilage repair.** *Clin Orthop Relat Res* 2011, **469**(10):2706-2715.
204. Mankin HJ, Buckwalter JA: **Restoration of the osteoarthrotic joint.** *J Bone Joint Surg Am* 1996, **78**(1):1-2.
205. Teixeira CC, Mansfield K, Hertkorn C, Ischiropoulos H, Shapiro IM: **Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, **281**(3):C833-839.
206. Corvol MT: **The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis.** *Joint Bone Spine* 2000, **67**(6):557-560.
207. Loeser RF: **Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(8):971-979.
208. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP, Schmal H: **Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue.** *Tissue Eng* 2006, **12**(10):2853-2862.
209. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P: **Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue.** *Plast Reconstr Surg* 2004, **113**(2):585-594.
210. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F: **Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **290**(2):763-769.
211. Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG: **Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue.** *Tissue Eng Part B Rev* 2010, **16**(4):435-444.
212. Estes BT, Diekman BO, Guilak F: **Monolayer cell expansion conditions affect the chondrogenic potential of adipose-derived stem cells.** *Biotechnol Bioeng* 2008, **99**(4):986-995.
213. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU: **In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.** *Exp Cell Res* 1998, **238**(1):265-272.
214. Finger AR, Sargent CY, Dulaney KO, Bernacki SH, Lobo EG: **Differential effects on messenger ribonucleic acid expression by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells**

- seeded in agarose constructs due to ramped and steady applications of cyclic hydrostatic pressure. *Tissue Eng* 2007, **13**(6):1151-1158.
215. Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F: **Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells.** *Tissue Eng* 2003, **9**(6):1301-1312.
216. Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W: **Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6.** *J Cell Physiol* 2007, **211**(3):682-691.
217. Via AG, Frizziero A, Oliva F: **Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources.** *Muscles Ligaments Tendons J* 2012, **2**(3):154-162.
218. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** *Tissue Eng* 2001, **7**(2):211-228.
219. Huang JJ, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B: **Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison.** *J Orthop Res* 2005, **23**(6):1383-1389.
220. Im GI, Shin YW, Lee KB: **Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(10):845-853.
221. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T: **Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(8):2521-2529.
222. Gimble J, Guilak F: **Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential.** *Cytotherapy* 2003, **5**(5):362-369.
223. Estes BT, Wu AW, Guilak F: **Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(4):1222-1232.
224. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P *et al*: **Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.** *Cells Tissues Organs* 2003, **174**(3):101-109.
225. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ: **Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(14):7841-7845.
226. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ: **Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(7):3213-3218.
227. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R: **Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2.** *Exp Cell Res* 2003, **287**(1):98-105.
228. Becerra J, Andrades JA, Guerado E, Zamora-Navas P, Lopez-Puertas JM, Reddi AH: **Articular cartilage: structure and regeneration.** *Tissue Eng Part B Rev* 2010, **16**(6):617-627.
229. Oakley SP, Portek I, Szomor Z, Appleyard RC, Ghosh P, Kirkham BW, Murrell GA, Lassere MN: **Arthroscopy -- a potential "gold standard" for the diagnosis of the chondropathy of early osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(5):368-378.
230. Riyami M, Rolf C: **Evaluation of microfracture of traumatic chondral injuries to the knee in professional football and rugby players.** *J Orthop Surg Res* 2009, **4**:13.
231. van der Kraan PM, van den Berg WB: **Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration?** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(3):223-232.
232. van den Berg WB: **Pathophysiology of osteoarthritis.** *Joint Bone Spine* 2000, **67**(6):555-556.



233. Laadhar L, Zitouni M, Kalle-Sellami M, Mahjoub M, Sellami S, Makni S: **[Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: risk factors and inflammatory mechanisms]**. *Rev Med Interne* 2007, **28**(8):531-536.
234. Rolauffs B, Rothdiener M, Bahrs C, Badke A, Weise K, Kuettner KE, Kurz B, Aurich M, Grodzinsky AJ, Aicher WK: **Onset of preclinical osteoarthritis: the angular spatial organization permits early diagnosis**. *Arthritis Rheum* 2011, **63**(6):1637-1647.
235. Mollenhauer JA: **Closing ranks: the chondrocytes' move in bad times or biomechanical job sharing?** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(6):1475-1476.
236. Goldring MB, Goldring SR: **Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis**. *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1192**:230-237.
237. Bullough PG: **The role of joint architecture in the etiology of arthritis**. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12 Suppl A**:S2-9.
238. Loeser RF: **Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis**. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008, **8**(4):303-306.
239. Katiyar SK, Raman C: **Green tea: a new option for the prevention or control of osteoarthritis**. *Arthritis Res Ther* 2011, **13**(4):121.
240. Orita S, Koshi T, Mitsuka T, Miyagi M, Inoue G, Arai G, Ishikawa T, Hanaoka E, Yamashita K, Yamashita M *et al*: **Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee**. *BMC Musculoskelet Disord* 2011, **12**:144.
241. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: **Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets**. *Arthritis Rheum* 2001, **44**(6):1237-1247.
242. Attur MG, Patel IR, Patel RN, Abramson SB, Amin AR: **Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8**. *Proc Assoc Am Physicians* 1998, **110**(1):65-72.
243. Attur MG, Dave M, Cipolletta C, Kang P, Goldring MB, Patel IR, Abramson SB, Amin AR: **Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention**. *J Biol Chem* 2000, **275**(51):40307-40315.
244. Daheshia M, Yao JQ: **The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis**. *J Rheumatol* 2008, **35**(12):2306-2312.
245. Braddock M, Quinn A: **Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention**. *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**(4):330-339.
246. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H: **Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis**. *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(1):33-42.
247. Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T: **Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta**. *Arthritis Rheum* 2005, **52**(1):136-143.
248. Elliott S, Hays E, Mayor M, Sporn M, Vincenti M: **The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-3 in primary human chondrocytes**. *Arthritis Res Ther* 2003, **5**(5):R285-291.
249. Inoue K, Masuko-Hongo K, Okamoto M, Nishioka K: **Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes**. *Rheumatol Int* 2005, **26**(2):93-98.
250. Bondeson J, Lauder S, Wainwright S, Amos N, Evans A, Hughes C, Feldmann M, Caterson B: **Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor IkappaBalpha into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor-kappaB-dependent**. *J Rheumatol* 2007, **34**(3):523-533.
251. Cortial D, Gouttenoire J, Rousseau CF, Ronziere MC, Piccardi N, Msika P, Herbage D, Mallein-Gerin F, Freyria AM: **Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a**

- 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(7):631-640.
252. Dai SM, Shan ZZ, Nishioka K, Yudoh K: **Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(5):735-742.
253. Pfander D, Heinz N, Rothe P, Carl HD, Swoboda B: **Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1beta: a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**(3):240-244.
254. Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP: **Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro.** *Pathobiology* 2000, **68**(3):144-149.
255. Venkatesan N, Barre L, Benani A, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M: **Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: a strategy to promote cartilage repair.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(52):18087-18092.
256. Eger W, Schumacher BL, Mollenhauer J, Kuettner KE, Cole AA: **Human knee and ankle cartilage explants: catabolic differences.** *J Orthop Res* 2002, **20**(3):526-534.
257. Attur MG, Dave MN, Clancy RM, Patel IR, Abramson SB, Amin AR: **Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins.** *J Immunol* 2000, **164**(5):2684-2691.
258. Stabellini G, De Mattei M, Calastrini C, Gagliano N, Moscheni C, Pasello M, Pellati A, Bellucci C, Gioia M: **Effects of interleukin-1beta on chondroblast viability and extracellular matrix changes in bovine articular cartilage explants.** *Biomed Pharmacother* 2003, **57**(7):314-319.
259. Lopez-Armada MJ, Carames B, Lires-Dean M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ: **Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(7):660-669.
260. Heraud F, Heraud A, Harmand MF: **Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**(12):959-965.
261. Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J: **The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation.** *Osteoarthritis Cartilage* 1996, **4**(1):77-84.
262. Guerne PA, Carson DA, Lotz M: **IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro.** *J Immunol* 1990, **144**(2):499-505.
263. Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, Martel-Pelletier J: **Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha.** *J Rheumatol* 1997, **24**(10):1985-1994.
264. Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ: **Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage.** *J Rheumatol* 1994, **21**(9):1710-1715.
265. Saklatvala J: **Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage.** *Nature* 1986, **322**(6079):547-549.
266. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis.** *J Clin Invest* 1996, **97**(9):2011-2019.
267. Ryu JH, Yang S, Shin Y, Rhee J, Chun CH, Chun JS: **Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2alpha-induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(9):2732-2743.

268. Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J: **Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis.** *Cytokines Cell Mol Ther* 2000, **6**(2):71-79.
269. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T: **Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption.** *Endocrinology* 1998, **139**(3):1338-1345.
270. Yu X, Kennedy RH, Liu SJ: **JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes.** *J Biol Chem* 2003, **278**(18):16304-16309.
271. Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, Shiina M, Mihara M: **IL-6 and IL-1 synergistically enhanced the production of MMPs from synovial cells by up-regulating IL-6 production and IL-1 receptor I expression.** *Cytokine* 2010, **51**(2):178-183.
272. Legendre F, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol JP: **Role of interleukin 6 (IL-6)/IL-6R-induced signal transducers and activators of transcription and mitogen-activated protein kinase/extracellular.** *J Rheumatol* 2005, **32**(7):1307-1316.
273. Rogerson FM, Chung YM, Deutscher ME, Last K, Fosang AJ: **Cytokine-induced increases in ADAMTS-4 messenger RNA expression do not lead to increased aggrecanase activity in ADAMTS-5-deficient mice.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**(11):3365-3373.
274. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ: **Cartilage in normal and osteoarthritis conditions.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008, **22**(2):351-384.
275. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: **The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.** *Biorheology* 2002, **39**(1-2):237-246.
276. Boileau C, Pelletier JP, Tardif G, Fahmi H, Laufer S, Lavigne M, Martel-Pelletier J: **The regulation of human MMP-13 by licofelone, an inhibitor of cyclo-oxygenases and 5-lipoxygenase, in human osteoarthritic chondrocytes is mediated by the inhibition of the p38 MAP kinase signalling pathway.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(6):891-898.
277. Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP: **Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001, **15**(5):805-829.
278. Sun HB: **Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis.** *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1211**:37-50.
279. Cawston TE, Wilson AJ: **Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**(5):983-1002.
280. Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, Nyberg P, Lindy O, Vesterinen J, Paju A, Konttinen YT, Stenman UH, Salo T: **Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen.** *Biochemistry* 2003, **42**(18):5414-5420.
281. Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, Krane SM: **Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(49):17192-17197.
282. Murphy G, Nagase H: **Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008, **4**(3):128-135.
283. Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC: **Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**(3):R63.
284. Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE, Balan RA: **Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions.** *Rom J Morphol Embryol* 2010, **51**(2):215-228.
285. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW: **Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(12):3723-3733.

286. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z *et al*: **Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis.** *Nature* 2005, **434**(7033):644-648.
287. van den Berg WB: **Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms.** *Osteoarthritis Cartilage* 2011, **19**(4):338-341.
288. Jager C, Hrenn A, Zwingmann J, Suter A, Merfort I: **Phytomedicines prepared from Arnica flowers inhibit the transcription factors AP-1 and NF-kappaB and modulate the activity of MMP1 and MMP13 in human and bovine chondrocytes.** *Planta Med* 2009, **75**(12):1319-1325.
289. Mix KS, Mengshol JA, Benbow U, Vincenti MP, Sporn MB, Brinckerhoff CE: **A synthetic triterpenoid selectively inhibits the induction of matrix metalloproteinases 1 and 13 by inflammatory cytokines.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(5):1096-1104.
290. Rousseau JC, Delmas PD: **Biological markers in osteoarthritis.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007, **3**(6):346-356.
291. Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaisse JM: **A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells.** *Bone* 2004, **35**(5):1107-1119.
292. Sandy JD, Neame PJ, Boynton RE, Flannery CR: **Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain.** *J Biol Chem* 1991, **266**(14):8683-8685.
293. Mankin HJ, Lippiello L: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips.** *J Bone Joint Surg Am* 1970, **52**(3):424-434.
294. Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR: **Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration.** *J Clin Invest* 1995, **96**(6):2859-2869.
295. Kuno K, Okada Y, Kawashima H, Nakamura H, Miyasaka M, Ohno H, Matsushima K: **ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan.** *FEBS Lett* 2000, **478**(3):241-245.
296. Kuno K, Bannai K, Hakozaiki M, Matsushima K, Hirose K: **The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **319**(4):1327-1333.
297. Kashiwagi M, Enghild JJ, Gendron C, Hughes C, Caterson B, Itoh Y, Nagase H: **Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing.** *J Biol Chem* 2004, **279**(11):10109-10119.
298. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK *et al*: **ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro.** *Nature* 2005, **434**(7033):648-652.
299. Burnouf-Radosevich M, Burnouf T: **Chromatographic preparation of a therapeutic highly purified von Willebrand factor concentrate from human cryoprecipitate.** *Vox Sang* 1992, **62**(1):1-11.
300. de Caestecker M: **The transforming growth factor-beta superfamily of receptors.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, **15**(1):1-11.
301. Javelaud D, Mauviel A: **Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**(7):1161-1165.
302. Roberts AB: **Molecular and cell biology of TGF-beta.** *Miner Electrolyte Metab* 1998, **24**(2-3):111-119.
303. Jobling AI, Nguyen M, Gentle A, McBrien NA: **Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression.** *J Biol Chem* 2004, **279**(18):18121-18126.
304. Govinden R, Bhoola KD: **Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta.** *Pharmacol Ther* 2003, **98**(2):257-265.

305. Roberts AB: **TGF-beta signaling from receptors to the nucleus.** *Microbes Infect* 1999, **1**(15):1265-1273.
306. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB: **TGF-beta and osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(6):597-604.
307. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX: **TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage.** *J Cell Biol* 2001, **153**(1):35-46.
308. Wu Q, Kim KO, Sampson ER, Chen D, Awad H, O'Brien T, Puzas JE, Drissi H, Schwarz EM, O'Keefe RJ *et al*: **Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2 in transgenic mice.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(10):3132-3144.
309. Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB: **Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair.** *J Immunol* 2002, **169**(1):507-514.
310. Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB: **Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(12):3442-3451.
311. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C: **Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **200**(1):142-148.
312. Lotz M: **The role of nitric oxide in articular cartilage damage.** *Rheum Dis Clin North Am* 1999, **25**(2):269-282.
313. Bay-Jensen AC, Hoegh-Madsen S, Dam E, Henriksen K, Sondergaard BC, Pastoureau P, Qvist P, Karsdal MA: **Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis?** *Rheumatol Int* 2010, **30**(4):435-442.
314. Blom AB, van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE, van der Kraan PM, van Rooijen N, van den Berg WB: **Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**(1):147-157.
315. Blom AB, van Lent PL, Holthuysen AE, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, van den Berg WB: **Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**(8):627-635.
316. Suurmond J, Dorjee AL, Boon MR, Knol EF, Huizinga TW, Toes RE, Schuerwegh AJ: **Mast cells are the main interleukin 17-positive cells in anticitrullinated protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**(5):R150.
317. Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, Kim HY: **The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(7):2152-2163.
318. Robinson JD, Flashner MS: **The (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated ATPase. Enzymatic and transport properties.** *Biochim Biophys Acta* 1979, **549**(2):145-176.
319. Scanzello CR, Umoh E, Pessler F, Diaz-Torne C, Miles T, Dicarolo E, Potter HG, Mandl L, Marx R, Rodeo S *et al*: **Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(8):1040-1048.
320. Wang Q, Rozelle AL, Lepus CM, Scanzello CR, Song JJ, Larsen DM, Crish JF, Bebek G, Ritter SY, Lindstrom TM *et al*: **Identification of a central role for complement in osteoarthritis.** *Nat Med* 2011, **17**(12):1674-1679.
321. Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Abramson SB: **Prognostic biomarkers in osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2013, **25**(1):136-144.

322. Attur M, Belitskaya-Levy I, Oh C, Krasnokutsky S, Greenberg J, Samuels J, Smiles S, Lee S, Patel J, Al-Mussawir H *et al*: **Increased interleukin-1beta gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(7):1908-1917.
323. Lotz M, Loeser RF: **Effects of aging on articular cartilage homeostasis.** *Bone* 2012, **51**(2):241-248.
324. Abu-Dallo KI, Manny Y, Penchas S, Eyal Z: **Clinical manifestations of splenic abscess.** *Arch Surg* 1975, **110**(3):281-283.
325. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour JP, Msika P, Baudouin C, Henrotin YE: **Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**(4):1193-1203.
326. Berenbaum F: **Signaling transduction: target in osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2004, **16**(5):616-622.
327. Lories RJ, Luyten FP: **The bone-cartilage unit in osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(1):43-49.
328. Prasadam I, Friis T, Shi W, van Gennip S, Crawford R, Xiao Y: **Osteoarthritic cartilage chondrocytes alter subchondral bone osteoblast differentiation via MAPK signalling pathway involving ERK1/2.** *Bone* 2010, **46**(1):226-235.
329. Prasadam I, van Gennip S, Friis T, Shi W, Crawford R, Xiao Y: **ERK-1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**(5):1349-1360.
330. Martel-Pelletier J: **Pathophysiology of osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**(4):371-373.
331. Racine J, Aaron RK: **Pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis.** *R I Med J (2013)* 2013, **96**(3):19-22.
332. Radin EL, Paul IL, Rose RM: **Role of mechanical factors in pathogenesis of primary osteoarthritis.** *Lancet* 1972, **1**(7749):519-522.
333. Ding M, Odgaard A, Hvid I: **Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis.** *J Bone Joint Surg Br* 2003, **85**(6):906-912.
334. Burr DB: **Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12 Suppl A**:S20-30.
335. Radin EL, Rose RM: **Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage.** *Clin Orthop Relat Res* 1986(213):34-40.
336. Buckland-Wright JC, Macfarlane DG, Fogelman I, Emery P, Lynch JA: **Techetium 99m methylene diphosphonate bone scanning in osteoarthritic hands.** *Eur J Nucl Med* 1991, **18**(1):12-16.
337. Hutton CW, Higgs ER, Jackson PC, Watt I, Dieppe PA: **99mTc HMDP bone scanning in generalised nodal osteoarthritis. II. The four hour bone scan image predicts radiographic change.** *Ann Rheum Dis* 1986, **45**(8):622-626.
338. Dieppe P, Cushnaghan J, Young P, Kirwan J: **Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy.** *Ann Rheum Dis* 1993, **52**(8):557-563.
339. Buckland-Wright C: **Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12 Suppl A**:S10-19.
340. Messent EA, Buckland-Wright JC, Blake GM: **Fractal analysis of trabecular bone in knee osteoarthritis (OA) is a more sensitive marker of disease status than bone mineral density (BMD).** *Calcif Tissue Int* 2005, **76**(6):419-425.
341. Messent EA, Ward RJ, Tonkin CJ, Buckland-Wright C: **Tibial cancellous bone changes in patients with knee osteoarthritis. A short-term longitudinal study using Fractal Signature Analysis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(6):463-470.

342. Messent EA, Ward RJ, Tonkin CJ, Buckland-Wright C: **Cancellous bone differences between knees with early, definite and advanced joint space loss; a comparative quantitative macroradiographic study.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(1):39-47.
343. Karvonen RL, Miller PR, Nelson DA, Granda JL, Fernandez-Madrid F: **Periarticular osteoporosis in osteoarthritis of the knee.** *J Rheumatol* 1998, **25**(11):2187-2194.
344. Xu L, Hayashi D, Roemer FW, Felson DT, Guermazi A: **Magnetic resonance imaging of subchondral bone marrow lesions in association with osteoarthritis.** *Semin Arthritis Rheum* 2012, **42**(2):105-118.
345. Conaghan PG, Felson DT: **Structural associations of osteoarthritis pain: lessons from magnetic resonance imaging.** *Novartis Found Symp* 2004, **260**:191-201; discussion 201-195, 277-199.
346. Bergman AG, Willen HK, Lindstrand AL, Pettersson HT: **Osteoarthritis of the knee: correlation of subchondral MR signal abnormalities with histopathologic and radiographic features.** *Skeletal Radiol* 1994, **23**(6):445-448.
347. Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, Gmitro AF, Krupinski EA, Schwartz SA, Hunter TB, Resnick DL: **Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology.** *Skeletal Radiol* 2008, **37**(5):423-431.
348. Bingham CO, 3rd, Buckland-Wright JC, Garner P, Cohen SB, Dougados M, Adami S, Clauw DJ, Spector TD, Pelletier JP, Raynaud JP *et al*: **Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee: results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(11):3494-3507.
349. van der Kraan PM, van den Berg WB: **Osteophytes: relevance and biology.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(3):237-244.
350. Junker S KG, Frommer KW, Rehart S, Lange U, Steinmeyer , Rickert M, Schett G, Müller-Ladner U, Neumann E: **The Role of Adipocytokines in Osteoarthritis Osteophyte Formation.** *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(Supplement 1):A63.
351. Rik FP S, Blom AB, de Munter W.: **Alarmins S100A8/A9 Cause Osteophyte Formation in Experimental Osteoarthritis with High Synovial Involvement.** *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(Supplement 1):A57.
352. Stewart R, Stojkovic M, Lako M: **Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells.** *Eur J Cancer* 2006, **42**(9):1257-1272.
353. Akala OO, Clarke MF: **Hematopoietic stem cell self-renewal.** *Curr Opin Genet Dev* 2006, **16**(5):496-501.
354. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ: **Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal.** *Curr Opin Cell Biol* 2004, **16**(6):700-707.
355. Zwaka TP, Thomson JA: **Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division.** *Stem Cells* 2005, **23**(2):146-149.
356. Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S: **Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**(7):677-687.
357. Song L, Tuan RS: **Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow.** *FASEB J* 2004, **18**(9):980-982.
358. de la Fuente R, Abad JL, Garcia-Castro J, Fernandez-Miguel G, Petriz J, Rubio D, Vicario-Abejon C, Guillen P, Gonzalez MA, Bernad A: **Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells.** *Exp Cell Res* 2004, **297**(2):313-328.
359. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E: **Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential.** *Dev Biol* 2006, **300**(2):656-669.

360. Korbiling M, Estrov Z: **Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?** *N Engl J Med* 2003, **349**(6):570-582.
361. Noel D, Djouad F, Jorgense C: **Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair.** *Curr Opin Investig Drugs* 2002, **3**(7):1000-1004.
362. Barry FP, Murphy JM: **Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**(4):568-584.
363. Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PI: **Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine.** *Tissue Eng* 2007, **13**(8):1799-1808.
364. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 1999, **284**(5411):143-147.
365. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M *et al*: **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.** *Nature* 2002, **418**(6893):41-49.
366. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C: **The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Biochimie* 2005, **87**(1):125-128.
367. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH: **Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.** *Trends Biotechnol* 2006, **24**(4):150-154.
368. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG *et al*: **Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms.** *Cancer Res* 2007, **67**(19):9142-9149.
369. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(12):4279-4295.
370. Havlas V, Kos P, Jendelova P, Lesny P, Trc T, Sykova E: **[Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells].** *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2011, **78**(2):138-144.
371. Thorpe SD, Buckley CT, Vinardell T, O'Brien FJ, Campbell VA, Kelly DJ: **The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to dynamic compression following TGF-beta3 induced chondrogenic differentiation.** *Ann Biomed Eng* 2010, **38**(9):2896-2909.
372. Gobbi A, Bathan L: **Biological approaches for cartilage repair.** *J Knee Surg* 2009, **22**(1):36-44.
373. Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG: **Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(10):1121-1130.
374. Bai X, Li G, Zhao C, Duan H, Qu F: **BMP7 induces the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal cells into chondrocytes.** *Med Biol Eng Comput* 2011, **49**(6):687-692.
375. Feng G, Wan Y, Balian G, Laurencin CT, Li X: **Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells.** *Growth Factors* 2008, **26**(3):132-142.
376. An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J: **IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells.** *Ann Biomed Eng* 2010, **38**(4):1647-1654.
377. Park KH, Na K: **Effect of growth factors on chondrogenic differentiation of rabbit mesenchymal cells embedded in injectable hydrogels.** *J Biosci Bioeng* 2008, **106**(1):74-79.
378. Yamaoka H, Nishizawa S, Asawa Y, Fujihara Y, Ogasawara T, Yamaoka K, Nagata S, Takato T, Hoshi K: **Involvement of fibroblast growth factor 18 in dedifferentiation of cultured human chondrocytes.** *Cell Prolif* 2010, **43**(1):67-76.



379. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C *et al*: **Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **315**(2):255-263.
380. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C: **Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells.** *Stem Cells* 2006, **24**(11):2412-2419.
381. Mizumoto Y, Furuya K, Makimura N, Mitsui C, Seki K, Kimura T, Nagata I: **Gene expression of oxytocin receptor in human ectopic endometrial tissues.** *Adv Exp Med Biol* 1995, **395**:491-493.
382. Nicholson HD, Swann RW, Burford GD, Wathes DC, Porter DG, Pickering BT: **Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue.** *Regul Pept* 1984, **8**(2):141-146.
383. Frayne J, Nicholson HD: **Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male.** *Mol Hum Reprod* 1998, **4**(6):527-532.
384. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM: **Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(21):11704-11709.
385. Geenen V, Legros JJ, Franchimont P, Baudrihay M, Defresne MP, Boniver J: **The neuroendocrine thymus: coexistence of oxytocin and neurophysin in the human thymus.** *Science* 1986, **232**(4749):508-511.
386. Ivell R, Hunt N, Abend N, Brackman B, Nollmeyer D, Lamsa JC, McCracken JA: **Structure and ovarian expression of the oxytocin gene in sheep.** *Reprod Fertil Dev* 1990, **2**(6):703-711.
387. Rao VV, Loffler C, Battey J, Hansmann I: **The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization.** *Cytogenet Cell Genet* 1992, **61**(4):271-273.
388. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H: **Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones.** *Science* 1980, **207**(4429):373-378.
389. Summar ML, Phillips JA, 3rd, Battey J, Castiglione CM, Kidd KK, Maness KJ, Weiffenbach B, Gravius TC: **Linkage relationships of human arginine vasopressin-neurophysin-II and oxytocin-neurophysin-I to prodynorphin and other loci on chromosome 20.** *Mol Endocrinol* 1990, **4**(6):947-950.
390. Turner RA, Pierce JG, du VV: **The purification and the amino acid content of vasopressin preparations.** *J Biol Chem* 1951, **191**(1):21-28.
391. Richard S, Zingg HH: **The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens.** *J Biol Chem* 1990, **265**(11):6098-6103.
392. Gimpl G, Fahrenholz F: **The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation.** *Physiol Rev* 2001, **81**(2):629-683.
393. Arletti R, Benelli A, Bertolini A: **Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats.** *Physiol Behav* 1990, **48**(6):825-830.
394. Miedlar JA, Rinaman L, Vollmer RR, Amico JA: **Oxytocin gene deletion mice overconsume palatable sucrose solution but not palatable lipid emulsions.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **293**(3):R1063-1068.
395. Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG: **Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, **287**(1):R87-96.
396. Camerino C: **Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocin-deficient mice.** *Obesity (Silver Spring)* 2009, **17**(5):980-984.
397. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G: **Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass.** *Cell* 2000, **100**(2):197-207.

398. Copland JA, Ives KL, Simmons DJ, Soloff MS: **Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts.** *Endocrinology* 1999, **140**(9):4371-4374.
399. Colucci S, Colaiani G, Mori G, Grano M, Zallone A: **Human osteoclasts express oxytocin receptor.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **297**(3):442-445.
400. Elabd SK, Sabry I, Hassan WB, Nour H, Zaky K: **Possible neuroendocrine role for oxytocin in bone remodeling.** *Endocr Regul* 2007, **41**(4):131-141.
401. Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, Liakou C, Triantafillopoulos IK, Dontas I, Papaioannou NA: **Useful animal models for the research of osteoarthritis.** *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2013.
402. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA: **Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee.** *Osteoarthritis Cartilage* 1996, **4**(2):87-98.
403. Batiste DL, Kirkley A, Laverty S, Thain LM, Spouge AR, Holdsworth DW: **Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**(12):986-996.
404. Papaioannou NA, Triantafillopoulos IK, Khaldi L, Krallis N, Galanos A, Lyritis GP: **Effect of calcitonin in early and late stages of experimentally induced osteoarthritis. A histomorphometric study.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(4):386-395.
405. Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA: **Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(8):2481-2487.
406. van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LB, van den Berg WB: **Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis.** *J Exp Pathol (Oxford)* 1990, **71**(1):19-31.
407. Kalbhen DA: **[Orienting animal experiment studies on the effect of fenbufen on healthy and arthrosis-induced articular cartilage tissue in vivo].** *Z Rheumatol* 1985, **44**(4):167-171.
408. Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P: **Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(9):1670-1679.
409. Schuelert N, McDougall JJ: **Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat.** *Neurosci Lett* 2009, **465**(2):184-188.
410. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, Cantagrel A, Chary-Valckenaere I, Euller-Ziegler L, Flipo RM *et al*: **Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(10):1427-1430.
411. Felson DT, McAlindon TE, Anderson JJ, Naimark A, Weissman BW, Aliabadi P, Evans S, Levy D, LaValley MP: **Defining radiographic osteoarthritis for the whole knee.** *Osteoarthritis Cartilage* 1997, **5**(4):241-250.
412. Dougados M, Nguyen M, Berdah L, Mazieres B, Vignon E, Lequesne M: **Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the Chondromodulating Effect of Diacerein in OA of the Hip.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(11):2539-2547.
413. Ravaud P, Auleley GR, Chastang C, Rousselin B, Paolozzi L, Amor B, Dougados M: **Knee joint space width measurement: an experimental study of the influence of radiographic procedure and joint positioning.** *Br J Rheumatol* 1996, **35**(8):761-766.
414. Mazzuca SA, Brandt KD, Dieppe PA, Doherty M, Katz BP, Lane KA: **Effect of alignment of the medial tibial plateau and x-ray beam on apparent progression of osteoarthritis in the standing anteroposterior knee radiograph.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(8):1786-1794.
415. Vignon E, Piperno M, Le Graverand MP, Mazzuca SA, Brandt KD, Mathieu P, Favret H, Vignon M, Merle-Vincent F, Conrozier T: **Measurement of radiographic joint space width in the tibiofemoral compartment of the osteoarthritic knee: comparison of standing anteroposterior and Lyon schuss views.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(2):378-384.

416. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J: **Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(1):62-70.
417. Baer PC, Geiger H: **Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity.** *Stem Cells Int* 2012, **2012**:812693.
418. Seda Tigli R, Ghosh S, Laha MM, Shevde NK, Daheron L, Gimble J, Gumusderelioglu M, Kaplan DL: **Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds.** *J Tissue Eng Regen Med* 2009, **3**(5):348-360.
419. Ansar MM, Esfandiariy E, Mardani M, Hashemibeni B, Zarkesh-Esfahani SH, Hatef M, Kabiri A: **A comparative study of aggrecan synthesis between natural articular chondrocytes and differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells in 3D culture.** *Adv Biomed Res* 2012, **1**:24.
420. Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schutze N, Noth U, Cramer H, Eulert J, Zimmermann U, Hendrich C: **Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate.** *J Orthop Res* 2003, **21**(6):1090-1097.
421. Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP: **Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture.** *Tissue Eng* 2006, **12**(6):1393-1403.
422. Sylvester J, El Mabrouk M, Ahmad R, Chaudry A, Zafarullah M: **Interleukin-1 induction of aggrecanase gene expression in human articular chondrocytes is mediated by mitogen-activated protein kinases.** *Cell Physiol Biochem* 2012, **30**(3):563-574.
423. Ying X, Cheng S, Shen Y, Cheng X, An Rompis F, Wang W, Lin Z, Chen Q, Zhang W, Kou D *et al*: **Nicotine promotes proliferation and collagen synthesis of chondrocytes isolated from normal human and osteoarthritis patients.** *Mol Cell Biochem* 2012, **359**(1-2):263-269.
424. Jensen K, Nizamutdinov D, Guerrier M, Afroze S, Dostal D, Glaser S: **General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis.** *FASEB J* 2012, **26**(12):4778-4787.
425. Armas LA, Recker RR: **Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012, **41**(3):475-486.
426. Sniekers YH, Weinans H, van Osch GJ, van Leeuwen JP: **Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(5):R182.
427. Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, Deng HW: **Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis.** *J Bone Miner Res* 2008, **23**(1):17-29.
428. Reid IR: **Relationships between fat and bone.** *Osteoporos Int* 2008, **19**(5):595-606.
429. Shapses SA, Riedt CS: **Bone, body weight, and weight reduction: what are the concerns?** *J Nutr* 2006, **136**(6):1453-1456.
430. Rosen CJ, Bouxsein ML: **Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone?** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006, **2**(1):35-43.
431. Somm E, Cettour-Rose P, Asensio C, Charollais A, Klein M, Theander-Carrillo C, Juge-Aubry CE, Dayer JM, Nicklin MJ, Meda P *et al*: **Interleukin-1 receptor antagonist is upregulated during diet-induced obesity and regulates insulin sensitivity in rodents.** *Diabetologia* 2006, **49**(2):387-393.
432. Roux C, Pisani DF, Yahia HB, Djedaini M, Beranger GE, Chambard JC, Ambrosetti D, Michiels JF, Breuil V, Ailhaud G *et al*: **Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **440**(4):786-791.