



**HAL**  
open science

# La consommation tabagique comme facteur de risque environnemental de l'arthrose : rôle de la nicotine dans la prolifération et la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines

Xu Yang

► **To cite this version:**

Xu Yang. La consommation tabagique comme facteur de risque environnemental de l'arthrose : rôle de la nicotine dans la prolifération et la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0050 . tel-01684227

**HAL Id: tel-01684227**

**<https://theses.hal.science/tel-01684227>**

Submitted on 15 Jan 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Xu YANG

**La consommation tabagique comme facteur de risque environnemental de  
l'arthrose : rôle de la nicotine dans la prolifération et la différenciation  
chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines**

**Soutenance du 26 / 06 / 2017**

**Membres du jury :**

Rapporteurs : Madame Nathalie ROUAS-FREISS, DR

Hôpital Saint-Louis, IUH, Université Paris Diderot

Monsieur Charles COURT, PU-PH

Hôpital Bicêtre, AP-HP, Université Paris-Sud

Examineurs : Madame Céline HUSELSTEIN, Professeur

UMR\_7365 CNRS-Université de Lorraine

Monsieur Jacques MAGDALOU, DRCE1

UMR\_7365 CNRS-Université de Lorraine, Directeur de thèse

Membres invités : Monsieur Eric BATTAGLIA, Maître de Conférence

UMR\_7360 CNRS-Université de Lorraine

Madame Hui WANG, Professeur, Université de Wuhan, Chine

---

UMR 7365 CNRS-UL, INGÉNIERIE MOLÉCULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE ARTICULAIRE (IMoPA)

9, Avenue de la Forêt de Haye, Biopôle de l'Université de Lorraine, 54500 Vandœuvre lès Nancy

# Remerciements

---

A Monsieur le Docteur Jacques MAGDALOU

*Vous nous avez fait l'honneur de diriger ce travail.*

*Nous vous remercions pour votre bienveillance,  
votre enthousiasme, et votre dynamisme.*

*Nous vous remercions pour votre expérience,  
votre esprit critique et votre rigueur scientifique.*

*Nous espérons être toujours à la hauteur de la confiance  
que vous nous avez accordée, et que l'avenir  
nous permettra de poursuivre nos collaborations.*

*Que cette thèse soit le reflet de notre admiration,  
de notre respect et de notre gratitude.*

Je suis très honoré que Madame le Docteur Nathalie ROUAS-FREISS et Monsieur le Professeur Charles COURT aient accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je les remercie vivement pour l'intérêt qu'ils portent dans ce travail.

Je souhaite également remercier Madame le Professeur Céline HUSELSTEIN pour l'honneur qu'il me témoigne en étant qu'examineur de ce travail, ainsi que Madame le Professeur Hui WANG et Monsieur le Docteur Eric BATTAGLIA pour l'honneur qu'ils me témoignent en étant membres invités. Je leur suis très reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Directeur du laboratoire IMoPA (UMR 7365 CNRS-UL), le Professeur Jean-Yves JOUZEAU. Je le remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse au laboratoire. Je vous en suis profondément reconnaissant.

Je remercie Monsieur le Professeur Henry COUDANE, chef du Service de chirurgie Arthroscopique, Traumatologique et Orthopédique de l'Appareil Locomoteur (A.T.O.L.) du CHRU de Nancy. Vous m'avez ouvert les portes et accueilli dans le Service d'Orthopédie au CHRU de Nancy puis comme participant au congrès de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFCOT). Vous n'êtes pas seulement un professeur respecté mais aussi un grand pédagogue.

Je souhaite surtout remercier Monsieur le Professeur Liaobin CHEN, Madame le Professeur Hui WANG, mes mentors du Pôle Mediacal de l'Université de Wuhan (Chine), pour m'avoir donné la chance de participer à cette collaboration scientifique internationale et de réaliser cette thèse, ainsi que pour leur disponibilité et leurs encouragements tout au long de ces années.

Je veux également remercier toutes les personnes qui contribuent à la collaboration entre Nancy et Wuhan, à Messieurs les Professeur Jean-François STOLTZ, Jacques HUBERT, Gilbert FAURE, Yunfeng ZHOU, et Yan ZHAO.

Je veux également remercier Monsieur le Professeur Didier MAINARD, chef du service

du Chirurgie Orthopédique, Traumatologique et Arthroscopique (COTA) du CHRU de Nancy, Madame le Professeur Danièle BENSOUSSAN, chef de l'Unité de Thérapie Cellulaire et Banque de Tissus (UTCT) du CHRU de Nancy pour leur collaboration active au cours de cette étude.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Docteur Jean-Baptiste VINCOURT, pour son aide à la fois technique et scientifique apportée à ce travail.

Je remercie très chaleureusement les Docteurs Mathieu RIFFAULT, Irfan SHAUKAT, et Léonore AVERCENC-LEGER pour m'ont enseigné des manipulations scientifiques sur ce travail et pour leur discussion sur les résultats obtenus. Merci également à tous mes autres collègues de bureau, Anne, Isabelle, Caroline, Nick, Mahdia, Dima, Paul, Hélène, Dafné, Sagida, Benjamin pour leurs aides, leur sympathie et surtout pour leur amitié en dehors.

Enfin je ne peux oublier mes amis chinois, Xianglei WU, Yong HU, Xiaomeng PANG, Pan DAN, Junsong YE, Chaohua DENG, Ganggang ZHANG, Zhe XIE, Hao YU, Xing LIU...

En tout dernier lieu, je voudrais remercier mon épouse, Jie ; ma fille, Emma ; pour leur amour, leur accompagnement et leurs encouragements pendant ces années. Sans vous, rien n'aurait été possible. Merci également à mes parents, pour leur amour, leur soutien, leur aide, et plus généralement pour tout ce qu'ils m'ont apporté.

Ce travail de thèse a été réalisé grâce au support financier du programme BQR Région Lorraine-CNRS-Université de Lorraine, la Fédération de Recherche CNRS-UL 3209 Bioingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique. Merci également au China Scholarship Council (CSC) pour la bourse obtenue pendant 4 ans.

Le travail de recherche de cette thèse a fait appel aux plateformes de la FR3209, en particulier la Plateforme de Protéomique et la Plateforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire (PTIBC), ainsi qu'au Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Nancy (COTA et UTCT).

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>12</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>13</b>
<b>Contexte général de l'étude</b> .....	<b>16</b>
<b>Introduction Bibliographique</b> .....	<b>19</b>
<b>Chapitre 1. Généralités sur l'arthrose : épidémiologie et facteurs de risque</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1 Introduction</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2 Le cartilage et les chondrocytes</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2.1 Ontogenèse de l'os sous-chondral et cartilage</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2.2 Voies de signalisation qui contrôlent la croissance</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2.3 Composition du cartilage</b> .....	<b>28</b>
<b>1.2.3.1 Les Chondrocytes</b> .....	<b>29</b>
<b>1.2.3.2 La matrice extracellulaire</b> .....	<b>30</b>
<b>1.2.3.2.1 Collagènes</b> .....	<b>30</b>
<b>1.2.3.2.2 Protéoglycanes</b> .....	<b>31</b>
<b>1.2.4 Structure du cartilage</b> .....	<b>33</b>
<b>1.3 Définition de l'arthrose</b> .....	<b>34</b>
<b>1.4 Épidémiologie</b> .....	<b>37</b>
<b>1.4.1 Facteurs de risque d'arthrose</b> .....	<b>38</b>
<b>1.4.1.1 Facteurs généraux</b> .....	<b>38</b>
<b>1.4.1.1.1 Âge</b> .....	<b>38</b>
<b>1.4.1.1.2 Sexe</b> .....	<b>40</b>
<b>1.4.1.1.3 Susceptibilité génétique</b> .....	<b>42</b>
<b>1.4.1.1.4 Facteur métabolique</b> .....	<b>42</b>
<b>1.4.1.1.5 Facteur ethnique</b> .....	<b>47</b>
<b>1.4.1.2 Les Facteurs de risque locaux</b> .....	<b>48</b>
<b>1.4.1.2.1 Le surpoids et l'obésité</b> .....	<b>48</b>
<b>1.4.1.2.2 Traumatisme, antécédent traumatique</b> .....	<b>49</b>
<b>1.4.1.2.3 Les activités physiques</b> .....	<b>49</b>
<b>1.4.1.2.4 Les facteurs environnementaux</b> .....	<b>50</b>
<b>1.5 Pathogénèse de l'arthrose</b> .....	<b>53</b>
<b>1.6 Traitement de l'arthrose</b> .....	<b>54</b>
<b>1.6.1 Traitements symptomatiques</b> .....	<b>54</b>
<b>1.6.2 Chirurgie</b> .....	<b>55</b>
<b>1.6.2.1 Stimulation de la moelle osseuse</b> .....	<b>56</b>

1.6.2.2	Mosaïcoplastie ou greffes ostéocondrales autologues .....	57
1.6.2.3	Approches de médecine régénérative .....	58
<b>Chapitre 2. Les cellules souches .....</b>		<b>61</b>
2.1	Introduction.....	61
2.2	Propriétés.....	62
2.3	Les cellules souches multipotentes.....	63
2.3.1	Les cellules souches mésenchymateuses .....	64
2.3.1.1	Tissus source, Isolement and Caractérisation .....	65
2.3.1.1.1	Source Adulte .....	65
2.3.1.1.2	Source fœtale.....	67
2.3.1.1.3	Effets immunomodulateurs .....	68
2.3.1.2	Potentiel des CSM dans l'ingénierie du cartilage et des tissus osseux .....	69
2.3.1.2.1	Sources de CSM pour l'ingénierie du cartilage et des tissus osseux .....	69
2.3.1.2.2	Capacité de différenciation .....	71
2.3.1.2.3	Différenciation chondrogénique des CSM.....	72
2.3.1.2.4	Thérapie basée sur les CSM.....	77
<b>Chapitre 3. Le tabagisme et Les récepteurs nicotiques.....</b>		<b>81</b>
3.1	Introduction.....	81
3.2	La Nicotine.....	82
3.2.1	La Nicotine dans les produits du tabac.....	83
3.2.2	Métabolisme de la nicotine.....	83
3.2.3	Action sur les récepteurs nicotiques.....	85
3.2.3.1.	Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs).....	85
<b>Chapitre 4. La consommation tabagique comme un facteur de risque .....</b>		<b>87</b>
4.1	La consommation tabagique et l'arthrose .....	87
4.2	La consommation de tabac et les CSM .....	88
4.3	L'expression et la fonction des nAChRs dans les CSM.....	89
<b>Matériel et Méthodes .....</b>		<b>93</b>
1.	Culture cellulaire.....	93
1.1	Mise en place des cultures primaires de chondrocytes humains.....	93
1.1.1	Origine des prélèvements humains.....	93
1.1.2	Mise en culture des chondrocytes arthrosiques humains.....	93
1.2	Mise en place des cultures des CSM-GW .....	94
1.2.1	Origine des prélèvements humains.....	94
1.2.2	Analyse de l'expression de marqueur de surface cellulaire.....	94



1.2.3	Mise en culture des CSM-GW .....	96
1.2.4	Passage et congélation .....	96
2.	Analyse de la prolifération, viabilité, apoptose et nécrose cellulaire.....	97
2.1	Prolifération cellulaire .....	97
2.1.1	Chondrocytes humains arthrosiques.....	97
2.1.2	Les CSM-GW.....	97
2.2	Viabilité cellulaire, apoptose et nécrose .....	98
3.	Analyse de migration – Wound healing test .....	99
4.	Différenciation des CSM-GW.....	100
4.1	Adipogénèse .....	100
4.2	Ostéogénèse.....	101
4.3	Chondrogénèse .....	102
5.	Analyses moléculaires.....	103
5.1	Extraction des ARNm totaux.....	103
5.1.1	À partir de cellules en monocouche .....	103
5.1.2	À partir de cellules en système tridimensionnel (culots) .....	104
5.2	Dosage spectrophotométrique .....	104
5.3	Rétro-transcription.....	105
5.4	RT-PCR.....	105
5.5	Electrophorèse des produits d'ADN.....	107
5.5.1	Préparation du gel .....	107
5.5.2	Migration.....	107
5.6	PCR quantitative en temps réel .....	107
6.	Étude histologiques et colorations .....	109
6.1	Colorations des cellules en monocouche .....	109
6.1.1	Rouge Alizarine.....	109
6.1.2	AdipoRed™ Assay .....	109
6.2	Préparation des échantillons (culots).....	110
6.3	Différentes colorations.....	110
6.3.1	Hématoxyline-érythrosine-Safran.....	110
6.3.2	Rouge Sirius .....	111
6.3.3	Bleu Alcian.....	112
7.	Étude de l'expression des protéines par Western blot.....	113
7.1	Extraction et préparation des protéines.....	113
7.2	Électrophorèse sur gel et transfert sur membrane.....	114

7.3	Blocage et détection.....	114
8.	Étude de l'expression de protéines en immunofluorescence .....	116
9.	Étude de l'expression de protéines en LC-MALDI.....	117
9.1	Préparation des échantillons .....	117
9.2	Traitement de sécrétome soluble pour la digestion et LC-MALDI .....	118
10.	Flux calcique.....	119
11.	Analyses statistiques.....	120
	Résultats.....	121
1.	Caractéristiques des prélèvements du cartilage.....	121
2.	Optimisation des conditions de culture du chondrocyte humain arthrosique 122	
3.	La nicotine n'a pas d'effet sur la prolifération de chondrocytes humains arthrosiques.....	124
4.	La nicotine n'a pas d'effet sur le sécrétome des chondrocytes humains arthrosiques.....	125
5.	Effet de la nicotine sur l'expression de l'ARNm de marqueurs de différenciation / dédifférenciation chondrocytaire .....	127
6.	Caractérisation phénotypique de CSM-GW .....	129
7.	Capacité de différenciation de CSM-GW .....	130
7.1	Etudes histologiques et cellulaires par coloration.....	130
7.2	Mesure de l'expression de marqueurs de la différenciation chondrogénique 133	
8.	La prolifération deCSM-GW est diminuée par la nicotine .....	135
9.	La nicotine n'a aucun effet sur la viabilité des CSM-GW.....	136
10.	La migration cellulaire de CSM-GW est diminuée par la nicotine.....	137
11.	L'expression de marqueurs chondrogénique est diminuée par la nicotine pendant la prolifération .....	138
12.	La capacité de différenciation chondrogénique de CSM-GW est détériorée par la nicotine.....	139
13.	L' $\alpha 7$ nAChR est exprimé par les CSM-GW et est fonctionnellement actif par la stimulation de la nicotine.....	142
14.	L'expression de l' $\alpha 7$ nAChR est augmentée par la stimulation de nicotine. 144	
15.	$\alpha$ -BTX reverse partiellement l'effet délétère de la nicotine sur la prolifération et la migration de CSM-GW.....	145
16.	Interaction de l' $\alpha$ -BTX et la nicotine sur la différenciation chondrogénique de CSM-GW.....	148
	Discussion .....	150
1.	L'environnement et l'arthrose.....	150

<b>2. Optimisation des conditions de la culture cellulaire .....</b>	<b>154</b>
<b>3. L'effet direct de la nicotine sur les chondrocytes humains.....</b>	<b>156</b>
<b>4. L'effet de la nicotine sur les CSM-GW .....</b>	<b>159</b>
<b>5. L'expression des nAChRs dans les CSM .....</b>	<b>166</b>
<b>6. Fonctionnalité de nAChRs .....</b>	<b>168</b>
<b>7. Perspectives .....</b>	<b>173</b>
<b>Conclusions.....</b>	<b>176</b>
<b>Références .....</b>	<b>177</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>204</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>207</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>209</b>

## Liste des abréviations

ADAMTs	A Desintegrin and A Metalloprotease with Thrombospondin Motifs
ADIPOA	Adipose derived stromal cells for osteoarthritis
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AGEs	Advanced Glycation End-products
AGGR	Agrécane
ALP	Alkaline phosphatase
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATA	Acide Trichloroacétique
BCA	Bicinchoninic Acid Solution
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Albumine Sérique Bovine
BTX	Bungarotoxin
Col2A	Type IIA procollagène
Col2a1	Collagène type II alpha I
COMP	Cartilage Oligometric Matrix Protein
COX	Cyclooxygenase
CD	Cluster of differentiation of immune cells
CS	Cellules Souches
CSA	Cellules Souches adultes
CSE	Cellules Souches embryonnaires
CSF	Cellules Souches Fœtales
CSDLP	Cellules Souches dérivées du ligament parodontal
CSM	Cellules Souches Mésoenchymateuses
CSM-MO	Cellule Souche Mésoenchymateuse de Moelle Osseuse
CSM-GW	Cellule Souche Mésoenchymateuse de Gelée de Wharton
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	DiThioThréitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FGF	Fibroblast growth factor
GAG	Glycosaminoglycane
GlcAT1	$\beta$ 1,3-glucuronosyl transférase 1
GT	Glycosyltransférases
GW	Gelée de Wharton
HDAC	Histone désacétylase
HES	Hématoxyline Eosine Safran
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen

HRP	Horseradishperoxidase
IAA	Iodoacétamide
IFN- $\gamma$	Interféron- $\gamma$
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-1 $\beta$	InterLeukine 1 $\beta$
IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP	Iodure de propidium
iPS	Cellules Souches Pluripotentes Induites
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ITS	Insuline Transferrine Sélénium
IUGR	Intra uterine growth retardation
LC-MALDI	Liquid Chromatography-Matrix Assisted Desorption Ionization
MALDI-TOF	Matrix Assisted Desorption Ionization-Time Of Flight
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrix Extracellulaire
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix Metalloproteases
MO	Moelle Osseuse
MTT	3-(4,5 dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor
NaCl	Chlorure de sodium
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Nitric Oxide, monoxide d'azote
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Protéoglycane
PGE	Prostaglandine E
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPR	Pattern Recognition Receptor
PTH	Parathyroid Hormone
PTHrP	Parathyroid hormone related protein
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species
RPS29	Ribosomal Protein S29
Runx2	Runt-related transcription factor 2
Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9)
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TGF	Transforming Growth Factor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
UTCT	Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XT-I	Xylosyltransférase-I

## Liste des Tableaux

Tableau 1 Définition du syndrome métabolique selon les critères américains du NCEP ATP III.....	43
Tableau 2 Sources de CSM et leurs capacités de différenciation .....	70
Tableau 3 Résumé de l'expression de nAChRs de CSM. N/A correspond à l'absence d'enquête de sous-unité.....	91
Tableau 4 Les anticorps impliqués pour les immunomarquages de CSM-GW .....	95
Tableau 5 Composants de la réaction de rétro-transcription .....	105
Tableau 6 Composants de la phase d'amplification.....	106
Tableau 7 Condition de Cycle thermal.....	106
Tableau 8 Les séquences des amorces utilisées pour la PCR analyse d'ADNc humain .....	108
Tableau 9 Programme de la coloration HES .....	111
Tableau 10 Programme de la coloration Rouge Sirius.....	111
Tableau 11 Programme de la coloration Bleu Alcian.....	112
Tableau 12 Anticorps primaires impliqués .....	115
Tableau 13 Anticorps secondaires impliqués.....	115
Tableau 14 Variables démographiques et cliniques recueillies pour tous les patients, avec les différences entre les groupes identifiés .....	121

## Liste des Figures

Figure 1 Représentation schématique de l'ontogénèse du cartilage .....	21
Figure 2 Formation osseuse endochondrale .....	24
Figure 3 Principaux facteurs de transcription impliqués dans l'acquisition du phénotype cellulaire.....	25
Figure 4 Rétroaction négative de Indian hedgehog (Ihh)/Protéine d'hormone parathyroïdienne-related (PTHrP).....	26
Figure 5 La matrice extracellulaire du cartilage.....	32
Figure 6 Représentation schématique de l'organisation macromoléculaire du cartilage articulaire.....	34
Figure 7 L'articulation diarthrique normale et de l'arthrose .....	36
Figure 8 L'arthrose est liée au syndrome métabolique. ....	47
Figure 9 Représentation des modifications radiographiques et structurelles de l'arthrose. ....	54
Figure 10 Processus de réparation par microfractures .....	56
Figure 11 Processus de réparation par mosaïcoplastie.....	58
Figure 12 Techniques de régénération du cartilage .....	60
Figure 13 La source des cellules pluripotentes provient des embryons en développement....	62
Figure 14 Représentation schématique d'une thérapie basée sur l'injection intra-articulaire des CSM d'origine adipeuse .....	67
Figure 15 Le potentiel de différenciation des CSM .....	71
Figure 16 Livraison des CSM au cartilage malade chez les patients souffrant d'arthrose. ....	80
Figure 17 La structure de la nicotine.....	83
Figure 18 La structure de sous-unités de nAChRs.....	86
Figure 19 Principe de Wound Healing et Migration Assays.....	100

Figure 20 Principe du marquage par immunofluorescence.....	116
Figure 21 Expression de différents marqueurs chondrocytaires, selon le passage et la zone de prélèvement du cartilage .....	122
Figure 22 Expression de différents marqueurs chondrocytaires de la zone relativement saine en condition de normoxie et hypoxie. ....	123
Figure 23 Observation au microscope optique de chondrocytes humains arthrosiques après optimisation des conditions de culture. ....	124
Figure 24 Prolifération cellulaire des chondrocytes arthrosiques en présence de concentrations croissantes de nicotine. ....	125
Figure 25 Modulation des niveaux de sécrétion de protéines individuelles lors d'un traitement par différentes concentrations de nicotine.....	126
Figure 26 Effet de différentes concentrations de nicotine sur l'expression des marqueurs de différenciation /dédifférenciation chondrocytaires. ....	128
Figure 27 Analyse des marqueurs de différenciation/dédifférenciation des fumeurs contre les non-fumeurs par PCR quantitative en temps réel.....	128
Figure 28 Immunophénotypage de CSM-GW .....	129
Figure 29 Coloration des lipides au AdipoRed™ pour apprécier la différenciation en adipocytes des cellules en monocouche .....	131
Figure 30 Coloration au rouge alizarine pour apprécier la différenciation ostéogénique des cellules en monocouche .....	131
Figure 31 Différenciation chondrogénique des CSM-GW .....	132
Figure 32 Différenciation de CSM-GW vers la voie chondrogénique.....	134
Figure 33 Effet de la nicotine sur la prolifération cellulaire des CSM-GW. ....	135
Figure 34 Effet de la nicotine sur la viabilité des CSM-GW .....	136
Figure 35 Effet de la nicotine sur la migration cellulaire de CSM-GW. ....	137



Figure 36 Analyse de marqueurs chondrogéniques de CSM-GW pendant la prolifération cellulaire par PCR quantitative en temps réel. ....	138
Figure 37 Analyse de la chondrogenèse après 28 jours de différenciation chondrogénique en présence des différentes concentrations de nicotine par PCR quantitative en temps réel et western blot. ....	140
Figure 38 Analyse histologique de la différenciation chondrogénique après traitement par différentes concentrations de nicotine. ....	141
Figure 39 Expression de l' $\alpha 7$ nAChR dans CSM-GW. ....	143
Figure 40 Expression de l' $\alpha 7$ nAChR dans CSM-GW par immunofluorescence. ....	143
Figure 41 Activité fonctionnelle de l' $\alpha 7$ nAChR dans CSM-GW. ....	144
Figure 42 Analyse de l'expression de $\alpha 7$ nAChR pendant la prolifération de CSM-GW avec le traitement de la nicotine par PCR quantitative en temps réel. ....	145
Figure 43 Effet de différentes concentrations de $\alpha$ -BTX sur la prolifération et la différenciation de CSM-GW. ....	146
Figure 44 Effet de la nicotine et $\alpha$ -BTX sur la prolifération et la migration cellulaire de CSM-GW. ....	147
Figure 45 Analyse de la chondrogenèse après 28 jours de différenciation chondrogénique en présence de 100 $\mu$ M nicotine ou/et complété avec 10 nM de l' $\alpha$ -BTX par PCR quantitative en temps réel. ....	148
Figure 46 L'analyse histologique de la différenciation chondrogenèse après le traitement de 100 $\mu$ M nicotine ou/et complété avec 10 nM de l' $\alpha$ -BTX. ....	149
Figure 47 Hypothèse concernant les voies de signalisation induites après stimulation de nicotine via l' $\alpha 7$ nAChR. ....	175

## **Contexte général de l'étude**

L'arthrose est une des principales causes d'invalidité dans le monde. Cette maladie à la fois chronique et évolutive, dont la prévalence peut dépasser 90% chez les personnes de plus de 65 ans, altère leur qualité de vie et constitue une des principales causes de consultation médicale, de consommation médicamenteuse et d'handicap. L'arthrose se caractérise par une détérioration progressive et irréversible du cartilage. Cette dégradation matricielle s'effectue de façon concomitante par 1) une modification de la différenciation des chondrocytes, seules cellules associées au cartilage et responsables de la biosynthèse des macromolécules telles les protéoglycanes (PGs), collagènes et acide hyaluronique, 2) sous l'action en particulier d'évènements inflammatoires faisant intervenir plusieurs cytokines activant ainsi toute une batterie de gènes dédiés à la destruction de la matrice (agrécánases, collagénases) ou réprimant au contraire ceux impliqués dans l'anabolisme des composants matriciels (Magdalou et al., 2006).

Malgré sa prévalence élevée, les connaissances sont actuellement limitées concernant les mécanismes moléculaires qui conduisent la destruction du cartilage. Les traitements existants sont symptomatiques et visent seulement à soulager la douleur et l'inflammation, sans effet sur la progression de la maladie.

L'arthrose est une maladie complexe du système musculo-squelettique, plurifactorielle faisant intervenir à la fois des facteurs de risques bien connus (facteurs génétiques, vieillissement, traumatismes, obésité) et des facteurs moins identifiés comme les facteurs environnementaux (Valdes and Spector, 2011). Parmi les facteurs de risques environnementaux de l'arthrose, la consommation de tabac occupe une place importante mais reste encore controversée de nos jours. Parmi les 4000 composés présents dans la fumée de cigarette, la nicotine est une des molécules la plus physiologiquement active.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des outils prometteurs pour les nouveaux développements en ingénierie tissulaire et en particulier pour la régénération tissulaire du cartilage. Récemment les CSM de la gelée de Wharton (CSM-GW) promettent d'être une source intéressante de CSM pour l'ingénierie tissulaire du cartilage (Reppel et al., 2015). Cependant, l'efficacité de ces procédures peut être compromise par des facteurs qui influencent la physiologie des CSM. Les habitudes personnelles et les choix de mode de vie peuvent influencer l'efficacité de ces thérapies. Par exemple, l'exposition à la nicotine (tabagisme actif), à la fumée (tabagisme passif) et la thérapie de remplacement de la nicotine ont été reconnues comme facteurs de risque. Des niveaux élevés de produits chimiques de cigarettes dans le sang des fumeurs pourraient endommager les CSM transplantées et les rendre inefficaces. Il est donc important d'étudier l'effet de ces habitudes sur les CSM (Ruiz et al., 2012). Les études relatives à l'effet de la nicotine sur les CSM restent controversées jusqu'à présent.

En résumé, l'ensemble de ces études semble montrer l'existence d'un lien entre tabagisme, arthrose et potentialités des CSM même si les conclusions tirées semblent souvent opposées. C'est à partir de ce constat que nous avons voulu mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables des effets du tabac sur l'homéostasie du cartilage en étudiant le rôle de la nicotine sur le phénotype chondrocytaire ainsi que sur la prolifération et différenciation chondrogénique des CSM-GW.

Dans cette thèse, nous décrivons, dans un premier temps, l'ontogénèse du cartilage, la structure physiologique du cartilage, les changements dégénératifs observés dans l'arthrose, le mécanisme pathologique moléculaire de l'arthrose, les facteurs de risques, et les traitements actuels. Nous discutons également la caractérisation et des propriétés phénotypiques des CSM, la capacité de la différenciation chondrogénique et leurs applications dans l'ingénierie tissulaire pour les traitements contre l'arthrose. Enfin, nous évaluons l'effet du tabagisme ou

la nicotine sur les fonctions cellulaires des chondrocytes humains et les CSM, Le but général du projet de thèse est de 1) mesurer l'impact de la nicotine, composant majeur de la fumée de cigarette, sur la prolifération et la différenciation chondrocytaire de chondrocytes issues de patients arthrosiques, y compris des fumeurs et non fumeurs. 2) évaluer l'effet de la nicotine sur la prolifération, la migration et la différenciation chondrogénique de CSM-GW. 3) tenter de proposer un mécanisme moléculaire pour cet effet. Ce projet s'appuie sur les compétences établies au laboratoire dans le domaine ostéoarticulaire et celui de l'utilisation des cellules souches en collaboration avec des services hospitaliers du CHRU de Nancy (Orthopédie, UTCT).

# **Introduction Bibliographique**

## **Chapitre 1. Généralités sur l'arthrose : épidémiologie et facteurs de risque**

### **1.1 Introduction**

L'arthrose est une des pathologies les plus fréquentes dans le monde. Elle atteint environ 10% des hommes et 18% des femmes de plus de 60 ans (Woolf and Pfleger, 2003) avec une prévalence encore plus élevée parmi la population vieillissante (Loeser, 2010; Zhang and Jordan, 2010). Elle est responsable d'une morbidité majeure dans les pays développés où elle constitue la deuxième cause d'invalidité après les maladies cardiovasculaires (Sharma et al., 2006). C'est l'un des troubles de santé chroniques les plus courants dans les pays développés. Le poids socio-économique qui en résulte est important, entre 1,0% et 2,5% du produit intérieur brut (Hilgsmann et al., 2013).

L'arthrose est une maladie qui affecte toutes les structures de l'articulation. C'est une maladie liée au vieillissement. Avec le vieillissement progressif de la population, cette pathologie est en forte augmentation. L'incidence de l'arthrose est également liée à l'obésité. Ainsi, les femmes obèses ont près de quatre fois plus de risque d'arthrose du genou (gonarthrose) que les femmes non-obèses; pour les hommes obèses, le risque est près de cinq fois plus élevé (Anderson and Felson, 1988). Par conséquent, l'obésité est également un facteur de risque majeur pour le développement et la progression de l'arthrose. Parmi les autres facteurs de risque figurent le sexe, la race et l'origine ethnique, la génétique, la nutrition, et les traumatismes de l'articulation (Christensen et al., 2007; Felson et al., 1992, 2000; Kerkhof et al., 2010; Loughlin et al., 2002; Palotie et al., 1989; Spector et al., 1996; Srikanth et al., 2005; van Saase et al., 1988; Zhang and Jordan, 2010). Plus récemment, des facteurs de risques liés à l'environnement, comme l'ingestion de substances toxiques en particulier, le

tabac, l'alcool ou de composés ingérés en grande quantité comme la caféine, ont été identifiés (Luo et al., 2015; Ni et al., 2015; Tie et al., 2016b). Ces substances seraient responsables chez la femme enceinte de bébés de petite taille (intra uterine growth retardation, IUGR, syndrome) présentant des défauts de développement (plaque de croissance, articulation) susceptibles de générer à l'âge adulte des maladies ostéo-articulaires, dont l'arthrose. Le poids relatif de certains facteurs de risque diffère d'une articulation à une autre. Il affecte le décours de la maladie (arthrose précoce et phase terminale). Il est important de comprendre la nature, la structure et la fonction de l'articulation dans des conditions normales et pathologiques, en particulier l'impact des différents composants de l'articulation dans le développement de la maladie. Il est tout aussi important de connaître et comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires dans les différents tissus articulaires à l'origine de l'arthrose si l'on veut ensuite développer des thérapies innovantes.

Les articulations appartiennent à l'appareil locomoteur. Chaque articulation est composée d'éléments étroitement liés et interdépendants: le cartilage, la membrane synoviale, les ligaments, les tendons, et l'os sous chondral.

## **1.2 Le cartilage et les chondrocytes**

### **1.2.1 Ontogénèse de l'os sous-chondral et cartilage**

Le cartilage articulaire des articulations contient un seul type de cellules, le chondrocyte, qui est inséré dans une matrice extracellulaire (MEC) complexe. Les chondrocytes adultes sont des cellules différenciées qui synthétisent les constituants de la matrice à faible taux de renouvellement tels les PGs, les collagènes ou l'acide hyaluronique. Les chondrocytes ont des fonctions diverses au cours du développement. Dans l'embryon, les chondrocytes proviennent

de progéniteurs mésenchymateux de diverses sources en fonction de l'emplacement ultime du cartilage. Le chondrocyte synthétise le cartilage par un processus appelé chondrogénèse (Goldring et al., 2017).

La chondrogénèse, ou la formation du cartilage, est un processus cellulaire dynamique qui inclut le recrutement et la migration des CSM, la condensation des cellules progénitrices et la différenciation en chondrocytes, ce qui conduit à l'établissement de divers types de cartilage, y compris le cartilage hyalin, fibreux et élastique (Figure 1).

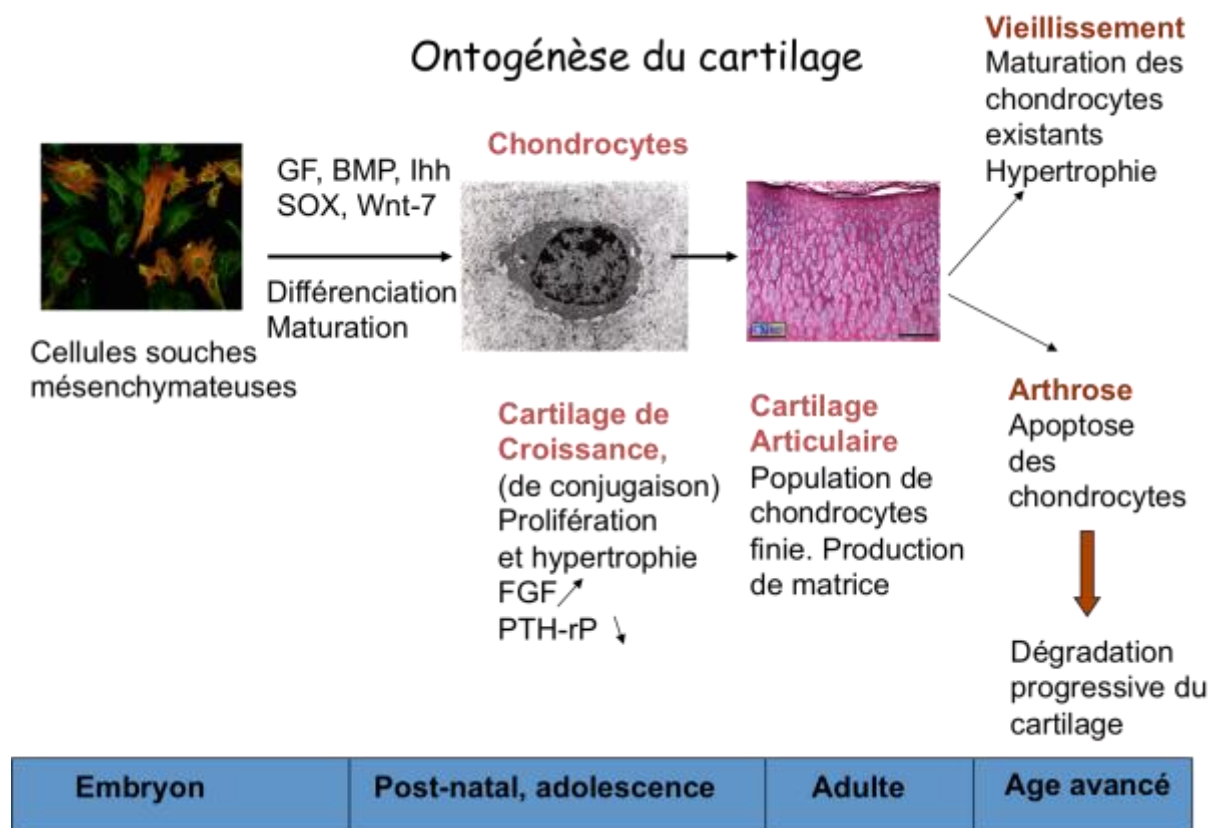


Figure 1 Représentation schématique de l'ontogénèse du cartilage. Ce processus comprend la condensation des CSM, la chondrogénèse (différenciation en chondrocytes) et la formation du cartilage.

Ce processus commence lorsque les cellules mésenchymateuses forment des condensations qui adhèrent suite à l'expression des molécules d'adhésion (Figure 2.a). Ce

processus se produit principalement lors de l'embryogenèse, mais il peut également exister chez les adultes, par exemple lors de la guérison des fractures (Pitsillides and Beier, 2011).

La condensation est suivie rapidement par une différenciation chondrocytaire avec une synthèse massive de la MEC (Figure 2.b). Dans la plupart des condensations, les cellules deviennent des chondrocytes. Les cellules au bord des condensations forment le périchondrium. Ces chondroprogéniteurs mésenchymateux expriment le collagène de type IIA, initialement dans une MEC contenant beaucoup d'acide hyaluronique. Leur agrégation coïncide avec l'épuisement de l'acide hyaluronique de la MEC et l'expression de la cadhérine2, l'adhésion des cellules neurales molécule 1, la ténascine-C et le facteur de transcription SRY-box containing gene 9 (Sox9) (Pitsillides and Beier, 2011). Les chondrocytes au centre du cartilage cessent de proliférer, par contre, leur volume augmente (hypertrophie). Les cellules synthétisent alors le collagène de type X (Figure 2.c). Les chondrocytes hypertrophiques sont le moteur principal de la croissance osseuse. Ils sont responsables de la minéralisation de la MEC. Ils attirent les vaisseaux sanguins par la production du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et d'autres facteurs, et attirent ainsi les chondroclastes. Les chondrocytes hypertrophiques interagissent avec les cellules adjacentes perichondrales pour qu'elles deviennent des ostéoblastes (Figure 2.d). Les chondrocytes hypertrophiques subissent alors une mort cellulaire par apoptose. La matrice cartilagineuse restante fournit un support pour les ostéoblastes qui envahissent le cartilage avec des vaisseaux sanguins et qui synthétisent une véritable matrice osseuse, le spongiosa primaire (Figure 2.e).

Alors que les chondrocytes hypertrophiques effectuent ces réactions multiples au centre du cartilage, l'os se dilate par la prolifération des chondrocytes (Figure 2.f). L'allongement osseux, particulièrement rapide au cours de la vie fœtale, est principalement déterminé par le taux de production de chondrocytes hypertrophiques provenant de ces chondrocytes proliférants. Ensuite, les centres d'ossification secondaires sont établis lorsque les



chondrocytes dans les nouveaux endroits caractéristiques cessent de proliférer, s'hypertrophient et attirent l'invasion vasculaire. Dans les os longs, les chondrocytes de croissance continuent à proliférer entre les régions osseuses des centres d'ossification primaire et secondaire. Ce cartilage est alors appelé plaque de croissance, car il forme une plaque distincte de cellules entre l'os du centre d'ossification secondaire et l'os spongieux primaire (Figure 2.g) (Kronenberg, 2003).

La formation du cartilage est contrôlée par des interactions cellulaires avec la MEC, les facteurs de croissance et de différenciation, et d'autres facteurs environnementaux qui initient ou suppriment les voies de signalisation cellulaire et la transcription de gènes spécifiques d'une manière spatio-temporelle.

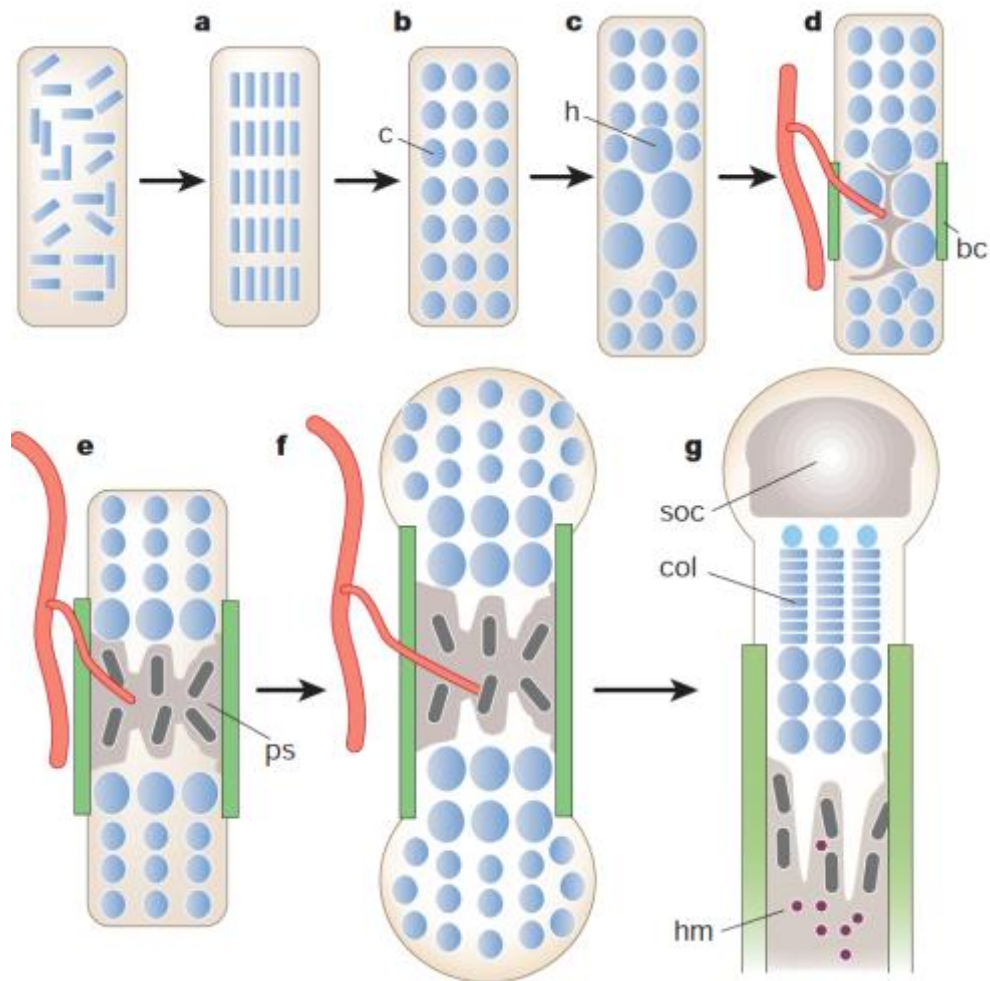


Figure 2 Formation osseuse endochondrale. a, Condensation des cellules mésenchymateuses. b, Formation des chondrocytes (c). c, Hypertrophie des chondrocytes (h). d, Formation des ostéoblastes (bc) et de la matrice minéralisée, attraction des vaisseaux sanguins. e, Invasion vasculaire (ps). f, Allongement de l'os et formation de l'os cortical. g, Formation du centre d'ossification secondaire (soc), et la plaque de croissance (col). (Kronenberg, Developmental regulation of the growth plate, *Nature*, 2003).

## 1.2.2 Voies de signalisation qui contrôlent la croissance

La prolifération et la différenciation des chondrocytes sont contrôlées par de nombreux signaux endocriniens et paracrines ou autocrines (Figure 3), ainsi que par des facteurs mécaniques. Les principaux acteurs comprennent les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et d'autres membres de la famille des facteur de croissance transformant-bêta (TGF- $\beta$ ), la protéine de l'hormone parathyroïdienne-related (PTHrP), le Indian hedgehog (Ihh), Fibroblast growth factor (FGF), qui contrôlent la progression des chondrocytes vers la prolifération, le taux de progression du cycle cellulaire dans les cellules en prolifération, ainsi que l'étendue de l'expansion cellulaire et la survie des chondrocytes hypertrophiques. De plus, les signaux n'agissent pas isolément, mais forment un réseau d'interactions complexe. Ainsi, la physiologie de la plaque de croissance est contrôlée et la dérégulation entraîne généralement des déformations squelettiques (Pitsillides and Beier, 2011).

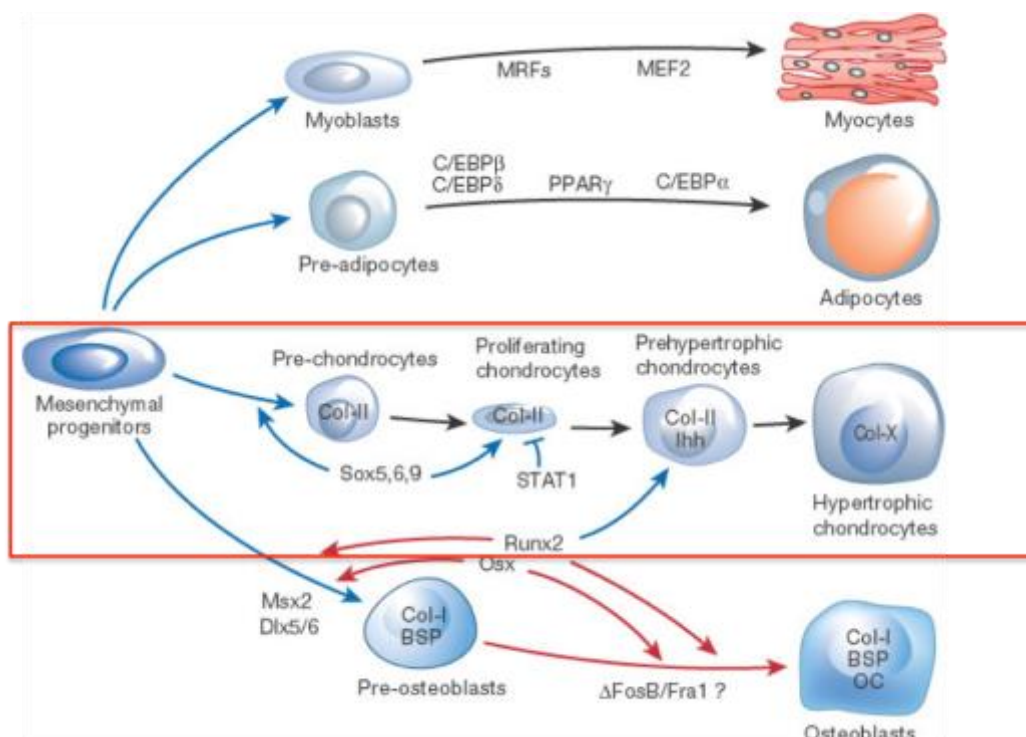


Figure 3 Principaux facteurs de transcription impliqués dans l'acquisition du phénotype cellulaire. (Harada and Rodan, Control of osteoblast function and regulation of bone mass, *Nature*, 2003).

Ihh est un régulateur central du développement osseux, coordonnant la prolifération et la différenciation des chondrocytes. La PTHrP est une protéine sécrétée par les cellules péri-chondriales pendant la vie fœtale et par les chondrocytes prolifératifs précoces. PTHrP agit sur le même récepteur couplé à la protéine G utilisé par l'hormone parathyroïdienne. Ces récepteurs PTH/PTHrP (PPR) sont exprimés à des niveaux faibles par les chondrocytes en prolifération et à des niveaux élevés par des chondrocytes pré-hypertrophiques /hypertrophiques précoces. Ihh stimule directement la prolifération des chondrocytes et, par stimulation de la synthèse de la PTHrP, détermine la distance de l'extrémité de l'os à laquelle les chondrocytes cessent de proliférer et subissent une différenciation hypertrophique (Kronenberg, 2003) (Figure 4).

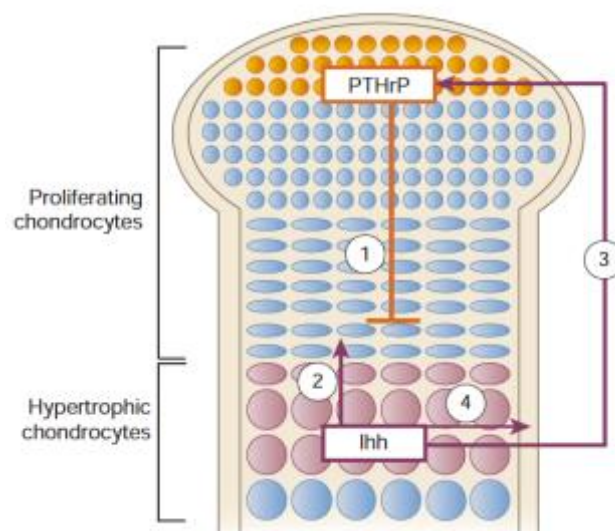


Figure 4 Rétroaction négative de Indian hedgehog (Ihh)/Protéine d'hormone parathyroïdienne-related (PTHrP). La PTHrP est sécrétée à partir de cellules péri-chondriales et des chondrocytes aux extrémités des os longs. (1). PTHrP agit sur les récepteurs sur les chondrocytes proliférants pour maintenir la prolifération des chondrocytes et retarder la production de Ihh. Lorsque les chondrocytes ne sont plus suffisamment stimulés par PTHrP, ils cessent de proliférer et synthétisent Ihh. Le Ihh agit sur son récepteur sur les chondrocytes pour augmenter la vitesse de prolifération (2) et stimuler la production de PTHrP aux extrémités des os (3). Ihh agit également sur les cellules péri-chondriales pour transformer ces cellules en ostéoblastes (4). (Kronenberg, Developmental regulation of the growth plate, *Nature*, 2003).

Des études récentes ont montré que la signalisation du FGF régleme de façon cruciale la prolifération et la différenciation des chondrocytes. La signalisation du FGF diminue la prolifération des chondrocytes directement et supprime l'expression de *Ihh* (Kronenberg, 2003).

La protéine BMP2 a été identifiée en 1988 comme un inducteur de formation d'os et de cartilage (Wozney et al., 1988). Les BMP2 et BMP7 humaines recombinantes ont été utilisées dans des applications orthopédiques, où l'amélioration de la réparation osseuse par activation de la signalisation BMP est devenue une pratique courante dans le traitement des fractures pseudarthrosiques (Salazar et al., 2016). La signalisation via BMP augmente l'expression de *Ihh* par les chondrocytes pré-hypertrophiques, et peut ainsi augmenter la prolifération des chondrocytes. Dans ces deux actions, la BMP s'oppose aux effets de la signalisation du FGF pour diminuer la prolifération des chondrocytes et diminuer l'expression de *Ihh* (Kronenberg, 2003). La condensation dépend fortement de la signalisation BMP. Postnatalement, la signalisation BMP continue d'affecter la dynamique de la plaque de croissance. De plus, plusieurs études révèlent que la signalisation BMP joue un rôle fondamental dans la formation de la MEC (Salazar et al., 2016).

*Sox9* est essentiel pour transformer les cellules de condensation en chondrocytes et agit encore à chaque stade de la différenciation des chondrocytes. *Sox9* est exprimé dans des cellules de condensations mésenchymateuses et dans des chondrocytes proliférants, mais pas dans des chondrocytes hypertrophiques. Dans les cellules en culture, *Sox9* stimule la transcription d'un certain nombre de gènes de la matrice cartilagineuse, y compris *Col2a1*, *Col1a2* et l'agrécan. Donc, *Sox9* est important pour toutes les phases de la lignée des chondrocytes, des condensations précoces à la conversion des chondrocytes proliférants en chondrocytes hypertrophiques (Kronenberg, 2003).

Runx-related transcription factor 2 (Runx2) est exprimé dans l'étape de condensation tardive de la chondrogénèse et est ensuite diminuée sensiblement dans les chondrocytes proliférants, avec une augmentation de l'expression à nouveau dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Il conduit les chondrocytes prolifératifs à se différencier en chondrocytes hypertrophiques (Kronenberg, 2003).

### **1.2.3 Composition du cartilage**

Les fonctions primaires du cartilage articulaire sont de lubrifier la surface des articulations permettant un mouvement sans douleur et à faible frottement des surfaces articulaires opposées. Le cartilage facilite la répartition des charges, minimisant ainsi les contraintes sur l'os sous-chondral sous-jacent (Buckwalter et al., 2005). Cette fonction est attribuée à sa MEC hautement organisée. La capacité du cartilage articulaire à résister à la compression résulte principalement de la présence de PGs. La forte densité des charges négatives des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés des PGs, entraîne une pression osmotique élevée et une rétention d'eau par le réseau de fibres de collagène. La résilience à la traction et la résistance du cartilage, d'autre part, sont causées par le réseau de fibres de collagène de type II. Elles sont également importantes pour les propriétés fonctionnelles dynamiques du cartilage. Les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire dépendent donc du maintien de teneurs élevées en PG et en collagène dans la matrice.

Les chondrocytes, le seul type de cellule résidant dans le cartilage articulaire, sont responsables de la production, de l'organisation et de l'entretien de la MEC du cartilage articulaire et sont donc responsables de l'intégrité du cartilage.

Plus de 70% du cartilage articulaire est composé d'eau, les chondrocytes ne représentent que 1% à 2% de son volume total. Le support interstitiel des fluides peut représenter plus de 90% de la capacité portante de l'articulation. La majeure partie du poids sec du cartilage

correspond à deux composants: le Col II et l'agrécan. Plusieurs collagènes «mineurs» et petits PGs contribuent également à l'organisation structurale unique de la matrice de cartilage (Goldring et al., 2017).

### **1.2.3.1 Les Chondrocytes**

Les chondrocytes articulaires matures ne présentent aucune activité mitotique détectable et maintiennent un métabolisme stable qui établit un équilibre entre les processus anaboliques et cataboliques. La matrice péri-cellulaire qui entoure les chondrocytes a une composition unique de microfibrilles de Col VI et d'autres protéines de matrice, telles que le perlecan, le biglycan, l'agrécan et le Col IX, ainsi qu'un polysaccharide, le hyaluronane. Les chondrocytes existent dans un environnement à faible tension d'oxygène-allant de 10% de la tension artérielle normale à la surface du cartilage à moins de 1% dans la zone profonde, et la consommation d'oxygène par les chondrocytes est très faible comparée à celle d'autres types des cellules. Dans la plaque de croissance et le cartilage articulaire, des facteurs de survie intracellulaire tels que le facteur inducible à l'hypoxie 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) aident les chondrocytes à s'adapter aux changements environnementaux et à maintenir des activités physiologiques associées à l'anabolisme cartilagineux et à la différenciation des chondrocytes (Goldring and Goldring, 2016). Les chondrocytes articulaires adultes, qui dérivent de chondrocytes au repos ou de réserve qui ont synthétisé la matrice du cartilage d'origine au cours de la chondrogénèse, sont inactifs métaboliquement, en raison de l'absence d'une alimentation vasculaire et d'innervation du tissu.

Le chondrocyte adulte a la capacité de répondre aux stimulations mécaniques, aux facteurs de croissance et aux cytokines qui peuvent influencer l'homéostasie d'une manière positive ou négative. Chez les personnes atteintes d'arthrose, le chondrocyte joue un rôle clé en réagissant aux changements structuraux de la MEC par la production de cytokines

cataboliques et de facteurs anabolisants qui agissent de manière autocrine-paracrine. Le chondrocyte a cependant une capacité limitée pour maintenir l'homéostasie du cartilage, qui diminue avec l'âge (Goldring et al., 2017).

### **1.2.3.2 La matrice extracellulaire**

La MEC est composée d'une phase aqueuse contenant des macromolécules structurales (collagènes, PGs, protéines non collagéniques, polysaccharides et glycoprotéines) synthétisées par les chondrocytes. Chaque chondrocyte est responsable de la mise en place et de la maintenance d'un microenvironnement spécialisé dans sa région (Poole et al., 2001). L'interaction entre la phase liquide et les macromolécules permet la rétention d'eau dans la matrice, ce qui est crucial pour maintenir les propriétés mécaniques uniques du cartilage. Le liquide tissulaire représente 80% du poids humide du cartilage articulaire. Il s'agit essentiellement d'eau mais contient également des gaz dissous, de petites protéines, des métabolites et une forte concentration de cations pour équilibrer les PGs chargés négativement. Environ 30 % de l'eau existe dans l'espace intra-fibrillaire dans le collagène et semble exister sous forme de gel, tandis qu'un faible pourcentage est contenu dans l'espace intracellulaire. Le reste est contenu dans l'espace poreux de la matrice. En plus de fournir la lubrification, le flux d'eau à travers le cartilage et à travers la surface articulaire aide à transporter et distribuer des nutriments aux chondrocytes.

#### **1.2.3.2.1 Collagènes**

Parmi les macromolécules structurales de la matrice, les collagènes sont les plus abondants, contribuant à environ 60% du poids sec du cartilage articulaire. Spécifiquement, le collagène de type II représente 90-95% des collagènes dans la matrice. Les types de collagène



I, IV, V, VI, IX, X et XI contribuent à une proportion mineure et servent à former et à stabiliser le réseau de fibrilles de collagène de type II qui s'entrecroisent avec les PGs. L'organisation de ce maillage serré qui s'étend à travers le tissu fournit la rigidité en traction, la cohésion et la force du cartilage articulaire (Eyre, 2002; Sophia Fox et al., 2009) (Figure. 5).

#### **1.2.3.2.2 Protéoglycanes**

Le deuxième groupe de macromolécules dans la matrice est les PGs. Il existe deux grandes classes de PGs: les grosses molécules (agrécanes) et les plus petits PGs (décorine, biglycan et fibromoduline) (Roughley and Lee, 1994).

Les agrécanes interagissent avec l'acide hyaluronique (long polysaccharide) et les protéines de liaison pour former de grands complexes de PGs. Cette interaction aide à ancrer les PGs dans la matrice et confère au cartilage ses propriétés osmotiques, ce qui est essentiel à son rôle dans la résistance aux charges de compression (Hardingham et al., 1994; Knudson and Knudson, 2001; Watanabe et al., 1998).

Au contraire, les petits PGs non-agrégatifs ne contribuent pas directement au comportement mécanique du cartilage articulaire. Cependant, ils diffèrent par la composition et la fonction du GAG. La décorine et le biglycan possèdent respectivement 1 et 2 chaînes de sulfate de dermatane, tandis que la fibromoduline possède plusieurs chaînes de sulfate de kératine. La décorine et la fibromoduline interagissent avec les fibrilles de collagène de type II dans la matrice et jouent un rôle dans la fibrillogenèse et les interactions interfibrillaires. Le biglycan se trouve principalement dans l'environnement immédiat des chondrocytes, où ils peuvent interagir avec le collagène VI (Buckwalter and Mankin, 1998; Hedlund et al., 1994; Poole et al., 1996) (Figure 5).

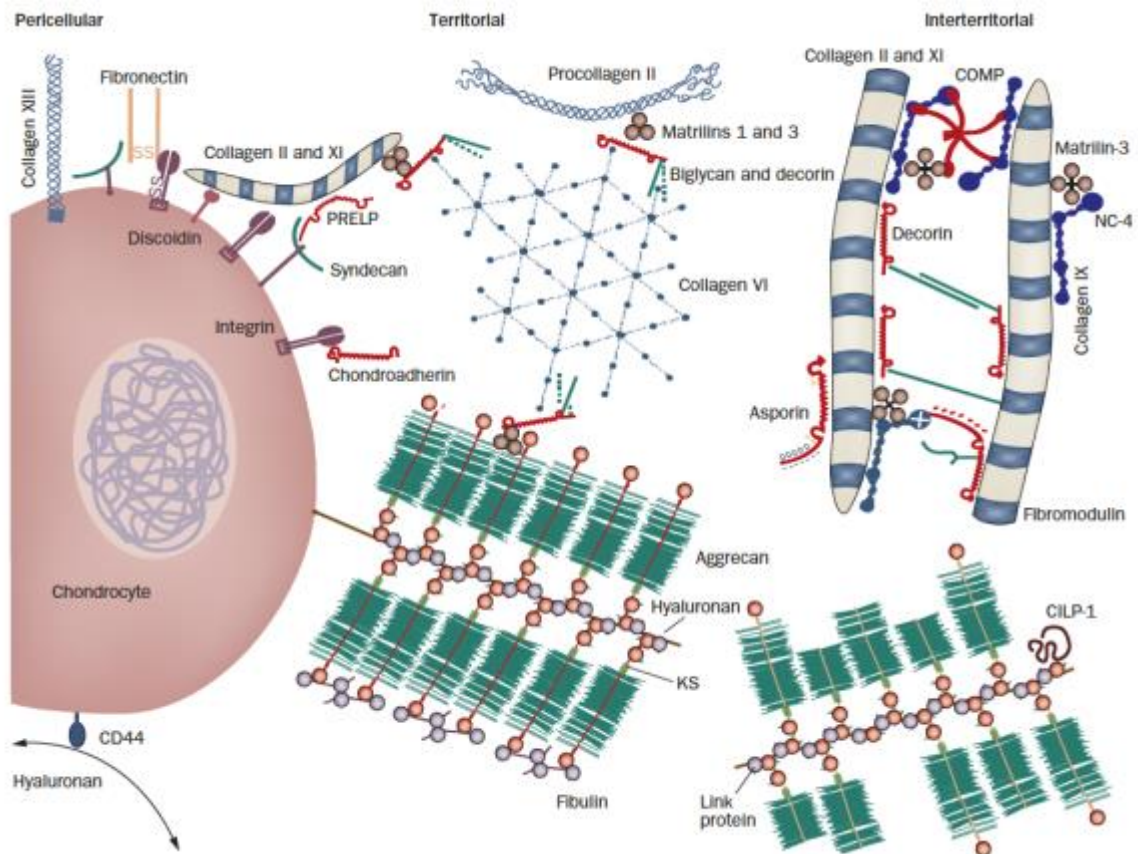


Figure 5 La matrice extracellulaire du cartilage. Trois catégories de macromolécules existent dans le cartilage articulaire: -les collagènes (principalement le collagène de type II); -les PGs (principalement agrécane); - d'autres protéines non collagéniques (y compris la protéine de liaison, la fibronectine, la protéine de matrice oligomère de cartilage), des PGs plus petits (biglycan, décorine et fibromoduline). (Heinegård and Saxne, The role of the cartilage matrix in osteoarthritis, *Nat. Rev. Rheumatol*, 2011)

## 1.2.4 Structure du cartilage

Les macromolécules structurales et les chondrocytes s'organisent en structure très ordonnée pour former le cartilage articulaire. Le cartilage est un tissu hétérogène. Sa composition, organisation, morphologie cellulaire et propriétés mécaniques varient de la membrane synoviale à l'os sous chondral. Dans chaque zone, la composition, l'organisation et la fonction de la matrice varient aussi avec la distance du chondrocyte donnant lieu à la région péri-cellulaire, à la région territoriale et à la région interterritoriale. Les quatre zones de la surface articulaire à l'os sous-chondral sont définies comme la zone superficielle, la zone transitoire, la zone médiane (radiale ou profonde) et la zone cartilagineuse calcifiée (Buckwalter et al., 2005; Sophia Fox et al., 2009) (Figure 6).

La zone superficielle est en contact avec le liquide synovial et est la plus fine zone de cartilage articulaire. Elle contient un nombre relativement élevé de chondrocytes ainsi que le collagène de type II et de type IX étroitement serrés et alignés parallèlement à la surface articulaire. Cette zone est importante pour la protection et l'entretien des zones plus profondes. De plus, les fibrilles de collagène densément comprimées sont situées parallèlement à la surface de l'articulation, ce qui confère à cette zone de bonnes capacités de résistance aux tensions et aux pressions subies lors du mouvement. La zone superficielle protège le cartilage sous-jacent des forces de déchirement générées lors de l'activité articulaire (Clark, 1990) (Figure 6).

Avec 40-60% du volume total du cartilage, des PGs et les fibrilles de collagène plus épaisses, la zone transitoire est la première ligne de résistance aux forces de compression. Cette zone est composée de chondrocytes sphériques de taille plus importante qui synthétisent une matrice riche en collagènes de type II, IX et XI, qui s'entrecroisent obliquement sans former un réseau orienté (au contraire aux collagènes de la zone superficielle). Cette zone fournit également un pont fonctionnel entre les zones superficielle et profonde.

En outre, la zone profonde contient une teneur en PG la plus élevée et une concentration d'eau la plus faible. Ces propriétés rendent la zone profonde responsable de la plus grande résistance aux forces de compression (Buckwalter et al., 2005; Sophia Fox et al., 2009) (Figure 6).

La zone cartilagineuse calcifiée est la zone la plus proche de l'os sous-chondral, qui contient des chondrocytes de type hypertrophique. Elle est pauvre en PGs et les fibres de collagène gardent une orientation radiaire, mais sans continuité avec les fibres de collagène de l'os sous-jacent (Figure 6).

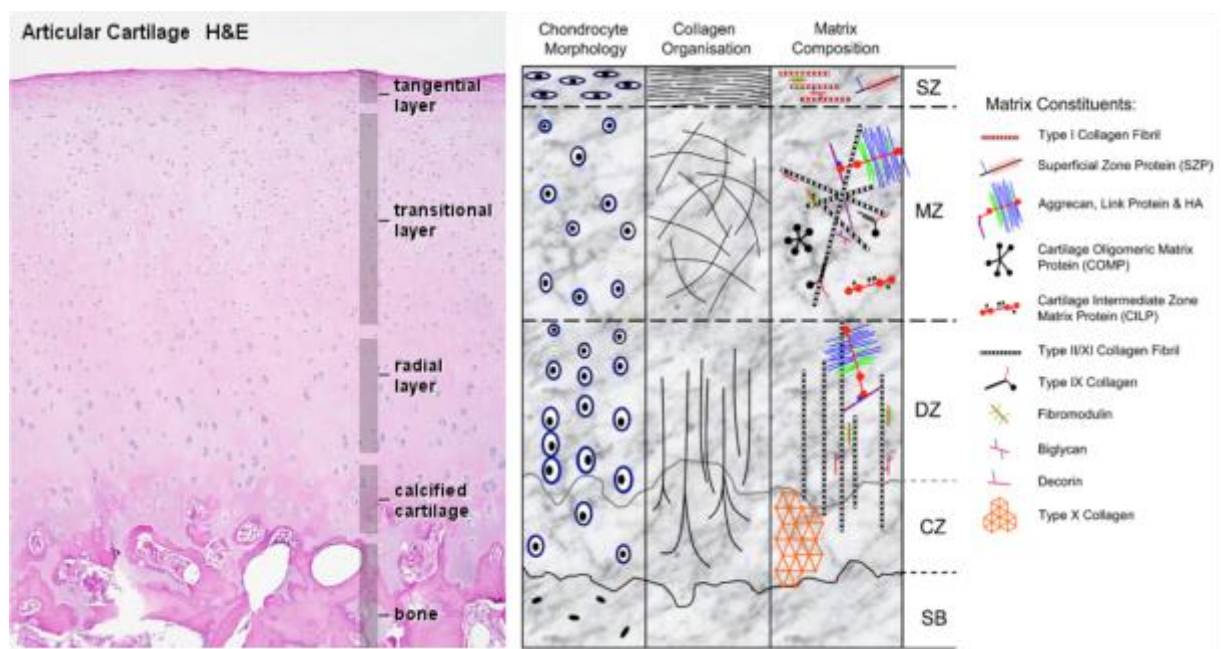


Figure 6 Représentation schématique de l'organisation macromoléculaire du cartilage articulaire. Le tissu se compose de quatre zones distinctes: Zone superficielle (SZ); Zone milieu (MZ), Zone profonde (DZ), Zone calcifiée (CZ) et Os sous-chondral (SB). (Hayes et al., *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2007).

### 1.3 Définition de l'arthrose

En 1986, le Collège Américain de Rhumatologie a défini l'arthrose comme «un ensemble hétérogène de conditions qui mènent à des symptômes et des signes articulaires associés à une

intégrité déficiente du cartilage articulaire, en plus des changements apparentés dans l'os sous-jacent » (Altman et al., 1986).

Le cartilage est le tissu le plus affecté par la pathologie arthrosique. La définition de l'arthrose a longtemps été centrée sur les modifications du cartilage articulaire. Cependant, ce concept a évolué. Bien que l'arthrose se caractérise par une perte progressive du cartilage articulaire, elle est une maladie de l'ensemble de l'articulation, non seulement le cartilage, la membrane synoviale, l'os et la moelle osseuse, mais aussi les ménisques, les ligaments, les muscles et les tissus nerveux semblent tous être impliqués dans l'initiation et la progression complexes de la maladie (Lories and Luyten, 2011) (Figure 7.a).

L'arthrose est caractérisée histologiquement par une fissuration et une fragmentation du cartilage articulaire, une hypertrophie des chondrocytes, une duplication et un avancement du tidemark, l'expansion de la zone du cartilage calcifié, l'épaississement de la plaque corticale sous-chondral et l'invasion vasculaire de l'os et cartilage calcifié (Figure 7.c-d). Le remodelage osseux sous-chondral, la formation d'ostéophytes, l'inflammation synoviale, le laxisme ligamentaire et l'affaiblissement des muscles péri-articulaires sont les résultats d'un déséquilibre entre l'anabolisme et catabolisme des articulations, tels que le genou, la hanche, et l'épaule, etc (Brandt et al., 2006). Par conséquent, l'individu atteint souffre de douleurs articulaires, de raideur et de limitation du mouvement. Sans traitement, ces symptômes évoluent lentement jusqu'à la destruction complète de la fonction articulaire.

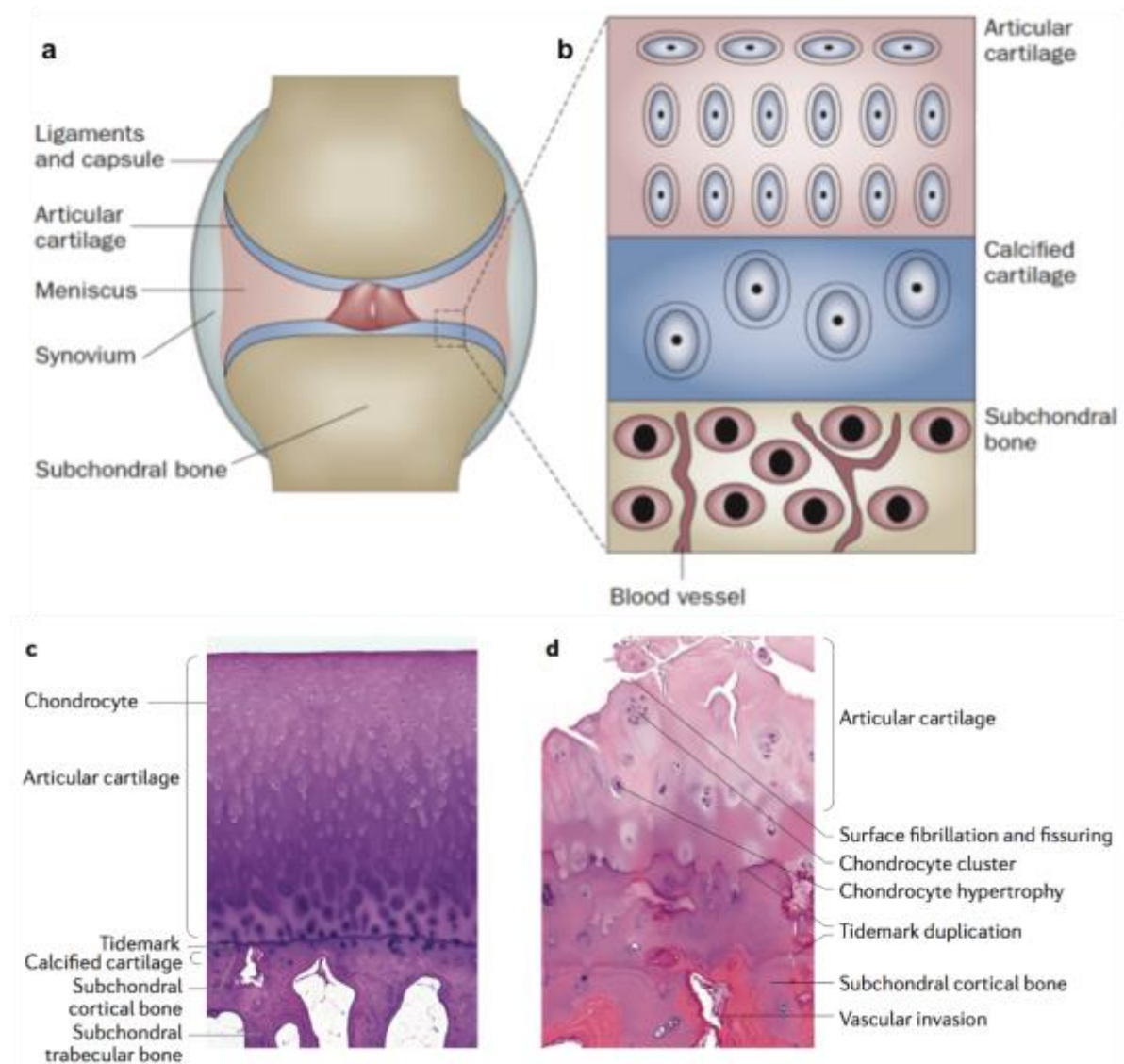


Figure 7 L'articulation diarthrique normale et de l'arthrose. a), L'articulation diarthrique unit deux os adjacents qui sont couverts par une couche de cartilage articulaire spécialisé et sont enfermés dans une capsules de tissu conjonctif bordée par une membrane synoviale. Elle permet le mouvement par interaction concertée entre ses différents tissus. b), L'illustration schématiquement de la coupe transversale de la surface articulaire d'une articulation diarthrique montre les principaux éléments structuraux, y compris le cartilage articulaire, le cartilage calcifié et l'os sous-chondral. c,d), L'illustration histologique d'une surface articulaire saine et de l'arthrose, montrant des changements d'arthrose, caractérisés par une fissuration et une fragmentation du cartilage articulaire, une hypertrophie des chondrocytes, une duplication et un avancement de tidemark, l'expansion de la zone du cartilage calcifié, l'épaississement de la plaque corticale sous-chondral et l'invasion vasculaire de l'os et cartilage calcifié. (Lories and Luyten, *The bone-cartilage unit in osteoarthritis*, *Nat. Rev. Rheumatol*, 2011; Martel-Pelletier, *Osteoarthritis*, *Nat. Rev. Disease Primers*, 2016).

## 1.4 Épidémiologie

L'arthrose est une cause majeure de douleur et d'invalidité qui a touché 151 millions d'individus dans le monde en 2000 (Zhuo et al., 2012). Les taux de prévalence augmentent fortement avec l'âge. Une étude récente menée en Espagne a montré que l'incidence de l'arthrose est 6,5 (genou), 2,1 (hanche) et 2,4 (main) pour 1 000 personnes (Prieto-Alhambra et al., 2014).

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études épidémiologiques ont permis de mieux comprendre l'histoire de cette maladie, en particulier pour l'atteinte de la hanche (coxarthrose), gonarthrose et des doigts. Ces données cliniques sont importantes car la connaissance de l'épidémiologie de l'arthrose est indispensable pour une meilleure approche thérapeutique de cette maladie.

Les estimations de la prévalence et de l'incidence de l'arthrose diffèrent largement en raison de la variation de la définition des cas et des articulations considérées. L'arthrose structurale (les destructions à la structure de l'articulation) correspond à la perte de cartilage, la formation d'ostéophytes, les modifications de l'os sous-chondral et les altérations méniscales. Ces altérations peuvent être visualisées par radiographie, ou observées par IRM. L'arthrose structurale des mains affecte environ 60% des adultes plus de 65 ans en Amérique du Nord et en Europe, 33% pour la gonarthrose et 5% pour la coxarthrose (Martel-Pelletier et al., 2016). L'arthrose est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes à l'âge de plus de 50 ans, la différence de sexe étant la plus prononcée pour l'arthrose de la main et du genou.

Ces altérations pourraient s'accompagner de douleurs articulaires (l'arthrose symptomatique) (Martel-Pelletier et al., 2016). La fréquence de la douleur varie selon les articulations affectées. La douleur est présente dans 15% des malades atteints d'arthrose des mains, 50% de gonarthrose structurale et plus de 50% pour la coxarthrose (Martel-Pelletier et al., 2016).

## **1.4.1 Facteurs de risque d'arthrose**

L'arthrose est une maladie articulaire dégénérative chronique qui a longtemps été considérée comme une maladie liée à l'âge. Les études épidémiologiques menées sur l'arthrose ont permis de déterminer de nombreux facteurs de risque, qui diffèrent selon les articulations. Plusieurs facteurs sont souvent associés chez un individu et la part de responsabilité de chaque facteur est parfois difficile voire impossible à déterminer. Dans la grande majorité des cas, l'arthrose est d'origine multifactorielle.

Indéniablement, l'âge est l'un des plus forts prédicteurs du développement de l'arthrose; Cependant, un certain nombre d'autres facteurs de risque existent, y compris les lésions articulaires précédentes, l'obésité, la génétique, le sexe et les facteurs anatomiques liés à l'alignement des articulations, et plus récemment, les facteurs environnementaux (tels que l'exposition prénatale à la caféine, l'alcool et la nicotine) contribuent aussi à la probabilité de développement de l'arthrose (Luo et al., 2015; Ni et al., 2015; Tie et al., 2016a).

### **1.4.1.1 Facteurs généraux**

#### **1.4.1.1.1 Âge**

L'âge est l'un des facteurs de risque les plus importants pour l'arthrose (Loeser et al., 2016), quelle que soit l'articulation concernée. 19 études ont évalué l'âge comme facteur de risque de gonarthrose. Les auteurs sont généralement d'accord pour dire que l'augmentation de l'âge est un facteur de risque important pour le début de gonarthrose (Silverwood et al., 2014). Une étude publiée en 2014, qui incluait plus de 3 millions d'individus, a examiné l'incidence de l'arthrose diagnostiquée cliniquement et a rapporté que l'incidence de l'arthrose de la main chez les femmes atteint son maximum entre 60 et 64 ans, alors que coxarthrose et gonarthrose continue à augmenter avec l'âge (Prieto-Alhambra et al., 2014). Losina et al. ont utilisé les



données du National Health Interview Survey qui a rapporté que l'incidence de gonarthrose symptomatique atteignait son maximum entre 55 et 64 ans (Losina et al., 2013). Järvholm et al. (Järvholm et al., 2005) ont suggéré une relation «non linéaire» entre l'âge et l'incidence de gonarthrose, avec une forte augmentation de l'incidence entre 50 et 75 ans chez les hommes, puis une augmentation limitée au-delà de 75 ans.

Bien que plusieurs études confirment la corrélation élevée entre l'âge et l'arthrose, le mécanisme réel n'a pas encore été définitivement identifié. Cependant certains facteurs liés à l'âge contribuent au développement de l'arthrose. La corrélation dépend probablement de modifications qui se produisent dans la structure normale des articulations et qui affectent les chondrocytes et la MEC, ce qui se traduit par une diminution de la capacité de l'articulation à s'adapter à différentes agressions biochimiques et mécaniques (Mobasheri et al., 2015). Premièrement, la réduction de la masse musculaire et l'augmentation de la masse grasse modifient le chargement articulaire et sont associées à une augmentation de la production d'adipokines et de cytokines, entraînant une inflammation systémique (Greene and Loeser, 2015). Deuxièmement, les modifications de la MEC, y compris l'accumulation de produits de glycation avancés, la taille de l'agrécan réduite, l'hydratation réduite et le clivage du collagène accru, entraînent une altération des propriétés mécaniques du cartilage, ce qui le rend plus sensible à la dégénérescence (Lotz and Loeser, 2012). Troisièmement, la destruction de la MEC, la réduction de la densité cellulaire dans le ménisque et les ligaments favorisent la dégénérescence et peuvent potentiellement modifier la mécanique des articulations (Hasegawa et al., 2012; Pauli et al., 2011). Quatrièmement, la fonction de l'os sous-chondral est altérée en raison d'un nombre réduit d'ostéocytes. Cinquièmement, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydatif et l'autophagie modifient la fonction des chondrocytes, favorisant les processus cataboliques et la mort cellulaire (Lotz and Loeser, 2012). En fait, les chondrocytes ont une prolifération limitée au cours de leur vie (environ 30-40 passages). Ce

phénomène se produit vers la fin de la progression du cycle cellulaire. Il est courant que la sénescence des chondrocytes est le principal facteur responsable du développement et de la progression de l'arthrose, car les cellules sénescents perdent la capacité de maintenir et de réparer la MEC du cartilage (Mobasheri, 2011). En outre, le processus de vieillissement implique une diminution significative du nombre de chondrocytes dans le cartilage articulaire, qui subissent une mort apoptotique, ce qui est directement corrélée avec le degré de la lésion du cartilage (Zamli and Sharif, 2011). Bien que de nombreux auteurs aient rapporté la présence de chondrocytes apoptotiques dans le cartilage arthrosique, seuls quelques-uns ont examiné la corrélation entre l'apoptose et le vieillissement dans le cartilage normal, et une seule étude dans le cartilage de rat a révélé une augmentation de l'apoptose avec le vieillissement. Dans des conditions physiologiques normales, les chondrocytes maintiennent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la MEC, régulant ainsi l'intégrité structurelle et fonctionnelle du cartilage (Musumeci et al., 2011). Les caractéristiques d'apoptose, détectées dans les chondrocytes arthrosiques, sont associées à la dégradation et à la calcification de la matrice, ce qui suggère un rôle important des mécanismes de survie et de mort cellulaire dans la pathogenèse de l'arthrose.

#### **1.4.1.1.2 Sexe**

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent une différence significative entre homme et femme. Les femmes montrent généralement une prévalence plus élevée de l'arthrose à la main, au pied et au genou que les hommes (Srikanth et al., 2005). 11 études de cohorte ont évalué le sexe féminin comme un facteur de risque potentiel (Silverwood et al., 2014). Le rôle de facteurs hormonaux a logiquement été évoqué mais n'a jamais été clairement démontré, la différence avec les hommes étant marquée à partir de l'âge de la ménopause. Ainsi, la prévalence de la gonarthrose symptomatique et radiologique est de 2,9% pour les femmes

âgées de 45 à 65 ans, de 15% dans la tranche d'âge 65-74 ans, et dépasse 30% au-delà de 85 ans (Hart and Spector, 1993; McAlindon et al., 1992). Cette augmentation de prévalence avec l'âge est plus forte chez les hommes avant 50 ans, puis plus forte chez les femmes après 50 ans, c'est-à-dire après la ménopause.

L'augmentation de la prévalence et de l'incidence de l'arthrose symptomatique à la ménopause suggère que la carence en estrogènes chez la femme s'accompagne d'une accélération des processus cellulaires aboutissant à la dégradation de la matrice cartilagineuse. Cette hypothèse selon laquelle la carence estrogénique pourrait être délétère pour le cartilage a été en partie confirmée par une étude récente, qui a démontré que le risque de développer une gonarthrose est plus important chez les femmes ayant les plus bas taux plasmatiques d'estradiol (Sowers et al., 2006).

Il a aussi été mis en évidence que la coxarthrose et gonarthrose sont plus souvent évolutives et plus souvent symptomatiques chez les femmes en période post-ménopausique (Richette et al., 2003). 4 études ont étudié l'effet des estrogènes. Certains ont suggéré que l'ingestion d'œstrogènes, principalement sous forme de thérapie de remplacement hormonal, peut offrir une certaine protection contre gonarthrose, et 3 articles proposent que les patients qui ont eu une hystérectomie, donc moins d'exposition aux estrogènes endogènes, étaient plus susceptibles de développer une gonarthrose (Silverwood et al., 2014). Cependant, aucune association était significative statistiquement.

De plus, les femmes présentent des atteintes globalement plus sévères. Cet écart entre les deux sexes augmente avec l'âge (Felson, 2004). Les disparités peuvent également dépendre de la différence dans la structure des os et des ligaments, comme la force et l'alignement, la laxité des ligaments ou juste un volume réduit de cartilage chez les femmes comparé à celui des hommes.

### **1.4.1.1.3 Susceptibilité génétique**

De nombreuses études ont montré le rôle de l'hérédité au cours de la pathologie arthrosique. Les études de jumeaux mono- ou dizygotes ont permis d'estimer l'influence des facteurs génétiques à environ 50% pour l'arthrose digitale, la gonarthrose et la coxarthrose (Spector and MacGregor, 2004).

Ces études suggèrent que plusieurs gènes sont susceptibles d'être impliqués dans la sensibilité à l'arthrose. L'évaluation des gènes candidats concernent les gènes codant pour le Col II, d'autres protéines structurales de la MEC, la vitamine D et les gènes des récepteurs aux œstrogènes et pour les facteurs de croissance d'os et du cartilage (Loughlin, 2001).

### **1.4.1.1.4 Facteur métabolique**

Le facteur métabolique est un facteur de risque important (Bijlsma et al., 2011). L'arthrose métabolique se caractérise par ses principales caractéristiques causales, les adipokines, l'hyperglycémie et le déséquilibre hormonal, et son ciblage sur des personnes âgées (45-65 ans) conduisant à la gonarthrose, à l'arthrose digitale et à l'arthrose généralisée. L'arthrose métabolique a maintenant été caractérisée comme un sous-type d'arthrose, et des liens ont été découverts entre ce phénotype et le syndrome métabolique (Zhuo et al., 2012). La définition principale du syndrome métabolique est celle du National Cholesterol Education Program américain (NCEP-ATPIII) publiée en 2001 (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001) (Tableau 1). Cette définition prend en compte une association de facteurs de risque : hypertension artérielle, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, obésité androïde et élévation de la glycémie.

Tableau 1 Définition du syndrome métabolique selon les critères américains du NCEP ATP III

Facteur de risque	Seuil retenu
Syndrome métabolique défini comme la présence d'au moins 3 de critères suivants :	
Tour de taille	> 102 cm, homme ; > 88 cm, femmes
Triglycérides	≥ 1,50 g/L
HDL cholestérol	< 0,40 g/L, hommes ; < 0,50 g/L, femmes
Pression artérielle	≥ 130/85 mm Hg
Glycémie à jeun	≥ 1,10 g/L

Le syndrome métabolique, asymptomatique résulte de la prévalence élevée de l'obésité. Il est prévalent chez 59% des patients atteints d'arthrose et chez 23% de la population sans l'arthrose. Des études ont également révélé que les personnes atteintes du syndrome métabolique développent une arthrose à un âge plus précoce et ont une pathologie plus généralisée, une augmentation de l'inflammation et une douleur intense dans les articulations, en comparaison avec les patients atteints d'arthrose en l'absence de syndrome métabolique (Zhuo et al., 2012).

De plus en plus d'études épidémiologiques suggèrent que l'arthrose est liée à une maladie vasculaire athéromateuse. Conaghan et al ont proposé que l'arthrose, ou au moins la progression structurale de l'arthrose, peut être une maladie vasculaire athéromateuse de l'os sous-chondral (Conaghan et al., 2005).

L'hypertension s'associe à l'arthrose par l'ischémie sous-chondrale, qui peut compromettre l'échange d'éléments nutritifs dans le cartilage articulaire et déclencher le remodelage osseux (Figure 8).

Le dépôt lipidique ectopique dans les chondrocytes induits par la dyslipidémie pourrait initier un développement de l'arthrose (Figure 8). Bien que les mécanismes restent obscurs,

une série de théories décrivent un lien entre la dyslipidémie et l'arthrose. Des dépôts importants lipidiques dans le cartilage arthrosique, en particulier dans les chondrocytes, aux premiers stades de la maladie avant que les changements histologiques ne deviennent apparents, indiquent que le dépôt lipidique dans l'articulation pourrait déclencher le processus pathologique de l'arthrose. En outre, des analyses protéomiques du cartilage arthrosique et des chondrocytes ont montré qu'une proportion importante de protéines liées au métabolisme lipidique, comme des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) et les apolipoprotéines, sont exprimées de façon différentielle dans le tissu arthrosique. Les PPAR sont des facteurs de transcription sensibles aux lipides et aux acides gras libres, leur modulation régule de nombreux gènes directement impliqués dans le métabolisme des acides gras, des lipoprotéines et des sucres, ainsi que l'activité d'autres facteurs nucléaires impliqués dans des processus inflammatoires et pro-thrombotiques. Ces récepteurs sont également exprimés dans les cellules résidentes de l'articulation, leur activation réprime l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF $\alpha$ ), de gènes précoces de l'inflammation (iNOS, COX-2, mPGES-1) ou de métalloprotéases matricielles (MMP-1, MMP-13) (Jouzeau et al., 2008). Enfin, l'activité biosynthétique des cellules précurseurs mésenchymateuses pourrait être modifiée par une dyslipidémie chez les patients atteints d'arthrose, perturbant l'homéostasie entre l'adipogenèse et l'ostéogenèse ou la chondrogénèse (Aspden et al., 2001).

Des études épidémiologiques concernant l'association entre l'hyperglycémie et l'arthrose ont inclus plus de 10 000 patients. Cinq études ont conclu à une association positive entre l'augmentation des taux de glucose dans le sang et l'incidence de l'arthrose, mais les deux études avec les plus grandes populations (1 514 et 5 193, respectivement) n'ont trouvé aucune association ou simplement une tendance non significative entre eux (Zhuo et al., 2012). Parce que les résultats restent controversés et sont confondus avec d'autres facteurs, tels que l'âge et l'indice de masse corporelle (IMC), il n'y a pas de conclusion définitive concernant

l'hyperglycémie comme facteur de risque pour l'arthrose. Cependant, les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'hyperglycémie présente des toxicités locales et systémiques sur l'arthrose, causées par une concentration élevée en glucose. Localement, les effets délétères induits par l'hyperglycémie sur le cartilage sont médiés par le stress oxydatif et les produits terminaux de glycation avancée (Advanced Glycation End-products (AGEs) (Figure 8), qui conduisent à la rigidité de la MEC, à la destruction osseuse sous-chondrale et au dysfonctionnement des chondrocytes. Plus précisément, l'hyperglycémie diminue le transport du déshydroascorbate en chondrocytes, compromettant la synthèse du Col II et les niveaux croissants d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et de médiateurs inflammatoires pour méditer la destruction du cartilage. L'inflammation systémique causée par l'hyperglycémie est directement liée à la perte de cartilage et exacerbe également le stress oxydatif qui conduit à une toxicité locale. Le dysfonctionnement moteur et sensoriel du muscle causé par l'accumulation de glucose peut être un autre facteur systémique dans la pathogenèse de l'arthrose (Zhuo et al., 2012).

De nombreuses études ont montré que l'augmentation de la charge pondérale sur l'articulation inhibe la synthèse de la MEC et induit l'expression de facteurs pro-inflammatoires (cyclooxygénase 2, oxyde nitrique (NO), IL-1 $\beta$  et prostaglandine E2 (PGE2)) et les enzymes dégradations (MMP3, MMP13 et ADAMTS-5) dans les chondrocytes en activant le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B), la régulation de signal extracellulaire de la protéine kinase (ERK) et les voies de signalisation du Ca<sup>2+</sup>. De plus, l'aspect métabolique de l'adiposité est reconnu comme un facteur plus important que l'augmentation de la charge à la forte prévalence de l'arthrose chez les personnes obèses. Les tissus adipeux peuvent libérer un certain nombre d'adipokines (Figure 8), comme la leptine, l'adiponectine, et la visfatine. L'augmentation de leptine chez les patients atteints d'arthrose est plus importante dans le

liquide synovial, les ostéophytes et le cartilage, et son expression dans le cartilage augmente avec la sévérité de l'arthrose (Zhuo et al., 2012).

Un lien entre carence vitaminique C ou D et l'arthrose est suggéré par quelques études. Une hypothèse serait que la sensibilité à l'arthrose est augmentée par des dommages oxydatifs au cartilage et autres tissus articulaires causés par les radicaux oxygénés qui sont produits par les chondrocytes dans le cartilage endommagé. L'utilisation d'antioxydants en diététique tels que les vitamines C et E pourraient protéger de l'arthrose. De plus, la vitamine C joue un rôle bénéfique dans la synthèse du collagène. Une étude longitudinale de la population a montré que les hommes et les femmes âgés ingérant une quantité importante de vitamine C avaient une progression de gonarthrose ralentie ainsi que moins de douleur au genou (Arden and Nevitt, 2006; McAlindon et al., 1996b). La vitamine D, grâce à son rôle important dans le métabolisme osseux, peut moduler les réponses osseuses péri-articulaires à un excès de charge et aux lésions articulaires. Les chondrocytes dans le cartilage arthrosique ont une sensibilité accrue à la vitamine D. La protection contre la progression de la gonarthrose a été signalée chez les hommes plus âgés et les femmes ayant des régimes à base de vitamine D élevés, et pour ceux avec des niveaux sériques élevés de vitamine D (McAlindon et al., 1996a).



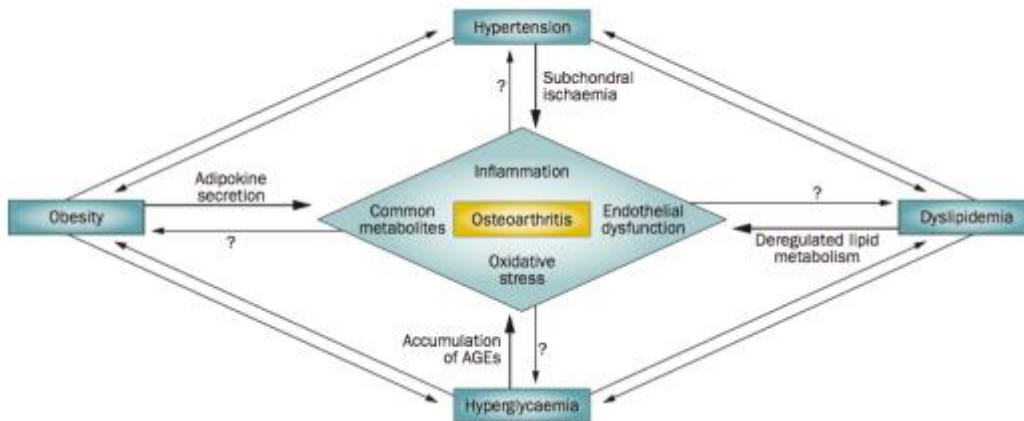


Figure 8 L'arthrose est liée au syndrome métabolique. L'association entre hypertension et l'arthrose est centrée sur l'ischémie sous-chondrale; La dyslipidémie induit une dérégulation du métabolisme lipidique cellulaire dans les tissus articulaires; L'hyperglycémie est corrélée avec l'arthrose par le dépôt excessif d'AGE. Les facteurs métaboliques liés à l'obésité altèrent les taux circulants d'adipokines, qui contribuent au développement de l'arthrose. Les aspects du syndrome métabolique contribuent clairement à la pathogénèse d'arthrose, Abréviations: AGE, (advanced glycation end-products) produit final de glycation avancée. (Zhuo et al., Metabolic syndrome meets osteoarthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2012)

#### 1.4.1.1.5 Facteur ethnique

La prévalence de l'arthrose varie de manière importante selon le groupe ethnique. Ceci est particulièrement marqué pour l'arthrose digitale et la coxarthrose, qui sont beaucoup moins fréquentes chez les patients d'origine chinoise par comparaison à la population blanche nord-américaine (Zhang et al., 2003). Cependant, les autres études sont en conflit avec l'existence d'une corrélation entre l'origine ethnique et l'arthrose. Certaines études menées par the National Health and Nutrition Examination Survey I (NHANES I) suggèrent que les femmes afro-américaines sont plus susceptibles de développer la gonarthrose que les hommes et les personnes de race blanche (Felson et al., 2000), alors que le Johnston County Osteoarthritis Project (JCOAP) a trouvé qu'il n'y a pas de différence (Anderson and Felson, 1988; Jordan et al., 1995). Les résultats sont tout à fait opposés dans la coxarthrose, où la NHANES n'a pas

révélé de différences (Tepper and Hochberg, 1993) alors que la JCOAP a trouvé une différence (Jordan et al., 2007). Ces disparités peuvent s'expliquer par des différences de mode de vie, des facteurs socio-économiques, de la nutrition, de l'IMC et des facteurs génétiques, et même des facteurs environnementaux.

### **1.4.1.2 Les Facteurs de risque locaux**

#### **1.4.1.2.1 Le surpoids et l'obésité**

Le surpoids et l'obésité sont définis à partir de l'IMC, IMC entre 25 et 30 est surpoids, il s'agit d'obésité si  $IMC > 30$ . Le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque majeurs de la gonarthrose, en raison de l'augmentation des contraintes mécaniques aux membres inférieurs. Une Meta-analyse de Silverwood a montré que 23 études de cohortes ont bien conclu qu'une surcharge pondérale augmente significativement le risque de développer la gonarthrose (Silverwood et al., 2014). Le risque de la gonarthrose a été évalué par Anderson et al. Ils ont trouvé que chaque augmentation d'une unité d'IMC est associée à une augmentation de risque de plus de 15 % (Anderson and Felson, 1988). L'obésité a un effet légèrement plus grand sur le début de la gonarthrose que le surpoids (Silverwood et al., 2014).

Cependant, une étude a comparé le risque de surpoids sur le développement de la gonarthrose à celui de développer la coxarthrose et a conclu que l'association entre le surpoids et le développement de la coxarthrose était plus faible (Gelber et al., 1999). L'incidence de la coxarthrose ne paraît pas particulièrement augmentée chez les sujets en surpoids ou obèses par comparaison à ce qui est observé au cours de la gonarthrose (Hochberg, 2005; Lievense et al., 2002). Le pronostic de la coxarthrose et la gonarthrose chez un sujet obèse est globalement plus mauvais, nécessitant plus souvent le recours à une prise en charge chirurgicale.

Les facteurs métaboliques liés à l'obésité, en particulier les taux modifiés d'adipokines, contribuent au développement de l'arthrose en induisant l'expression de facteurs pro-inflammatoires ainsi que d'enzymes dégradantes, conduisant à l'inhibition de la synthèse de la matrice du cartilage et à la stimulation du remodelage osseux sous-chondral (décrit ci dessus).

#### **1.4.1.2.2 Traumatisme, antécédent traumatique**

Un traumatisme articulaire peut déboucher à long terme en l'arthrose. L'arthrose post-traumatique est une forme d'arthrite qui se développe après un traumatisme au niveau des articulations. La prévalence estimée de gonarthrose est de 14 à 42%, selon l'âge et le sexe, elle est plus fréquente chez les femmes âgées (> 60 ans). Les estimations suggèrent que l'arthrose post-traumatique représente au moins 12% de l'arthrose aux Etats-Unis, et la vraie prévalence est probablement plus élevée. Ce lien entre antécédents traumatiques et l'arthrose est important dans la gonarthrose. 13 études de cohorte ont trouvé qu'une lésion antécédente du genou est un facteur de risque pour la gonarthrose. Une seule étude montre cependant que les personnes présentant une lésion antécédente du genou présentaient un risque faible mais non significatif pour développer la gonarthrose (Silverwood et al., 2014). Les antécédents d'atteintes ligamentaires, méniscales et fracturaires au genou sont fortement associés à la survenue, à terme, d'une dégénérescence arthrosique. La réalisation d'une méniscectomie peut être à l'origine d'un risque de développement de la gonarthrose.

#### **1.4.1.2.3 Les activités physiques**

Il y a eu un concept controversé que l'activité physique peut être préjudiciable aux articulations porteuses de poids. De plus en plus de preuves suggèrent que l'activité physique, en particulier le chargement articulaire, est importante pour le développement et le maintien

de l'activité du genou. Les enfants physiquement actifs accumulent plus de volume cartilagineux que ceux qui sont plus sédentaires. L'immobilité forcée chez l'adulte conduit à une perte rapide du volume du cartilage (Martel-Pelletier et al., 2016). Cependant, la preuve que l'activité physique est bonne ou mauvaise pour les articulations chez les adultes est controversée. Par exemple, des niveaux d'activité physique vigoureuse ont été associés à une augmentation du risque pour la prothèse du genou, mais pas de la hanche chez les patients arthrosiques. Cependant, une activité physique vigoureuse a été associée à un effet bénéfique sur le cartilage articulaire du genou chez les adultes sains. Les articulations présentant des anomalies structurelles pourraient ne pas être capables de supporter les charges transmises par l'activité physique (Martel-Pelletier et al., 2016).

Les activités physiques sévères favorisent la survenue de certaines formes d'arthrose. Cette association est claire dans l'arthrose digitale et la coxarthrose. Les activités physiques ont été évaluées par 16 études. Trois études ont révélé une relation statistiquement significative entre des niveaux élevés d'activité physique ou d'activité physique intense, tels que la course longue distance et le développement de la gonarthrose. Une étude a suggéré que c'était une activité physique habituelle qui constituait le plus grand risque. Tous les autres articles ont discuté l'existence d'un risque théorique mais n'ont pas révélé de résultats significatifs. Une étude a suggéré que des niveaux plus élevés d'activité physique étaient associés à la gonarthrose chez les hommes plus jeunes (20-49 ans) mais pas chez les hommes de plus de 50 ans ou chez les femmes (Silverwood et al., 2014).

#### **1.4.1.2.4 Les facteurs environnementaux**

La pathogenèse de l'arthrose est probablement affectée par une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (Dieppe and Lohmander, 2005). Les facteurs environnementaux peuvent agir sur la période de grossesse.

Le syndrome IUGR basé sur le poids à la naissance est un indice important pour évaluer l'état de naissance. Le IUGR est défini comme un poids ou la taille à la naissance inférieure au 10e centile ou inférieur à deux écarts types inférieurs à la moyenne au même âge gestationnel (Ni et al., 2015).

Les études ont montré que l'exposition prénatale à la caféine induit un retard de chondrogénèse chez les rats de descendance IUGR, et l'exposition prénatale à la caféine induit une mauvaise qualité du cartilage articulaire chez la progéniture mâle adulte nourrie avec régime alimentaire riche en matières grasses (Luo et al., 2015). L'étude de Ni et al a confirmé l'effet de l'exposition prénatale à l'éthanol sur la susceptibilité à l'arthrose chez les rats de descendance IUGR (Ni et al., 2015). Une autre étude a montré que l'exposition prénatale à la nicotine augmente la susceptibilité à l'arthrose de la progéniture adulte de IUGR (Tie et al., 2016a).

Le tabagisme a été associé avec des maladies chroniques de troubles musculo-squelettiques, peu d'études ont examiné relativement l'association entre le tabagisme et la gonarthrose. Certains ont trouvé aucune association (Hart and Spector, 1993; Sandmark et al., 1999; Schouten et al., 1992; Silverwood et al., 2014; Wilder et al., 2003), tandis que d'autres ont rapporté un effet protecteur possible du tabagisme sur gonarthrose (Anderson and Felson, 1988; Felson et al., 1989, 1997; Samanta et al., 1993). Cependant, ces études ont utilisé la radiographie pour évaluer la maladie qui est une technique peu sensible pour évaluer la lésion du cartilage articulaire. L'étude Framingham a examiné l'effet de l'usage du tabac sur la présence de la gonarthrose. Les résultats montrent que fumer peut être protecteur, quelque soient l'âge, le sexe, le poids, les antécédents traumatiques, le niveau d'activité physique, la consommation de café et d'alcool. Bien que Sandmark et al (Sandmark et al., 1999) ont rapporté que les fumeurs étaient moins susceptibles de subir une arthroplastie totale du genou, ils ont reconnu qu'il était impossible de savoir si cette conclusion était due à des différences

dans la gravité de la maladie elle-même ou par d'autres facteurs de risque qui ont empêché une intervention chirurgicale. Enfin, l'effet délétère du tabagisme sur le cartilage articulaire peut être plus grave lorsque le cartilage est déjà endommagé par d'autres mécanismes. Enfin, Schouten et al (Schouten et al., 1992) n'ont pas trouvé que les fumeurs avaient plus de risque de la gonarthrose avec plus de 12 ans de suivi en utilisant les radiographies pour évaluer la progression.

Les études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les composants du tabac, en particulier la nicotine, qui est le composé principal responsable de la dépendance d'un fumeur (Benowitz et al., 2009), a un effet délétère sur la fonction de chondrocytes dans les disques vertébraux, ce qui inhibe la prolifération des cellules et la synthèse de la MEC. Ces résultats ont indiqué les effets négatifs potentiels du tabagisme sur la fonction des chondrocytes dans le cartilage articulaire. Les faits suggèrent que le tabagisme peut avoir un effet négatif sur le métabolisme du cartilage. Dans une étude longitudinale sur les hommes avec la gonarthrose symptomatique suivis pendant 30 mois et évaluée en utilisant l'IRM, les fumeurs étaient plus susceptibles d'avoir une perte de cartilage articulaire que non fumeurs (Amin et al., 2007).

Le tabagisme peut avoir un effet délétère sur la progression de la gonarthrose symptomatique chez les hommes (Amin et al., 2007). L'effet du tabagisme sur la douleur chez les personnes souffrant de la gonarthrose symptomatique a également été examiné (Amin et al., 2007). Les fumeurs avaient une douleur plus sévère au genou tout au long de l'étude que les non fumeurs. Le mécanisme de cet effet est incertain. Le tabagisme peut avoir des effets directs sur les autres structures articulaires responsables de la douleur au genou ou peut modifier le seuil de la douleur musculo-squelettique chez les fumeurs, comme l'ont suggéré d'autres auteurs (Andersson et al., 1998).

L'action de la nicotine fera l'objet d'un paragraphe spécifique plus loin dans cette introduction.

## 1.5 Pathogénèse de l'arthrose

Dès 1953, il a été reconnu que «ce qui est si dommageable dans l'arthrose ne semble pas être la dégénérescence du cartilage, mais la tentative de réparation vigoureuse et persistante ... qui aggrave la fonction déjà désordonnée de l'articulation» (Harrison et al., 1953). Il a maintenant été établi que l'arthrose est une maladie de l'ensemble de l'articulation. La maintenance de l'homéostasie de la MEC du cartilage est la principale fonction des chondrocytes, fournissant un soutien structurel et un réservoir pour les cytokines et les facteurs de croissance, essentiels à la survie des cellules et au maintien de la fonction articulaire normale. Une dérégulation de l'homéostasie de la matrice entraîne la dégradation du cartilage, ainsi que le remodelage de l'os sous-chondral et l'inflammation synoviale. En raison des interactions étroites entre le cartilage, l'os et la synoviale, les altérations dans l'un de ces tissus ne semblent pas se produire indépendamment des autres. À mesure que la dégénérescence du cartilage se poursuit, la perte de la matrice induit la mort cellulaire et la dégénérescence tissulaire. L'homéostasie matricielle repose sur un équilibre entre les activités anaboliques et cataboliques, qui dépendent du nombre de chondrocytes viables. Par conséquent, la contribution de la mort cellulaire est un facteur important dans la progression et la sévérité de la maladie. Avec l'âge, les chondrocytes sénescents sont moins en mesure de maintenir et de réparer les tissus du cartilage articulaire. En outre, les chondrocytes deviennent moins réceptifs aux stimuli anabolisants comme les cytokines anaboliques et les facteurs de croissance.

L'arthrose se caractérise macroscopiquement et histologiquement par des altérations focales du cartilage articulaire sous forme de fissures puis d'érosions qui peuvent mettre à nu l'os sous-chondral. À ces lésions du tissu cartilagineux s'ajoutent des modifications des structures adjacentes, c'est-à-dire de l'os sous-chondral et de la membrane synoviale. L'arthrose intéresse donc l'ensemble de l'articulation et pas seulement le cartilage (Figure 9).

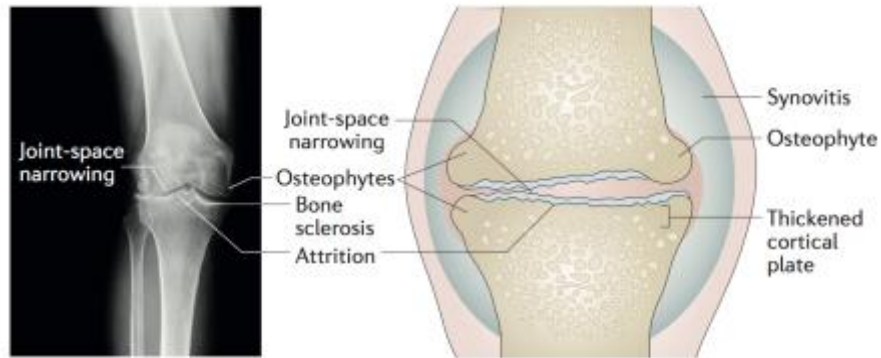


Figure 9 Représentation des modifications radiographiques et structurelles de l'arthrose. Les caractéristiques radiographiques de l'arthrose comprennent le rétrécissement de l'espace articulaire, la sclérose osseuse sous-chondrale, la formation d'ostéophytes aux marges articulaires et l'aplatissement et la déformation de la plaque corticale sous-chondrale. La synovite, qui est souvent présente, ne peut pas être détectée avec les radiographies standards. La perte d'espace articulaire résulte de la perte de cartilage articulaire, qui peut être asymétrique dans l'articulation du genou, affectant principalement le côté médian ou latéral. L'épaississement de la plaque corticale sous-chondrale explique l'apparition de la sclérose osseuse (Goldring et al, Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis : structure, function and cartilage-bone crosstalk, *Nat. Rev. Rheumatol*, 2016).

## 1.6 Traitement de l'arthrose

### 1.6.1 Traitements symptomatiques

Actuellement, les traitements en première intention comprennent la physiothérapie, l'exercice régulier, la réduction du poids, un contrôle de la douleur et de l'inflammation avec des médicaments analgésiques et des médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, une viscosupplémentation avec des injections d'hyaluronane de sodium et une variété de neutraceutiques comprenant le sulfate de chondroïtine, la glucosamine, les acides gras oméga 3 et d'autres produits divers. Tous les traitements actuels, sans exception, produisent des résultats symptomatiques plutôt que régénératifs (Barry and Murphy, 2013). Aucun de ces composés n'a un effet cliniquement utile sur la perte progressive des tissus



articulaires. Si les symptômes persistent après l'utilisation appropriée d'un traitement non chirurgical, la chirurgie peut être recommandée (Lützner et al., 2009).

## **1.6.2 Chirurgie**

Les traitements chirurgicaux comprennent l'arthroscopie, l'ostéotomie et l'arthroplastie. La détermination de laquelle de ces procédures est la plus appropriée dépendra de plusieurs facteurs, y compris l'emplacement et la gravité de l'altération cartilagineuse, les caractéristiques du patient et les facteurs de risque (Lützner et al., 2009). Les traitements traditionnels incluent le lavage des articulations, le débridement tissulaire, la microfracture de l'os sous-chondral, l'arthroplastie par abrasion ou la transplantation de greffes ostéochondrales autologues ou allogéniques (Estes et al., 2010). Le lavage et le débridement arthroscopique ne modifient pas la progression de la maladie et ne doivent pas être utilisés comme traitement de routine. Les techniques de stimulation de la moelle osseuse telles que la microfracture sont principalement utilisées pour traiter les défauts chondraux focaux. Pour les patients atteints d'arthrose sévère, l'arthroplastie totale peut être un traitement efficace (Lützner et al., 2009). Une approche d'ingénierie tissulaire, la transplantation de chondrocytes autologues, a montré des résultats prometteurs dans les premiers rapports cliniques, mais les essais contrôlés récents randomisés à long terme ne suggèrent pas de différence dans l'efficacité de cette procédure sur la microfracture de l'os sous-chondral à court, moyen et long terme (Knutsen et al., 2016). Le but des moyens thérapeutiques est de combler la perte de substance afin de restituer une congruence articulaire, si possible d'induire une cicatrisation hyaline, et donc d'éviter la dégénérescence arthrosique à moyen et long termes.

Les différents types de traitement mentionnés ci-dessous produisent finalement et/ou délivrent différents types de cellules de réparation produisant un cartilage articulaire hyalin plus ou moins différencié.

### 1.6.2.1 Stimulation de la moelle osseuse

Le but de la technique de stimulation de la moelle osseuse est d'induire un saignement de l'os sous-chondral suivi de la formation d'un caillot de fibrine, de la migration des CSM indifférenciées et de la formation de tissu fibrocartilagineux couvrant les lésions chondrales. Ces techniques ont été développées principalement pour le traitement des défauts chondraux focaux, mais sont également utilisées dans les genoux arthrosiques. La microfracture est la technique de réparation de référence (Gudas et al., 2005), initialement décrite par Steadman en 1994 (Steadman et al., 2003b). Cette technique est largement répandue avec des objectifs histologiques et tissulaires identiques. Le principe de cette technique est d'obtenir une cicatrisation d'un défaut artilagineux par la mobilisation et la stimulation des CSM contenues dans l'os sous-chondral (Figure 10). En effet, ce saignement va induire un tissu de comblement de substitution qui est majoritairement fibrocartilagineux avec du collagène de type I en six à huit semaines. Cependant, les propriétés mécaniques de ce fibrocartilage sont différentes, conduisant inéluctablement à sa dégradation et posant la question du maintien des résultats à long terme (Versier and Barbier, 2014).



Figure 10 Processus de réparation par microfractures. (Versier and Barbier, Techniques de reconstitution cartilagineuse, *Techniques chirurgicales - Orthopédie-Traumatologie*, 2014).

Steadman et al. ont montré que les patients jusqu'à 45 ans qui ont subi la procédure de microfractures pour des défauts chondraux à pleine épaisseur, sans ménisque associé ni pathologie des ligaments collatérales ou croisés, sur une période de suivi de 7 à 17 ans

(moyenne de 11,3 ans), ont présenté une amélioration statistiquement significative de la fonction et une diminution de la douleur (Steadman et al., 2003a). Mithoefer et al. ont fait une revue systématique des articles publiés sur la pratique de la microfractures en 2009 (Mithoefer et al., 2009). Leur conclusion est que cette technologie fournit une amélioration fonctionnelle efficace de la fonction du genou à court terme. Cependant ils ne disposent pas de données suffisantes sur ses résultats à long terme.

Quelle que soit la technique utilisée, le tissu fibrocartilagineux produit par stimulation de la moelle osseuse n'a pas les propriétés biomécaniques et la durabilité du cartilage articulaire d'origine et le traitement ne modifie probablement pas la progression de l'arthrose. La stimulation de la moelle osseuse n'est donc pas un traitement curatif (Lützner et al., 2009).

### **1.6.2.2 Mosaïcoplastie ou greffes ostéochondrales autologues**

Dans les techniques de greffe ostéochondrale, la zone du défaut de cartilage et l'os sous-jacent sont remplacés par un greffon articulaire correspondant qui a été récolté sous la forme d'une allogreffe provenant d'un donneur d'organe ou d'une autogreffe.

Hangody et Kárpáti ont décrit leur méthode utilisée dans les cas de lésions de cartilage sévère de la surface articulaire superficielle de la rotule et de la surface porteuse de poids du genou. Cette technique a été mise au point puis développée en Hongrie au début des années 1990 à partir d'études animales puis chez l'homme en 1992 (Hangody and Kárpáti, 1994) sur 14 patients. Les auteurs ont recueilli des cylindres osseux cartilagineux du fémur à partir de la surface articulaire non portante pour combler les défauts cartilagineux, y compris au niveau de la rotule. La greffe permet d'obtenir une excellente intégration osseuse, la présence de cartilage hyalin, mais aussi l'existence d'une interface cartilagineuse fibreuse (Figure 11). C'était la première description de la technique de la mosaïcoplastie. Largement

diffusée, elle est la technique de référence en France. À court terme, la greffe en mosaïque est une technique de restauration cartilagineuse validée (Vasiliadis and Wasiak, 2010).

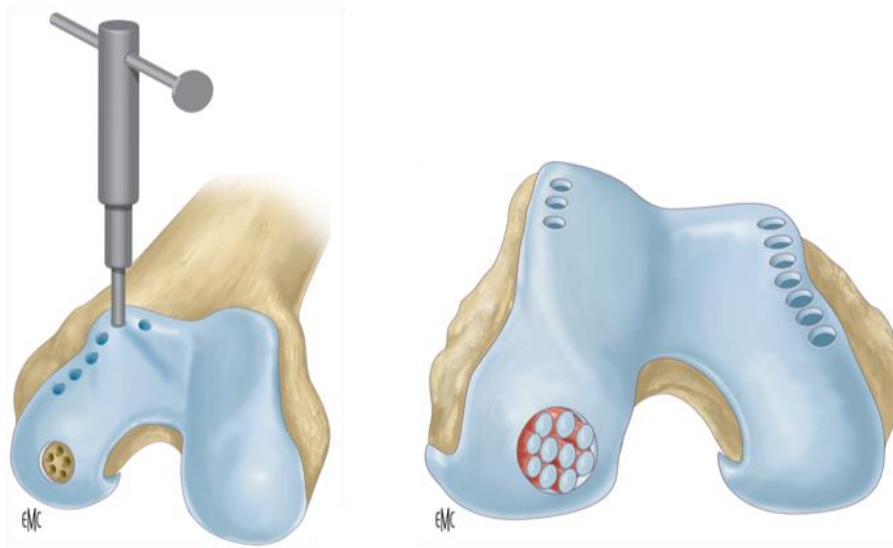


Figure 11 Processus de réparation par mosaïcoplastie. (Versier and Barbier, Techniques de reconstruction cartilagineuse, *Techniques chirurgicales - Orthopédie-Traumatologie*, 2014).

### 1.6.2.3 Approches de médecine régénérative

La médecine régénérative au moyen de cellules (chondrocyte, cellules souches (CS)) offre un concept innovant et récent pour le traitement de l'arthrose. Bien que la médecine régénérative ait commencé à être considérée pour le traitement de maladies sévères comme les pathologies cardiaques, la maladie du greffon contre l'hôte et même le cancer, son application dans le traitement de l'arthrose été relativement limitée jusqu'à aujourd'hui. Le défi est encore plus prononcé, allant du traitement d'un petit défaut de cartilage, dans un cartilage par ailleurs sain, au traitement d'un défaut de cartilage plus important dans une articulation arthrosique gravement dégradée.

Une approche de traitement actuellement utilisée pour les lésions du cartilage articulaire comprend la stimulation de la moelle osseuse par microfractures (Figure 12.a-c). L'utilisation de cellules manipulées exogènes telles que des chondrocytes autologues qui sont amplifiés en

culture (Figure 12.d), des chondrocytes allogéniques provenant de donneurs et des CSM provenant de diverses sources font actuellement l'objet d'une recherche intensive pour leur capacité régénérative de remplacer le cartilage dégradé.

Des études *ex vivo* ont montré qu'une régénération réussie du cartilage dépend à la fois de la vitesse de prolifération des chondrocytes et de la capacité de différenciation des CS dans une matrice 3D, qui agit comme support cellulaire. La deuxième génération de la transplantation de chondrocytes autologues (TCA) (Figure 12.e) s'est donc concentrée sur le développement d'approches basées sur l'utilisation de matrices pour délivrer des chondrocytes au site de la lésion du cartilage (Makris et al., 2015).

Cependant, la TCA n'est pas encore une technique qui peut être appliquée pour traiter l'arthrose sévère (Brittberg, 2008), en raison de l'atteinte de l'os sous-chondral. Cependant, l'arthrose précoce traitée avec TCA peut retarder la progression de la maladie (Makris et al., 2015; Minas et al., 2010). Comme les défauts chondraux apparaissent au début de l'arthrose, le comblement de ces défauts peut retarder l'incidence de l'arthrose (Nawaz et al., 2014).

Toutes ces techniques sont limitées à la réparation des lésions focales. Par conséquent, les patients atteints d'arthrose sont actuellement exclus de ces traitements (Nöth et al., 2008). Il est important de noter qu'il existe de nombreux problèmes associés à la récolte de tissus et de cellules autologues pour la réparation du cartilage. Parmi celles-ci, on peut citer l'état pathologique des cellules récoltées (à partir de l'articulation enflammée), l'absence de tissu autogène adéquat et la difficulté de la prolifération des cellules *ex vivo* en maintenant le phénotype des chondrocytes. Ces problèmes constituent des obstacles importants à l'utilisation de chondrocytes primaires autogènes pour des stratégies de traitement de réparation de cartilage réussies (Estes et al., 2010). Les derniers développements de la régénération du cartilage incluent l'utilisation d'autres sources de cellules, y compris les CSM et les cellules souches embryonnaires (CSE), l'utilisation de facteurs de croissance, et

l'implantation de cellules en supports ou des matrices 3D pour soutenir la croissance, la différenciation, et le maintien d'un phénotype chondrogénique (Mollon et al., 2013). Les CSM, qui ont la capacité de se différencier en cellules de la lignée chondrogénique, sont apparues comme un type cellulaire candidat avec un grand potentiel pour les technologies de réparation de cartilage articulaire cellulaire. Contrairement aux chondrocytes, l'utilisation de CSM n'est pas entravée par la disponibilité limitée de cartilage articulaire sain ou une tendance intrinsèque des cellules à perdre leur phénotype pendant l'expansion. L'utilisation de CSM évite également la nécessité d'une biopsie du cartilage et évite ainsi la morbidité provoquée par des lésions sur la surface articulaire du site donneur (Nöth et al., 2008).

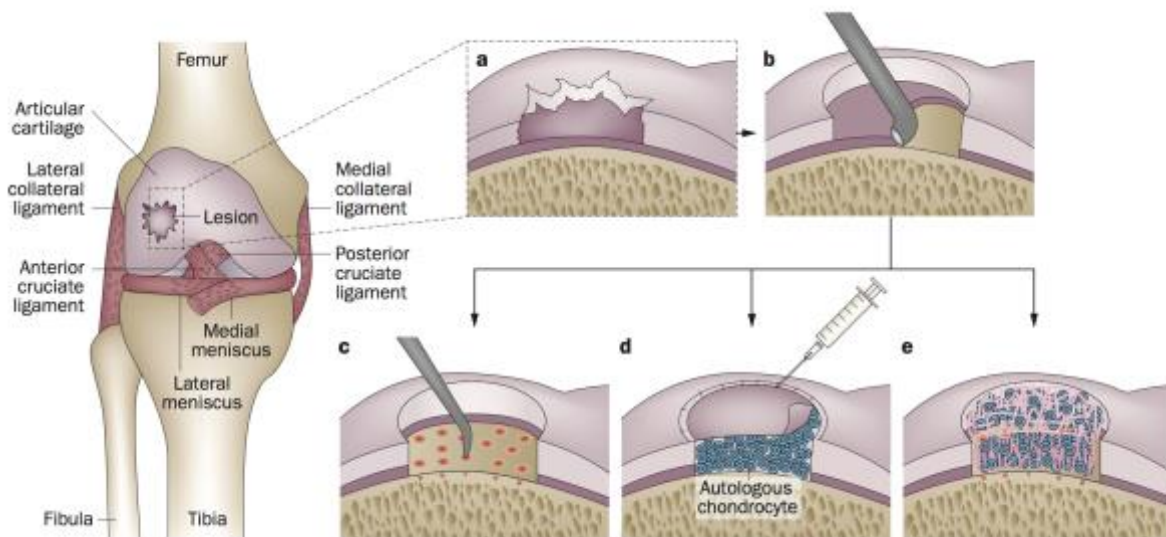


Figure 12 Techniques de régénération du cartilage. a) Une lésion chondrale focale de pleine épaisseur. b) La débridation de lésion. c) Microfracture, ce qui permet aux CSM de migrer de la moelle au défaut cartilagineux. d) TCA. La lésion est remplie de 12-48 millions de chondrocytes autologues et recouverte d'un lambeau périosté ou d'une membrane de collagène mixte de type I et de type III. e) ICAM. La population de chondrocytes autologues est développée in vitro et ensuite ensemencée pendant 3 jours sur une matrice 3D résorbable (collagène de types I et III ou acide hyaluronique) avant l'implantation. Le scaffold cellulaire est ensuite fixé dans la lésion avec de la colle de fibrine. Abréviations: TCA, transplantation de chondrocytes autologues; ICAM, implantation de chondrocytes autologues à matrice assistée; CSM, cellules souches mésenchymateuses. (Makris et al., Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage, *Nat. Rev. Rheumatol*, 2015)

## **Chapitre 2. Les cellules souches**

### **2.1 Introduction**

La recherche sur les CS a débuté par EA McCulloch et JE. Till à l'Université de Toronto dans les années 1960 (Becker et al., 1963). Depuis, une richesse croissante de connaissances sur la biologie et les propriétés des CS multipotentes a donné lieu à des attentes toujours plus importantes quant à leurs utilisations cliniques possibles, donnant ainsi un nouvel espoir au développement de nouvelles thérapies cellulaires pour les maladies dégénératives, les traumatismes et les troubles pour lesquels il existe actuellement des options thérapeutiques limitées.

Les CS sont des cellules indifférenciées qui peuvent proliférer et se différencier en cellules spécialisées. De nombreux tissus adultes contiennent des populations de CS, qui ont la capacité de régénération tissulaire après un traumatisme, une maladie ou au cours du vieillissement. Chez les mammifères, il existe trois grands types de CS : les CSE, qui sont isolées à partir de la masse cellulaire interne des blastocytes, les CS fœtales (CSF), qui se trouvent dans le cordon ombilical et le placenta, et les CS adultes (CSA) qui se trouvent dans divers tissus. Dans les organismes adultes, les CS et les cellules progénitrices agissent comme un système de réparation et de reconstitution des tissus adultes.

Les CS peuvent être obtenues à partir du cordon ombilical juste après la naissance. De tous les types de CS, la récolte autologue implique le moins de risques. Cependant, quel que soit l'origine, toutes les CS sont caractérisées comme des cellules capables d'auto-renouvellement et de dériver en lignées cellulaires multiples. Les CS conservent leur potentiel de prolifération et de différenciation en réponse à des signaux biochimiques.

Les CS peuvent être cultivées et transformées artificiellement (différenciées) en types de cellules spécialisées présentant des caractéristiques compatibles avec des cellules de divers tissus tels que les os, le cartilage ou le tissu nerveux.

## 2.2 Propriétés

La définition classique d'une CS exige qu'elle possède deux propriétés:

- (1) **Auto-renouvellement**: la possibilité d'entrer dans de nombreux cycles de division cellulaire en maintenant l'état indifférencié.
- (2) **Puissance**: la capacité de se différencier en différents types de cellules spécialisées.

La puissance signifie le potentiel de différenciation de la CS. Différents niveaux de puissance de CS, cependant, existent en fonction de l'origine des CS (Figure 13).

-**Totipotentes** : Les cellules totipotentes ont la possibilité de développer un organisme entier.

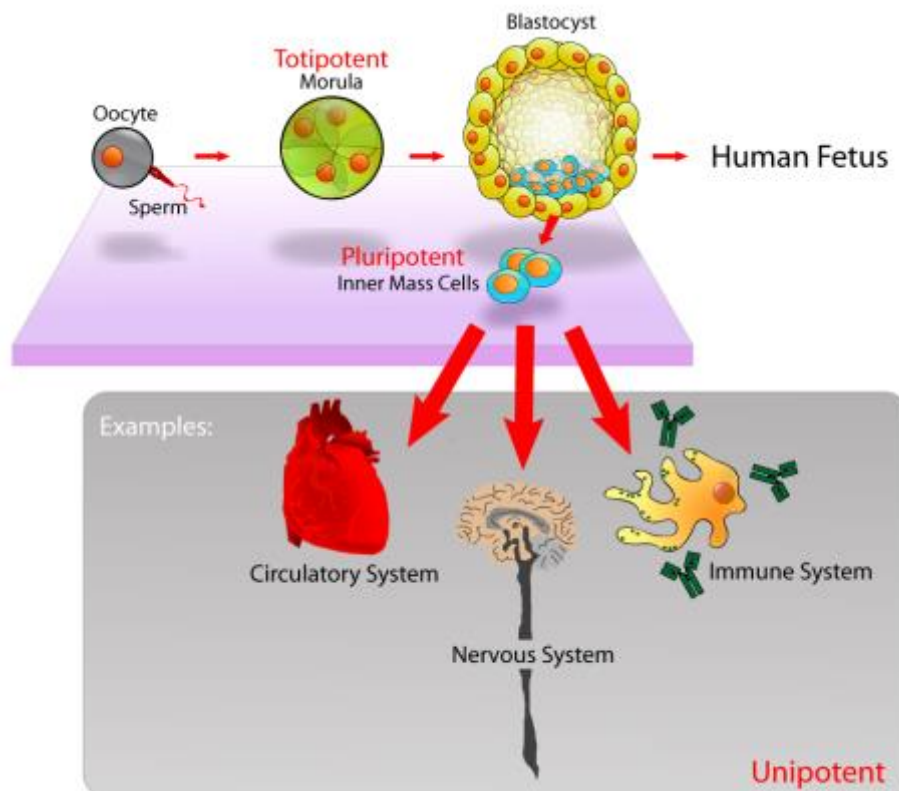


Figure 13 La source des cellules pluripotentes provient des embryons en développement. Travail original de Mike Jones pour Wikipedia, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1351705>



Ces cellules sont produites à partir de la fusion d'un ovocyte avec un spermatozoïde. Les cellules produites dès les premières divisions de l'œuf fécondé sont également totipotentes (Mitalipov and Wolf, 2009).

**-Pluripotentes** : les cellules pluripotentes sont les descendants des cellules totipotentes et ne peuvent se différencier qu'en un des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme) (Ulloa-Montoya et al., 2005). Il est possible de les obtenir notamment à partir de la masse cellulaire interne des blastocystes (CSE) ou par reprogrammation forcée de cellules différenciées (Cellules Souches Pluripotentes Induites, iPS).

**-Multipotentes** : les cellules multipotentes sont capables de se différencier en un nombre limité de cellules ayant la même origine embryonnaire.

**-Unipotentes** : les cellules unipotentes sont capables de produire qu'un seul type de cellules. Elles ont cependant la capacité d'auto-renouvellement, ce qui les distingue des cellules non-souches.

### **2.3 Les cellules souches multipotentes**

Avec la capacité de différencier en plusieurs lignées cellulaires, y compris les cellules de tissu conjonctif, les CSE sont une source potentielle de cellules pour l'ingénierie tissulaire. Cependant, la difficulté de diriger leur différenciation sur un lignage spécifique, leur potentiel de formation de tératomes et les questions juridiques, éthiques et politiques qui leur sont associées ont toutefois entravé le développement de CSE destinées à l'ingénierie tissulaire (Chen et al., 2006).

En raison de leur facilité d'isolement et d'expansion et de leur différenciation multipotentielle, les CS multipotentes sont de plus en plus considérées comme une alternative prometteuse aux chondrocytes différenciés pour une utilisation dans des stratégies de réparation de cartilage cellulaire.

Les CS multipotentes adultes sont présentes dans le corps humain, et participent à la régénération des tissus en fonction des signaux envoyés par l'environnement. Par exemple, les CSM donneront naissance aux futures cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires et adipeuses. Ces cellules ont déjà montré leur réel intérêt en thérapie cellulaire et offrent de belles perspectives quant à leur utilisation en médecine régénératrice.

### **2.3.1 Les cellules souches mésenchymateuses**

A Friedenstein a été le premier à isoler des cellules fibroblastiques avec la capacité de se différencier en ostéocytes du compartiment stromal de la moelle osseuse (Barry and Murphy, 2013). Les CSM sont une population de cellules adhérentes de type fibroblastique, qui présentent un profil d'expression de marqueurs biologiques de surface défini (CD105, CD73 et CD90 dans plus de 95% de la culture) et par contre, un manque d'expression de marqueurs (CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 et HLA classe II dans plus de 95% de la culture) (Horwitz et al., 2005). Bien que les CSM aient d'abord été isolées à partir de la moelle osseuse, les cellules qui portent des caractéristiques de CSM, ont ensuite été produites à partir de différents sites tissulaires, y compris le tissu adipeux (Dragoo et al., 2003; Rodriguez et al., 2005; Zuk et al., 2001), le foie (Campagnoli et al., 2001), la membrane synoviale (De Bari et al., 2001), le muscle adulte (Jankowski et al., 2002), le sang du cordon ombilical (Erices et al., 2000), le périoste (Fukumoto et al., 2003; O'Driscoll et al., 2001) et le sang périphérique (Villaron et al., 2004); plus récemment le tissu placentaire (Parolini et al., 2008), le liquide amniotique (In 't Anker et al., 2003), le sang menstruel (Du et al., 2016; Hida et al., 2008; Meng et al., 2007; Musina et al., 2008), le stroma cornéen (Branch et al., 2012), la pulpe dentaire et la gelée de Wharton du cordon ombilical (Frausin et al., 2015; Kim et al., 2013; Margossian et al., 2012; Reppel et al., 2015; Troyer and Weiss, 2008).

### **2.3.1.1 Tissus source, Isolement and Caractérisation**

#### **2.3.1.1.1 Source Adulte**

Les CSM peuvent être isolées à partir de nombreux tissus mésenchymateux comprenant la moelle osseuse, le périoste, l'os trabéculaire, le tissu adipeux, le muscle, le derme, le sang et la membrane synoviale. Pour chacun d'eux, il a été démontré qu'elles peuvent proliférer dans un stade indifférencié *in vitro* et se différencier en lignées cellulaires et tissus d'origine mésenchymateuse. Des données récentes suggèrent que le potentiel de différenciation des CSM ne se limite pas aux tissus mésenchymateux et que la plasticité doit être étendue à des tissus non mésenchymateux d'origine mésodermale viscérale, neuroectodermique et endodermique (Jiang et al., 2002).

#### **I. Moelle Osseuse**

Les CSM les plus utilisées sont les CSM adultes issues de la moelle osseuse (CSM-MO). Elles se trouvent dans la moelle osseuse des adultes, en particulier dans le bassin, le fémur et le sternum. Les CSM-MO constituent seulement 0,01% de la population de cellules présentes dans la moelle osseuse. Ces CSM peuvent être isolées de la population fractionnée par le choix de marqueurs de surface spécifiques ou par adhérence à des plaques de culture cellulaire en plastique. En utilisant le gradient de densité, il est possible de séparer des CSM des cellules hématopoïétiques et vasculaires. Les CSM purifiées peuvent être amplifiées pendant plus de 30 doublages de population *in vitro* et se multiplier en plus d'un milliard de fois sans perdre leur potentiel de différenciation multipotent. L'ajout du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2) a montré une augmentation du taux de croissance et de la durée de vie des monocouches de CSM-MO chez le lapin, le chien et l'homme, sans perdre leur potentiel de différenciation multipotent (Tsutsumi et al., 2001).

Cependant, cette source cellulaire présente certaines limites. En effet, le prélèvement de moelle osseuse est difficilement accessible (douloureux, invasif pour le patient, risque infectieux non négligeable). De plus, la densité de CSM au sein de l'environnement médullaire est relativement faible. Enfin, les CSM provenant de moelle osseuse d'individus âgés présentent des capacités de prolifération et de différenciation altérées (Li et al., 2014). Par conséquent, il est devenu nécessaire, ces dernières années, pour les scientifiques et les cliniciens, d'identifier d'autres sources de CSM.

## **II. Tissus Adipeux**

Les tissus adipeux sont l'une des sources les plus riches de CSM. Il y a plus de 500 fois plus de CS dans 1 gramme de graisse que dans 1 gramme de moelle osseuse aspirée. Il a été montré que des cellules progénitrices mésenchymateuses multipotentes peuvent être obtenues à partir du tissu adipeux par lipectomie assistée par succion (Zuk et al., 2001). Ces cellules peuvent être maintenues *in vitro* pendant des périodes prolongées avec un doublement stable de la population et de faibles niveaux de sénescence. En chirurgie orthopédique, on peut obtenir des cultures primaires de CSM tissulaires adipeuses à partir du coussinet gras de l'articulation du genou (tissu de Hoffa), qui peut être récolté de façon routinière pendant l'arthroplastie totale du genou. Les cellules souches adipeuses sont activement recherchées dans les essais cliniques pour le traitement d'une variété de maladies.

Récemment, un programme de recherche européen ADIPOA (Adipose derived stromal cells for osteoarthritis) s'attellent à valider un nouveau concept de traitement basé sur la thérapie cellulaire : des CS graisseuses sont injectées au niveau de l'articulation malade pour aller activer la "régénérescence" du cartilage (Figure 14). Les essais chez les patients humains ont démarré en avril 2012. Les études *in vitro* et une phase d'essais précliniques (Desando et al., 2013; Schelbergen et al., 2014) donnant des résultats très encourageants.

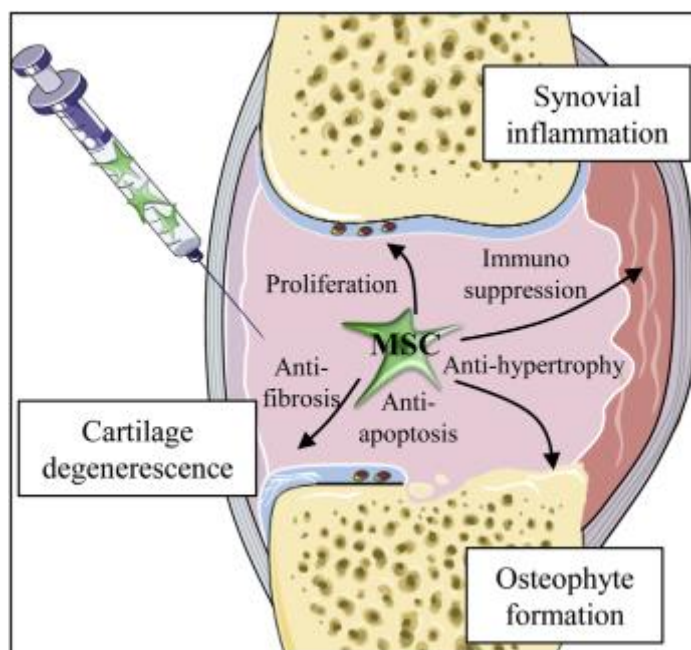


Figure 14 Représentation schématique d'une thérapie basée sur l'injection intra-articulaire des CSM d'origine adipeuse (Maumus et al, Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases : Role of secretome and exosomes, *Biochimie*, 2013).

### 2.3.1.1.2 Source fœtale

Les CSM d'origine fœtale présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux CSM adultes. Plusieurs études ont décrit une réduction du nombre de cellules progénitrices isolées de la moelle osseuse humaine dépendante de l'âge, bien que d'autres n'aient pu trouver une telle relation inverse entre l'âge et le nombre de CSM. De plus, plusieurs chercheurs ont signalé une diminution de la capacité de différenciation des CSM en fonction de leur âge (Li et al., 2014; Nöth et al., 2008). Mais pour les CSM fœtales, leur prélèvement est simple, sans geste invasif, sûr et indolore pour la mère et l'enfant. Les CSM sont relativement faciles à isoler et possèdent un fort pouvoir d'expansion *in vitro*, permettant ainsi d'obtenir des lots de cellules en quantité suffisante pour de potentielles utilisations thérapeutiques.

Les CSM les plus jeunes et les plus primitives peuvent être obtenues à partir du tissu du cordon ombilical, à savoir la gelée de Wharton (CSM-GW) et le sang du cordon ombilical.

Cependant les CSM se trouvent dans une concentration beaucoup plus élevée dans la gelée de Wharton comparé au sang du cordon, qui est une source riche de CS hématopoïétiques. Le cordon ombilical est facilement obtenu après la naissance. Les CSM issues du cordon ont des propriétés plus primitives que les autres CSM adultes obtenues plus tard dans la vie, ce qui pourrait en faire une source utile de CSM pour des applications cliniques.

En outre, 1/100<sup>ème</sup> des cellules recueillies au cours de l'amniocentèse est de type CSM.

### **2.3.1.1.3 Effets immunomodulateurs**

De nombreuses études ont démontré que les CSM humaines interfèrent avec les cellules dendritiques et la fonction des cellules T et génèrent un microenvironnement immunosuppresseur local en sécrétant des cytokines (Ryan et al., 2005). Il a également été montré que la fonction immunomodulatrice des CSM humaines est améliorée lorsque les cellules sont exposées à un environnement inflammatoire caractérisé par la présence de niveaux locaux élevés d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui est produit en réponse à la présence d'une double hélice d'ADN étranger, induit la production de protéine de la fonction immunitaire, renforce la réponse immunitaire en inhibant la réplication virale dans les cellules de l'hôte, en activant des cellules NK et les macrophages et améliorent la résistance des cellules de l'hôte aux infections virales (Ryan et al., 2007). D'autres études contredisent certains de ces résultats, reflétant à la fois la nature hautement hétérogène des isolats CSM et les différences considérables entre les isolats générés par les nombreuses méthodes différentes au cours de développement (Phinney and Prockop, 2007).

## **2.3.1.2 Potentiel des CSM dans l'ingénierie du cartilage et des tissus**

### **osseux**

### **2.3.1.2.1 Sources de CSM pour l'ingénierie du cartilage et des tissus**

#### **osseux**

Depuis leur premier isolement en 1970 à partir d'aspirations de moelle osseuse de cobaye (Friedenstein et al., 1970), des CSM ont été trouvées dans presque tous les tissus postnatals (Tableau 2). Ces cellules peuvent participer à la régénération tissulaire *via* une différenciation ou une fonction de sauvetage paracrine *in vivo*. Cependant, les cellules isolées représentent habituellement une population cellulaire hétérogène (Majore et al., 2009). Les CSM de différentes sources peuvent être développés avec succès *in vitro* et des protocoles de culture optimale ont été développés pour différents types de CSM (Hatlapatka et al., 2011).

Tableau 2 Sources de CSM et leurs capacités de différenciation

Tissu	Potentiel différentiel	Référence
Moelle osseuse	Adipogène, chondrogène, ostéogénique, myogénique, neuronal	(Tuan et al., 2003)
Tissu adipeux	Adipogène, chondrogène, ostéogénique, myogénique	(Baglioni et al., 2009; Tuan et al., 2003)
Cartilage	Adipogène, chondrogène, ostéogénique	(Alsalameh et al., 2004)
Derme	Adipogène, chondrogène, ostéogénique, myogénique	(Tuan et al., 2003)
Pâte dentaire	Adipogène, chondrogène, ostéogénique, myogénique, neuronal	(Huang et al., 2009)
Lait maternel	Adipogène, chondrogène, ostéogénique	(Patki et al., 2010)
Sang	Adipogène, ostéogénique, ostéoclastique, fibroblastique	(Tuan et al., 2003; Zvaifler et al., 2000)
Sang du cordon ombilical	Adipogène, chondrogène, ostéogénique, neuronal, épithélial, hépatogène, myogénique	(Berger et al., 2006; Gang et al., 2004; Jazedje et al., 2009; Tang et al., 2006)
Urine	Urothélial, myogénique	(Zhang et al., 2008)
Gelée de Wharton	Adipogène, chondrogène, ostéogénique, myogène, neuronal, endothélial, hépatogène, pancréatique	(Flynn et al., 2007; Majore et al., 2011; Moretti et al., 2010; Troyer and Weiss, 2008; Weiss et al., 2006; Weiss and Troyer, 2006; Witkowska-Zimny and Wrobel, 2011)
Placenta / chorion	Chondrogenic, osteogenic, myogenic, neuronal	(Witkowska-Zimny and Wrobel, 2011)
Placenta / amnios	Adipogène, chondrogène, ostéogénique, myogénique, endothélial	(Witkowska-Zimny and Wrobel, 2011)



### 2.3.1.2.2 Capacité de différenciation

Les CSM sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement intrinsèque et son potentiel de la différenciation multipotente. Les CSM peuvent se différencier en chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes (Figure 15), ils ont également été signalées pouvant se différencier en myocytes et cardiomyocytes et même en cellules d'origine non mesodermique, y compris les hépatocytes et les neurones (Jiang et al., 2002).

Bien que les CSM isolées de différents tissus présentent des caractéristiques phénotypiques similaires, cependant, elles montrent des différences dans les potentiels de prolifération et de différenciation en réponse à la stimulation avec divers facteurs de croissance. Une étude qui a comparé les CSM humaines dérivées de la moelle osseuse, du périoste, de la synoviale, du muscle squelettique et du tissu adipeux a révélé que les CSM dérivées de la synoviale présentaient la capacité de chondrogénèse plus importante, suivies des CSM dérivées de la moelle osseuse et du périoste (Sakaguchi et al., 2005).

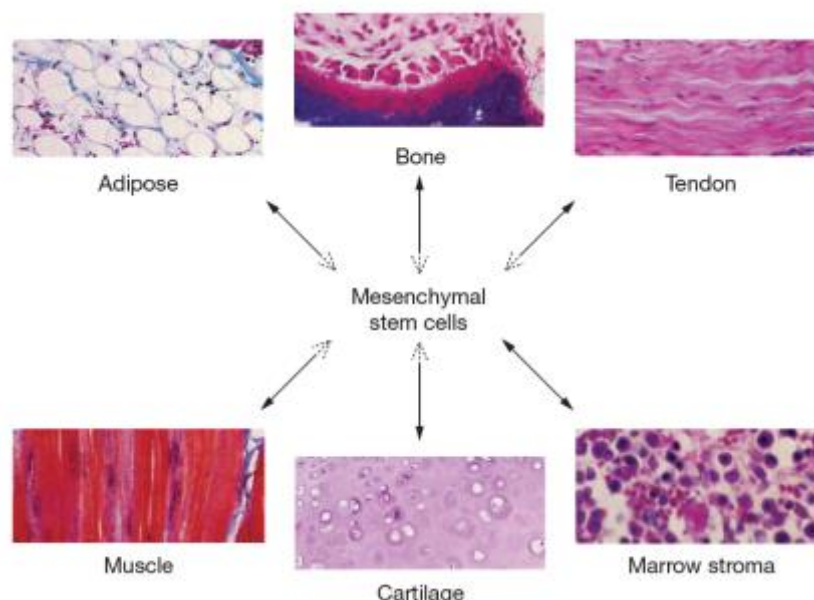


Figure 15 Le potentiel de différenciation des CSM. Dans des conditions appropriées, les CSM sont capables de se différencier en types cellulaires de lignées multiples, y compris l'os, le cartilage, le tissu adipeux, le muscle, le tendon et le stroma (Chen et al., Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering, *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 2006)

Ces différences pourraient être la conséquence d'au moins deux facteurs. Le premier facteur est probablement de type expérimental selon les méthodes d'isolement, le type de culture, le milieu et la densité d'ensemencement ainsi que le traitement avec divers facteurs de croissance qui influencent l'expansion et la différenciation et les propriétés immunogènes des CSM (Sotiropoulou et al., 2006). Le deuxième facteur est plutôt intrinsèque, l'âge et le sexe du donneur et le stade de la maladie peuvent également influencer sur le rendement des CSM, le taux de prolifération et le potentiel de différenciation (Fafián-Labora et al., 2015; Payne et al., 2010). Certaines études ont montré que l'âge, la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose sévère ont des effets néfastes sur les CSM-MO des patients, avec une capacité proliférative et une activité chondrogénique significativement réduites par rapport à celles de jeunes donneurs sains (Chen and Tuan, 2008).

### **2.3.1.2.3 Différenciation chondrogénique des CSM**

La chondrogénèse des CSM est un processus complexe et est un domaine de recherche actif. Le protocole standard pour la chondrogénèse a d'abord été établi pour les CSM-MO (Mackay et al., 1998; Yoo et al., 1998). La dexaméthasone est un glucocorticoïde synthétique qui s'est avéré induire la différenciation des CSM vers des lignées chondrogéniques (en fonction de la concentration appliquée) en combinaison avec d'autres facteurs. Bien que le mécanisme exact de la différenciation induite par la dexaméthasone ne soit pas clair, il a été montré qu'elle augmente la sensibilité des cellules progénitrices à d'autres réactifs de différenciation mais qu'elle ne définit pas la lignée cellulaire. A forte concentration au contraire, la dexaméthasone provoque une apoptose des populations cellulaires avec une faible capacité de différenciation (Oshina et al., 2007). Un autre additif important de milieu de culture chondrogénique est l'acide ascorbique, qui a une fonction anti-oxydante, et qui est également un co-facteur essentiel pour la prolyl lysyl hydrolase, une enzyme clé de la

biosynthèse du collagène (Alcaín and Burón, 1994).

De plus, la présence du TGF- $\beta$  et de la proline est essentielle pour la différenciation chondrogénique. L'addition des membres de la superfamille de TGF- $\beta$  a été démontrée pour être une condition-clé pour la chondrogenèse des CSM (Bian et al., 2011). Le TGF- $\beta$  induit la différenciation chondrogénique des CSM *via* différentes voies de signalisation, y compris celle de Smad (Hellingman et al., 2011).

Le modèle expérimental standard consiste en une culture 3D de CSM, sous forme de culots de cellules à haute densité ou de culture de micromasse ou dans une matrice 3D, sous la stimulation de facteurs chondrogéniques. L'utilisation de la culture de culots cellulaires conduit à une densité cellulaire spatiale élevée et nécessite un contact cellule-cellule, similaire au processus de condensation cellulaire pendant le développement des membres. L'utilisation d'alginate a pour résultat une morphologie de cellules arrondies, semblable à celle observée dans le cartilage articulaire, qui s'est également avérée être un facteur important dans le processus de la chondrogenèse. L'utilisation d'une culture de culot cellulaire imite le développement du cartilage lors de la formation des membres et est donc souvent utilisée comme une méthode pour comprendre comment l'interaction des cellules, des facteurs de croissance et des facteurs environnementaux favorise un phénotype chondrogénique. Bien que l'alginate puisse également être utilisé à cet effet, l'utilisation d'alginate et d'autres hydrogels peut avoir des influences profondes sur les phénotypes cellulaires qui en résultent. Par conséquent, l'effet des biomatériaux comme variable significative influençant le potentiel de différenciation des cellules doit être pris en compte au moment de choisir un système de culture approprié (Estes et al., 2010).

Des éléments incluant des activations de diverses voies de signalisation intracellulaire (protéine kinases activées par des mitogènes et Smads) et des facteurs de transcription (Sox9, L-Sox5 et L-Sox6), la production et l'interaction avec des protéines de la MEC (Col II,

agrécan, et les protéines de la matrice oligomère du cartilage COMP), des activités de facteurs bioactifs solubles tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et des hormones et des effets de facteurs environnementaux tels que la charge mécanique et la tension d'oxygène affectent tous la différenciation chondrogénique des CSM (Chen and Tuan, 2008). Une des molécules les plus importantes est le facteur de transcription Sox9. Dans les CSM-MO, l'expression du SOX9 exogène a conduit à un dépôt accru de PGs (Tsuchiya et al., 2003).

L'expression des gènes assurant la différenciation des composants de la matrice lors de la chondrogénèse des CSM est l'un des problèmes les plus importants pour la réparation du cartilage articulaire à base de CSM. Le processus de différenciation chondrogénique *in vitro* a été établi dans le système de culot cellulaire dans un milieu de différenciation sans sérum et chimiquement défini contenant de l'ascorbate, de la dexaméthasone, du pyruvate de sodium, de la proline, du ITS-plus (contenant de l'insuline recombinante humaine, de la transferrine humaine, de l'acide sélénique, de la BSA et de l'acide linoléique) et du TGF- $\beta$ -1, -2 ou -3. Dans ces conditions, les culots de CSM développent un phénotype cartilagineux caractérisé par l'expression génique et la synthèse du collagène de type II (Col II), IX (Col IX), X (Col X), XI (Col XI), agrécane, le biglycan, la décorine, le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératane.

Des analyses d'expression génétique séquentielle plus détaillées menant du CSM indifférencié à un chondrocyte mature ont été effectuées pour les CSM-MO (Barry et al., 2001). Les auteurs ont défini 3 étapes distinctes dans le processus de différenciation sur une période de 3 semaines. À un stade précoce (jours 1 à 6), les cellules différenciées ont commencé à exprimer la fibromoduline et la COMP. Une augmentation de l'agrécan, de la protéine de core du versican et des petits PGs riches en leucine (decorin et biglycan) se produit dans un stade intermédiaire (jours 6 à 8). Suit l'apparition de Col II et de

chondroadhérine lors d'une étape plus tardive (jours 8 à 21). Col X, qui est un marqueur du cartilage hypertrophique, est également détecté au cours de ce processus de différenciation. En outre, il a été montré qu'il y a moins de production de GAG et de Col II dans des culots traités par TGF- $\beta$ 1, par rapport aux culots traités par TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, ce qui suggère que TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 sont plus efficaces que TGF- $\beta$ 1 (Barry et al., 2001). Les BMP, connues pour leur implication dans la formation du cartilage, agissent seules ou avec d'autres facteurs de croissance pour induire ou améliorer la différenciation chondrogénique de CSM. Par exemple, la BMP-2, la BMP-4 ou la BMP-6, combinées au TGF- $\beta$ 3, induisent le phénotype chondrogénique dans des culots de CSM-MO, la BMP-2 semblant être la plus efficace (Sekiya et al., 2005).

Pour les CSM dérivées du tissu adipeux, en raison de leur manque d'expression du récepteur de type I de TGF- $\beta$  et de l'expression réduite de BMP-2, de BMP-4 et de BMP-6 par rapport aux CSM-MO, la supplémentation en BMP-6 et TGF- $\beta$  semble être optimale pour leur différenciation chondrogénique, la BMP-6 stimulant une différenciation chondrogénique plus forte par rapport au TGF- $\beta$  (Hennig et al., 2007). De plus, les CSM dérivés du tissu adipeux expriment des gènes et des protéines spécifiques du cartilage, y compris le Col II et l'agrécan, mais pas les marqueurs de chondrocytes hypertrophiques tels que Col X (Estes et al., 2006, 2010; Guilak et al., 2010).

CSM-MO montrent une capacité de différenciation chondrogénique indépendante de l'âge et l'étiologie d'arthrose du donneur (Scharstuhl et al., 2007). Payne et al. ont signalé un déclin associé à l'âge dans la différenciation chondrogénique par la stimulation du TGF- $\beta$ 1 chez les hommes, mais pas chez les femmes (Payne et al., 2010). En comparaison avec les CSM-MO, les CSM du cordon ombilical ont un potentiel chondrogénique plus élevé. Lors de l'ensemencement sur des matrices 3D à base d'acide polyglycolique, les CSM-GW ont produit trois fois plus de collagène que les CSM-MO (Wang et al., 2009). Dans la culture en culots,

les CSM du cordon ombilical ont une capacité de différenciation comparable à celle des CSM-MO en termes de niveau de GAG et d'intensité de coloration bleu alcian, malgré une plus grande taille de culots que ceux obtenus avec les CSM-MO (Baksh et al., 2007). De plus, dans le cas des CSM du cordon ombilical, le problème de la dépendance de l'âge du donneur peut être négligé puisque tous les tissus du cordon sont obtenus à partir des mêmes gestes de grossesse à terme.

La chondrogénèse de CSM *in vitro* induite par TGF- $\beta$  implique l'expression rapide de gènes spécifiques de cartilage et la déposition de la MEC spécifique de cartilage. Ce processus est parallèle avec le processus de chondrogénèse après la condensation mésenchymateuse au cours du développement foetal (décrit en Chapitre 1), comme l'expression de la chondroadhérine et du Col II (Sandberg and Vuorio, 1987; Shen et al., 1998). Cependant, les CSM qui ont subi une différenciation chondrogénique présentent une formation de MEC du cartilage plus faible avec des propriétés mécaniques différentes (augmentation de la rigidité), par rapport aux chondrocytes (Mauck et al., 2006). Ces résultats suggèrent qu'une optimisation supplémentaire est nécessaire pour l'utilisation des CSM pour l'ingénierie des tissus cartilagineux.

L'autre défi dans le contrôle de la chondrogénèse de CSM est la différenciation hypertrophique des CSM subissant une différenciation chondrogénique. La maturation hypertrophique des CSM est caractérisée par l'expression du Col X, de la MMP-13 et de l'activité phosphatase alcaline (ALP) qui se trouvent normalement dans le cartilage de la plaque de croissance mais pas dans le cartilage articulaire sain. L'expression du Col X peut être détectée au début de la chondrogénèse des CSM (Chen and Tuan, 2008), donc les études *in vitro* plus détaillées sont nécessaires pour comprendre les voies et définir les événements au cours de la chondrogénèse menant des CSM indifférenciées aux chondrocytes matures. Elles sont essentielles pour développer avec succès des stratégies à base de CSM pour la réparation

du cartilage articulaire.

En conclusion, une attention particulière a été consacrée aux CSM en raison de leur relative facilité d'isolement, de leur capacité d'expansion en culture, de leur multipotence, de leur absence ou de leurs propriétés immunomodulatrices et de leur aptitude à se loger dans des sites d'inflammation ou lésion tissulaire (Meirelles et al., 2009; Nauta and Fibbe, 2007). En effet, toutes ces caractéristiques appuient la notion que les CSM pourraient être des candidats précieux pour la transplantation *in vivo* et les approches de thérapie cellulaire.

#### **2.3.1.2.4 Thérapie basée sur les CSM**

Les applications initiales pour lesquelles les CSM ont été utilisées en thérapie sont basées sur leur absence ou faible immunogénicité et leurs fonctions immunorégulatrices, ainsi que sur leur capacité de différenciation multipotente. En effet, d'une part, un avantage majeur de l'utilisation de CSM humaines pour des thérapies *in vivo* est le fait que ces cellules sont considérées comme "immunoprivilegiées", en raison de leur faible taux d'expression du complexe d'histocompatibilité majeur (MHC) de l'antigène leucocytaire humain (HLA) Classe I et leur expression négative de molécules majeures de MHC II et co-stimulatrices telles que CD40, CD80 et CD86 (Nauta and Fibbe, 2007). En outre, plusieurs preuves montrent également que les CSM peuvent jouer des rôles spécifiques dans l'immunomodulation, en interagissant avec les composants cellulaires du système immunitaire et en induisant un changement de la production de cytokines pro-anti-inflammatoires (Nauta and Fibbe, 2007).

D'autre part, le fait que les CSM ont été montrées capables de se différencier en plusieurs types cellulaires *in vitro* suggère que ces cellules pourraient également être utiles dans un contexte clinique pour la régénération tissulaire, avec des tissus d'ingénierie et de régénération (Caplan, 2007). Sur la base de ces caractéristiques *in vitro*, de nombreuses tentatives ont été faites pour exploiter les capacités de différenciation des CSM *in vivo* pour développer des

approches pour le traitement des troubles affectant les tissus squelettiques et les tissus conjonctifs associés (cartilage, tendon, et le ligament) (Arthur et al., 2009; Chang et al., 2008).

Des études préliminaires menées sur des modèles animaux, suivies d'études précliniques et d'essais cliniques chez l'homme, ont fourni plusieurs preuves permettant d'étayer la faisabilité d'utiliser les CSM sans aboutir à l'initiation d'une réponse immunologique (Arthur et al., 2009). Cette stratégie est centrée principalement sur la capacité des CSM à se différencier et à se transformer en cellules du tissu lésé spécifique à restaurer (approche régénérative), processus qui est induit soit par transplantation des cellules seules ou en combinaison avec des matrices (synthétiques ou naturelles et biodégradables), qui fournissent un soutien mécanique et structurel, ou des facteurs exogènes (facteurs de croissance, cytokines solubles, facteurs chondrogéniques ou ostéogéniques), qui améliorent la différenciation des CSM vers les cellules du tissu requis (Arthur et al., 2009; Zhou et al., 2006). Par exemple, des résultats satisfaisants ont été obtenus chez les patients pour le traitement des défauts osseux tels que les pseudarthrose de l'os long (Quarto et al., 2001) et les grands défauts de la diaphyse osseuse (Marcacci et al., 2007; Stanovici et al., 2016). Une approche similaire a également été appliquée avec succès chez l'homme pour le traitement des fractures vertébrales/des lésions vertébrales (Gan et al., 2008). Une thérapie à base de CSM a également été suggérée pour le traitement des lésions cartilagineuses. En effet, de nombreuses études chez les modèles animaux et chez l'homme ont rapporté que la transplantation de CSM en combinaison avec des matrice entraîne une nouvelle formation de cartilage (Kuroda et al., 2007). Une exigence cruciale pour la thérapie de l'arthrose basée sur CSM est la livraison des cellules au site du défaut. Une injection intra-articulaire directe pourrait être possible dans les phases débutantes de la maladie lorsque le défaut est restreint à la couche de cartilage, alors qu'une matrice d'un certain type serait nécessaire pour maintenir les CSM dans les cas où l'os sous-chondral est exposé sur de grandes zones (Nöth et al., 2008) (Figure 16).



Même si ces résultats appuient la notion que les effets bénéfiques observés sont probablement dus à la différenciation des CSM dans les types de cellules nécessaires à la régénération tissulaire, ils laissent encore ouverte la possibilité que la différenciation n'est pas le seul mécanisme conjoint aux effets observés parce que les CSM jouent également un rôle dans la régénération tissulaire soit localement soit sur de grandes distances par la sécrétion de facteurs trophiques. Ces médiateurs solubles peuvent agir directement, déclenchant des mécanismes intracellulaires de cellules blessées, ou indirectement, induisant la sécrétion de médiateurs fonctionnellement actifs par des cellules voisines. Certaines études ont montré que le mécanisme prédominant par lequel les CSM participent à la réparation tissulaire est par une activité paracrine. Grâce à la production d'une multitude de facteurs trophiques aux propriétés diverses, les CSM peuvent réduire les lésions tissulaires, protéger les tissus contre une dégradation supplémentaire et/ou améliorer la réparation des tissus (Maumus et al., 2013). Par exemple, bien que la thérapie à base de CSM pour la régénération du cartilage ait été conçue pour la première fois en fonction de la capacité de ces cellules à se différencier par rapport à la lignée chondrogénique, dans certains cas, des doutes ont été soulevés concernant l'origine du cartilage nouvellement formé (Arthur et al., 2009; Kuroda et al., 2007) ainsi que les mécanismes impliqués (Arthur et al., 2009). En effet, il reste à démontrer si le nouveau tissu cartilagineux provient directement de la différenciation des CSM transplantées, ce qui représente une action régénérative de ces cellules, ou de la capacité des cellules transplantées, par des mécanismes paracrines, à inhiber l'inflammation ou stimuler la croissance et/ou l'activité des progéniteurs endogènes et des chondrocytes, et donc agissant par l'intermédiaire d'un mécanisme de réparation. Par exemple, dans le cas de maladies telles que l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde, qui sont des maladies articulaires dégénératives associées à une inflammation progressive et souvent sévère, il semble que les effets bénéfiques des CSM soient principalement attribuables à l'induction des cellules progénitrices endogènes et de

leurs activités anti-inflammatoires et immunosuppressives (Chen and Tuan, 2008).

On pense que le potentiel de la différenciation chondrogénique des CSM a une implication clinique énorme et pourrait jouer un rôle clé dans la future thérapie cellulaire des défauts du cartilage articulaire. Mais les effets régénératifs des CSM peuvent être limités parce qu'ils varient en fonction des habitudes personnelles et des choix de style de vie, ce qui peut affecter l'efficacité de cette procédure. Par exemple, des concentrations élevées de produits chimiques dans le sang des fumeurs pourraient rendre les CSM transplantés inefficaces et l'exposition environnementale à la nicotine a été reconnue comme un facteur de risque, ce qui ne devrait pas être ignoré (Ruiz et al., 2012).

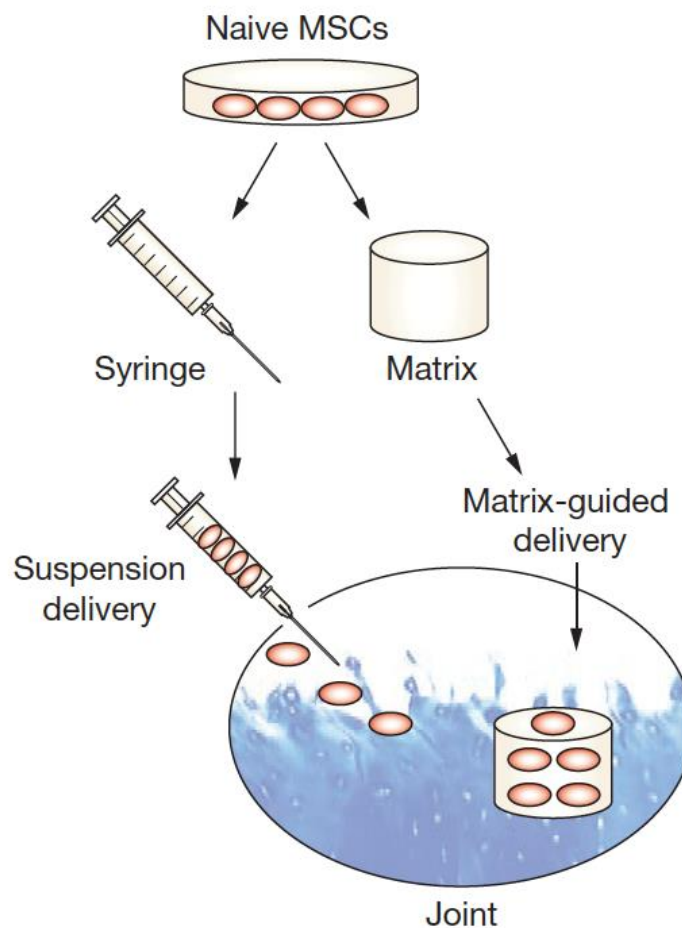


Figure 16 Livraison des CSM au cartilage malade chez les patients souffrant d'arthrose. Injection intra-articulaire directe de CSM naïves et l'application de CSM naïves guidées par matrice (Nöth et al., Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy, *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008).

## Chapitre 3. Le tabagisme et Les récepteurs nicotiniques

### 3.1 Introduction

Avec plus de 1,3 milliard de fumeurs, le tabagisme est l'habitude de vie la plus courante dans le monde (Wipfli and Samet, 2009). Selon des études épidémiologiques, le tabagisme a rapidement gagné en popularité parmi les pays développés à partir du début des années 1900. L'exposition aux toxines présentes dans la fumée de cigarette peut se produire soit de façon directe ou indirecte (Ejaz and Lim, 2006). "De façon directe, la fumée est inhalée au cours de chaque aspiration. En fonction du volume de fumée inhalée, un fumeur peut modifier la quantité de toxine ingérée ainsi que la composition chimique de cette fumée "directe". Par contre, la fumée "indirecte" provient de l'extrémité allumée de la cigarette et est libérée dans l'air ambiant. En conséquence, les fumeurs et les personnes dans le voisinage sont indirectement exposés à des substances toxiques, une action communément appelée tabagisme passif. Ces toxiques libérés, sont présents dans une phase volatile ou associées à des particules. La phase volatile, qui représente plus de 90% de la fumée de cigarette, est composée de plus de 500 gaz, y compris l'azote, l'oxygène, le monoxyde de carbone, dioxyde de carbone, la vapeur d'eau, l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène (Hoffmann et al., 2001). La phase particulaire, d'autre part, est composée de plus de 3 500 produits chimiques, qui comprennent les alcaloïdes, l'anatabine, anabasine, et la nicotine (Sloan et al., 2010). Les risques potentiels de tous ces produits chimiques ont été largement évalués et près de 69 cancérogènes ont été identifiés dans la fumée de cigarette (Hoffmann et al., 2001). L'exposition à ces combinaisons chimiques est préjudiciable pour la santé, par conséquent, il est impératif que les fumeurs soient informés des effets indésirables, des complications et des maladies associées au tabagisme.

L'exposition à ces substances toxiques est responsable en particulier d'une augmentation du risque de maladies cardio-vasculaires et pulmonaires, et les fumeurs sont sensibles à une incidence plus élevée d'athérosclérose, d'infections microbiologiques et de cancers (Sopori, 2002).

### **3.2 La Nicotine**

La nicotine, un composé organique trouvé dans toutes les feuilles de tabac, est le composé responsable du phénomène de dépendance (Benowitz et al., 2009). En moyenne, chaque cigarette contient 10 à 14 mg de nicotine. Les niveaux de consommation de nicotine peuvent varier en modulant la fréquence et les volumes d'aspiration. Cependant, environ 1 mg de nicotine est effectivement absorbé par voie systémique. La nicotine est absorbée plus facilement dans des conditions de pH basiques, par rapport à des conditions acides. La condition basique et une grande surface du poumon, par conséquent, fournit une condition optimale pour l'absorption de la nicotine après inhalation. Une fois dans la circulation sanguine, la nicotine est rapidement exposée à tous les organes. La moyenne concentration sanguine de nicotine chez les fumeurs chroniques est atteinte  $19.0 \pm 11.3$  ng/ml après la première cigarette et  $22.9 \pm 11.2$  ng/ml après la seconde cigarette (Herning et al., 1983), ce qui correspond à une concentration de  $0,117 \pm 0,070$   $\mu$ M et  $0,141 \pm 0,069$   $\mu$ M, respectivement.

Les effets de l'exposition à la nicotine sont très dépendants de la dose de nicotine administrée (Gullihorn et al., 2005). En conséquence, il a été montré des effets positifs et négatifs de la nicotine. Les traitements à la nicotine ont montré une amélioration des maladies telles que la colite ulcéreuse (Wu and Cho, 2004), la maladie d'Alzheimer (Chan et al., 2008) et de Parkinson (Takeuchi et al., 2009). Au contraire, le tabagisme est quand même connu pour avoir des effets négatifs sur la réparation des tissus (Sopori, 2002). La métabolisation des substances toxiques de la fumée de cigarette est soupçonnée de retarder la cicatrisation

des plaies (Sopori, 2002), en altérant la migration des cellules critiques pour le processus de guérison (Wong and Martins-Green, 2004). La consolidation osseuse peut être retardée par la cigarette (Ding et al., 2008; Krannitz et al., 2009). Fumer entraîne une plus grande perte de cartilage associée à des douleurs sévères chez les patients arthrosiques par rapport avec les patients non-fumeurs (Miranda et al., 2002). De plus, la durée de séjours hospitaliers lors de la pose de prothèses articulaires est significativement plus longue chez les patients arthrosiques fumeurs, ainsi que le succès des interventions de type débridement arthroscopique de l'articulation (Lavernia et al., 1999; Porter and Hanley, 2001).

### 3.2.1 La Nicotine dans les produits du tabac

La Nicotine est un ingrédient naturel agissant comme un insecticide botanique dans les feuilles de tabac. Il est l'alcaloïde principal du tabac, correspondant à raison d'environ 1,5% en poids dans le tabac de cigarettes du commerce et comprenant environ 95% de la quantité totale d'alcaloïdes. La nicotine dans le tabac est en grande partie lévogyre(*S*)-isomère, seulement 0,1-0,6% est (*R*)-nicotine (Figure 17).

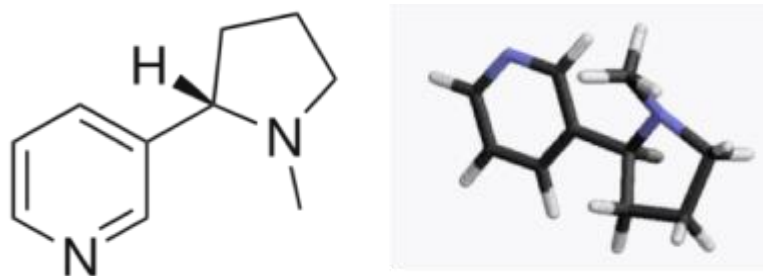


Figure 17 La structure de la nicotine. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Nicotine>

### 3.2.2 Métabolisme de la nicotine

L'inhalation est donc nécessaire pour permettre à la nicotine d'être absorbée par la surface de l'épithélium alvéolaire. Dans les poumons, la nicotine est rapidement absorbée par

la circulation systémique. Cette absorption est facilitée car le flux sanguin des capillaires pulmonaires est élevé, représentant le passage de la totalité du volume sanguin chaque minute. La nicotémie augmente ainsi rapidement lors de la consommation d'une cigarette. Après l'absorption, la nicotine pénètre dans la circulation sanguine où, pH 7.4, elle est à 69% ionisée et 31% sont non-ionisées (Benowitz et al., 1982). Les taux de nicotine sont de six à dix fois plus élevés dans le plasma artériel que dans le plasma veineux (Le Houezec, 2003). Sur la base des échantillons d'autopsie des fumeurs, la plus forte affinité pour la nicotine est dans le foie, les reins, la rate et les poumons, la plus basse dans les tissus adipeux.

La nicotine est métabolisée principalement par le foie. Le plus important métabolite de la nicotine chez la plupart des espèces de mammifères est la cotinine. Chez l'homme, environ 70 à 80% de la nicotine sont métabolisés en cotinine. Cette transformation comporte deux étapes. La première est médiée principalement par le CYP2A6, la seconde étape est catalysée par un aldéhyde oxydase cytoplasmique (Benowitz et al., 2009). Il existe une variabilité interindividuelle considérable du taux d'élimination de la nicotine et cotinine chez les personnes (Swan et al., 2005). La grossesse a un effet significatif sur la clairance de la nicotine et surtout de la cotinine. La clairance est augmentée 60 et 140% pour la nicotine et la cotinine, respectivement, par rapport à la grossesse post-partum (Dempsey et al., 2002). Le taux de clairance de la nicotine est principalement contrôlé par le flux sanguin hépatique, alors que le taux de clairance de la cotinine est principalement déterminé par l'activité des enzymes métabolisant dans le foie. La constatation que la clairance de la cotinine pendant la grossesse est augmentée plus que la clairance de la nicotine indique que l'augmentation de la clairance est plus probablement provoquée par l'induction de CYP2A6 et non pas par une augmentation du débit sanguin hépatique.

Ainsi, la nicotine s'accumule nettement dans le suc gastrique et de la salive (Lindell et al., 1996) et aussi dans le lait maternel (Dahlström et al., 1990). La nicotine traverse facilement la

barrière placentaire, et il existe des preuves de l'accumulation de la nicotine dans le sérum fœtal et le liquide amniotique avec concentrations légèrement plus élevées que dans le sérum maternel (Dempsey and Benowitz, 2001).

### **3.2.3 Action sur les récepteurs nicotiques**

La nicotine est un agoniste de certains récepteurs à l'acétylcholine. Il existe deux types de récepteurs de l'acétylcholine : les récepteurs nicotiques sur lesquels la nicotine peut se fixer et les récepteurs muscariniques qui peuvent être activés par la muscarine.

#### **3.2.3.1. Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs)**

Les nAChRs appartiennent à la famille des récepteurs cholinergiques et sont une classe de canaux ioniques ligand-dépendants qui répondent à l'acétylcholine ainsi que d'autres ligands tels que la choline et la nicotine. Les nAChRs sont constitués de 5 sous-unités transmembranaires qui sont disposées ensemble pour former un pore transmembranaire (Figure 18). Ces récepteurs pentamères sont créés à partir de diverses combinaisons de 16 différentes sous-unités de nAChRs. Toutes les sous-unités partagent la même structure moléculaire: un domaine extracellulaire, quatre sous-unités transmembranaires (TM1-TM4), et un domaine cytoplasmique; cependant, chaque sous-unité a différentes séquences d'acides aminés (Albuquerque et al., 2009). Par conséquent, les sous-unités sont classées comme  $\alpha$  ou non  $\alpha$  sur la base de la présence d'un résidu cystéine-cystéine du domaine N-terminal près de l'entrée TM1 (Albuquerque et al., 2009). La paire Cys-Cys ne se trouve que sur les sous-unités  $\alpha$  et est nécessaire pour la liaison agoniste. En total, il y a 9 sous-unités  $\alpha$ :  $\alpha$ 1-7,  $\alpha$ 9,  $\alpha$ 10, ( $\alpha$ 8 est identifié chez les oiseaux, mais n'a pas été observé chez les mammifères) et 7 non- $\alpha$

sous-unités:  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  (Albuquerque et al., 2009; M. Carballosa et al., 2016; Nemezc et al., 2016) (Figure 18).

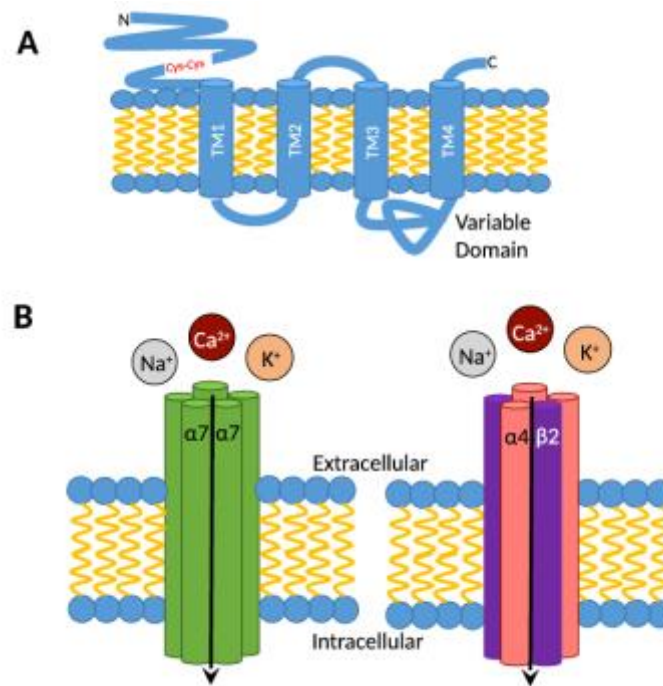


Figure 18 La structure des sous-unités de nAChRs. A: Structure des sous-unités de nAChR montrant la paire Cys-Cys qui définit les nAChRs de sous-unité  $\alpha$ . B: prototype de nAChR homopentamérique  $\alpha$ 7 (à gauche) et  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nAChR hétéropentamérique (à droite) (M. Carballosa et al., Expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in stem cells, *AIMS Bioengineering*, 2016).



## Chapitre 4. La consommation tabagique comme un facteur de risque

### 4.1 La consommation tabagique et l'arthrose

Parmi les facteurs de risques environnementaux de l'arthrose, la consommation de tabac occupe une place importante mais reste encore controversée de nos jours. Plusieurs études rétrospectives ont montré l'existence d'une relation inverse entre la consommation tabagique et l'arthrose (Felson and Zhang, 2014; Järvholm et al., 2005). De même chez les personnes fumeuses obèses le risque de développer la maladie est paradoxalement diminuée (Sandmark et al., 1999). Récemment, une étude *in vitro* a montré que la nicotine promeut la prolifération chondrocytaire ainsi que la biosynthèse de collagène de type II à partir de patients sains et arthrosiques (Ying et al., 2012a). Cette substance conférerait au chondrocyte une résistance à l'apoptose (Zheng et al., 2012). Au contraire, d'autres auteurs ont rapporté que la consommation de tabac avait un effet délétère sur l'homéostasie du cartilage. Lourido et al. ont trouvé que la nicotine augmente la sécrétion des protéines du cytosquelette et de la protéase cathepsine D, d'autre part, un traitement avec de la nicotine réduit la sécrétion de certaines protéines de MEC, telles que Col I et la décorine (Lourido et al., 2016). Le tabagisme est également lié à une plus forte prévalence de la douleur au genou (Miranda et al., 2002) et la perte de cartilage du genou (Amin et al., 2007; Ding et al., 2008). Certaines études ont montré que les composants de la fumée de tabac ont un effet délétère sur la fonction des chondrocytes dans les disques et inhibent la prolifération cellulaire et la synthèse de la matrice extracellulaire (Akmal et al., 2004; Oda et al., 2004). Au contraire, une étude *in vitro* a démontré que la nicotine est un puissant stimulateur de l'activité synthétique de cellules osseuses, tandis qu'un condensat de fumée de cigarette est nettement inhibiteur (Porter and Hanley, 2001). Au contraire, une étude de cohorte a examiné 2 505 hommes et femmes âgés de 40 ans et plus participant à l'étude longitudinale Clearwater Osteoarthritis (1988-2003).

Elle a montré aucune association entre le tabagisme et le développement de l'arthrose à l'un des quatre sites (genou, hanche, pied, et colonne cervicale) étudiés (Wilder et al., 2003).

## **4.2 La consommation de tabac et les CSM**

Les CSM sont un outil prometteur pour la régénération du cartilage. Cependant, l'efficacité de cette procédure peut être compromise par les facteurs qui influencent l'homéostasie des CSM. Par exemple, l'exposition à la nicotine environnementale du tabagisme actif, et la thérapie de remplacement de la nicotine ont été reconnues comme un facteur de risque. Des niveaux élevés de produits chimiques de cigarettes dans le sang de fumeurs pourraient endommager les CSM transplantées et les rendre inefficaces. Donc il est important d'évaluer l'effet de ces habitudes sur les CSM (Ruiz et al., 2012).

Les études relatives à l'effet de la nicotine sur les CSM ont été signalées précédemment. Plusieurs rapports ont décrit un effet positif de la nicotine sur la différenciation chondrogénique. Ying et al (Ying et al., 2012b) ont trouvé un effet positif de la nicotine sur Col II, mais pas sur l'expression d'agrecane. Roux et al (Roux et al., 2013) ont montré que la nicotine à des concentrations similaires à celles observées dans le sang des fumeurs induit une augmentation dose-dépendante d'expression d'agrecane, suggérant un effet protecteur inattendu de la substance dans ces conditions.

A l'inverse, la toxicité de la nicotine a été démontrée dans les CSM comprennent une réduction de la prolifération cellulaire, la diminution du potentiel de différenciation ostéogénique et une diminution de la mobilité (Ng et al., 2013; Zhou et al., 2013). La nicotine a été rapportée pour influencer la fonction et la prolifération cellulaire (Park et al., 2008). Zeng et al (Zeng et al., 2014) ont montré que la nicotine exerce des effets toxiques sur les CSM qui sont probablement liés, au moins en partie, à l'altération de l'expression de multiples protéines qui sont indispensables à la prolifération des cellules. Deng et al (Deng et al., 2012)

ont montré que l'exposition prénatale à la nicotine induit une chondrogenèse retardée (Deng et al., 2012). Elle affecte la chondrogénèse, en particulier au niveau des plaques de croissance au cours du développement en altérant la différenciation chondrocytaire et diminuant la synthèse des composants matriciels (Kawakita et al., 2008; Olsen, 1992). Elle a été également montrée une incidence négative sur les CSE humaines et leur développement en modifiant la morphologie de la cellule *in vitro*, et la régulation négative de l'expression de certains marqueurs de la pluripotence (Zdravkovic et al., 2008). Elle modifie clairement les propriétés de CS et affecte leur réponse à une lésion tissulaire.

### **4.3 L'expression et la fonction des nAChRs dans les CSM**

Les nAChRs sont largement exprimés dans tout le corps, y compris les CS (Kalamida et al., 2007; Lin et al., 2012). L'activation de ces récepteurs par la liaison à la nicotine a été impliquée dans de nombreuses modifications cellulaires. En ce qui concerne leur fonction, ils interviennent probablement de façon importante dans la signalisation cholinergique sur la survie/apoptose des CS, la prolifération, la migration et le potentiel de différenciation.

Les deux types sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  nAChRs ont été identifiées dans les CSM humaines (hCSM). En 2009, Hoogduijn et al. étaient les premiers à identifier l'expression de  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , et  $\alpha 7$  nAChR dans les CSM-MO par RT-PCR et cytométrie en flux (Hoogduijn et al., 2009). Bien que les auteurs n'ont pas observé l'expression des autres sous-unités ( $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 4$ ), il est important de mentionner que cette étude a une portée limitée car seule la sous-unité de nAChRs a été évaluée (l'expression d'ARNm pour  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  et  $\beta 3$  n'a pas été menée). L'expression complète de la sous-unité de nAChRs sur hCSM a été montrée par Schraufstatter et al. L'analyse par RT-PCR a indiqué l'expression de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$  dans les hCSM (Schraufstatter et al., 2009), mais seulement la présence de  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 4$  a pu être confirmée après analyse par séquençage d'ADN, western blot et

immunofluorescence (Schraufstatter et al., 2009), ce qui montre que les sous unités sont exprimées en quantité différente. Plus récemment, Zabltoni et al ont confirmé la présence de plusieurs sous-unités de nAChRs sur hCSM dérivées de fractures diaphysaires des os longs (Zabltoni et al., 2015).

L'expression de ces récepteurs est résumée dans un tableau récapitulatif (Tableau 3).

Tableau 3 Résumé de l'expression de nAChRs de CSM. N/A correspond à l'absence d'enquête de sous-unité

Source	Espèces	Expression ARNm de sous-unité	Expression Protéine de sous-unité	nAChRs fonctionnels	Référence
CSM-MO	Humain	$\alpha$ : $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7$ $\beta$ : N/A ( $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9, \beta 2$ - $\beta 4$ )	N/A	$\alpha 7$	(Hoogduijn et al., 2009)
CSM	Humain	$\alpha$ : $\alpha 1 - \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9$ $\beta$ : $\beta 2 - \beta 4$ ( $\alpha 1 - \alpha 10, \beta 1 - \beta 4$ )	$\alpha$ : $\alpha 7$ $\beta$ : $\beta 2, \beta 4$ ( $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$ )	$\alpha 7$	(Schraufstatter et al., 2009)
CSM-MO	Humain (M)	$\alpha$ : $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9$ $\beta$ : N/A ( $\alpha 2 - \alpha 7, \alpha 9, \alpha 10$ )	N/A	N/A	(Zablotni et al., 2015)
	Humain (F)	$\alpha$ : $\alpha 2, \alpha 5 - \alpha 7, \alpha 9, \alpha 10$ $\beta$ : N/A ( $\alpha 2 - \alpha 7, \alpha 9, \alpha 10$ )	N/A	N/A	
CSDLP	Humain	$\alpha$ : $\alpha 7$ $\beta$ : $\beta 4$ ( $\alpha 1 - \alpha 7, \beta 1 - \beta 4$ )	N/A	$\alpha 7$	(Kim et al., 2012)

Les nAChRs fonctionnels, en particulier leurs voies pour l'ion calcium, ont été identifiés sur les hCSM (Hoogduijn et al., 2009; Schraufstatter et al., 2009). La fonctionnalité de ces récepteurs peut être déterminée par les mesures de la mobilisation de  $Ca^{2+}$ , qui devrait augmenter par l'activation de  $\alpha 7$  nAChR. Dans une étude *in vitro*, Hoogduijn et al. ont étudié la fonctionnalité des nAChRs en mesurant les changements de  $Ca^{2+}$  en utilisant la sonde fluorescente spécifique du calcium (Hoogduijn et al., 2009). La présence de  $\alpha 7$  nAChR fonctionnel dans hCSM a également été confirmée dans les études *in vitro* menées par Schraufstatter et al (Schraufstatter et al., 2009). Comme les thérapies à base de CS deviennent plus fréquentes, la compréhension des effets induits par l'activation de ces récepteurs sera cruciale en raison de l'utilisation continue des produits du tabac, qui contiennent de la nicotine. Les effets de l'activation comprennent les changements de synthèse de l'ADN, la prolifération et la différenciation soit par action directe du flux d'ions ou en raison de l'activation des voies de messagers secondaires (Shen et al., 2013).

En résumé, l'ensemble de ces études présentées dans cette introduction montre l'existence d'un lien indéniable entre tabagisme et l'arthrose dans lequel les CSM semblent jouer un rôle important, même si les conclusions tirées semblent souvent opposées. Ainsi, la nicotine s'accumule facilement dans le lait maternel (Chen et al., 2015; Dahlström et al., 1990; Paccola and Miraglia, 2016) et les tissus placentaires (Maritz, 2002; Maritz and Dennis, 1998; Wong et al., 2015, 2016). L'absorption de la nicotine peut donc conduire à une vaste accumulation de nicotine dans de nombreux tissus, dont la plupart abrite des populations de CS résidentes. Nous avons voulu mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables des effets du tabac sur l'homéostasie du cartilage en étudiant le rôle de la nicotine sur le phénotype chondrocytaire ainsi que sur la prolifération et différenciation chondrogénique de CSM-GW.

# Matériel et Méthodes

## 1. Culture cellulaire

### 1.1 Mise en place des cultures primaires de chondrocytes humains

#### 1.1.1 Origine des prélèvements humains

Les fragments de cartilage arthrosique sont obtenus à partir de patients atteints d'arthrose qui ont subi une arthroplastie totale du genou dans le service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique de l'Hôpital Central de Nancy (CHRU, Nancy, Pr. Didier Mainard). Ils sont classés comme grades 3 et 4 selon le classement d'arthrose de Kellgren et Lawrence. En parallèle, de nombreuses données relatives aux patients collectées dans le dossier médical ont été recueillies après autorisation des services concernés, en particulier en rapport avec notre étude, l'âge, le poids, et la consommation tabagique. L'étude a été approuvée par notre institut de recherche local (Commission de la Recherche Clinique, UF 9757-CCRP 2004-Cellules Souches et chondrogénèse) et est conforme aux directives éthiques de la Déclaration d'Helsinki.

#### 1.1.2 Mise en culture des chondrocytes arthrosiques humains

Les cartilages sont séparés des tissus osseux et conjonctifs sous-jacents. Ensuite, les tranches du cartilage articulaire sont isolées avec 2 mg/ml de pronase (Sigma-Aldrich) pendant 90 min à 37°C. La solution de pronase est alors remplacée par 1,5 mg/ml de collagénase (Roche) dans DMEM/F12 (Gibco) sans sérum pendant une nuit à 37°C. Le surnageant est recueilli et centrifugé à 300 g pendant 5 min. Le culot cellulaire obtenu est mis en suspension dans DMEM/F12 avec 1% de pénicilline/streptomycine, 2 mM de L-glutamine,

100  $\mu$ M Proline, 200  $\mu$ M 2-phospho-L-acide ascorbique (Sigma-Aldrich) contenant 15% (v/v) de sérum de veau fœtal dé-complémenté (SVF, Dutscher). Un comptage cellulaire est réalisé: 10  $\mu$ l de cette suspension cellulaire et 10  $\mu$ l de Bleu Trypan sont additionnés sur une cellule de comptage (compteur automatique de cellules TC20, Bio-Rad). Une fois le comptage effectué, les cellules sont ensemencées en fioles de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated) à une densité de  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> avec 15 mL de milieu de culture : passage 0 (P0), et incubées dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO<sub>2</sub> en normoxie (20% O<sub>2</sub>) ou hypoxie (2% O<sub>2</sub>) à 37°C jusqu'à confluence. Le milieu de culture est changé tous les deux jours. Nous avons utilisé des chondrocytes au passage (P) P0 afin de limiter la dédifférenciation de ce type cellulaire.

## **1.2 Mise en place des cultures des CSM-GW**

### **1.2.1 Origine des prélèvements humains**

Les CSM-GW sont fournies par l'Unité de Thérapie Cellulaire et Banque de Tissus (UTCT, CHRU, Nancy, Pr. Danièle Bensoussan). Les cellules sont prélevées à partir du cordon ombilical de nouveaux-nés après en avoir informé la mère et avoir obtenu son consentement. Les cordons conservés à 4°C sont isolés par diffusion et adhésion sur plastique (par la méthode des explants), puis les cellules sont conservées dans de l'azote liquide à la fin du P0 en présence de DMSO. Chaque cordon est identifié par un numéro de façon à établir une traçabilité des prélèvements. Pour chaque cordon des informations sur la mère sont obtenues.

### **1.2.2 Analyse de l'expression de marqueur de surface cellulaire**

Les propriétés génétiques des CSM-GW sont vérifiées avant leur utilisation. Les CSM en



suspension dans la solution de blocage, sont réparties à raison de  $1 \times 10^5$  cellules par tube. Après 20 min d'incubation, elles sont lavées par centrifugation (300 g, 5 min) et les culots cellulaires sont repris dans 100  $\mu$ L de solution d'immunomarquage incluant soit différents anticorps, soit IgG-PE/FITC (contrôle iso-typique) ou dans 100  $\mu$ L de la solution de blocage (contrôle négatif). A l'issue d'une incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, 0,5 mL de DMEM sans rouge de phénol sont ajoutés dans chaque tube, puis une centrifugation (300 g, 5 min) est faite afin d'éliminer les anticorps en excès. Le culot cellulaire est alors repris dans 300  $\mu$ L de DMEM sans rouge de phénol avant d'être analysé en cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Les principaux antigènes de surface cellulaire CD34, CD45, HLA-DR, CD44, CD73, CD90, et CD105 sont détectés pour chaque échantillon (Tableau 4). Les cellules utilisées dans notre étude sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34, HLA-DR) et positives pour les marqueurs mésenchymateux (CD90, CD73, CD105) (Dominici et al., 2006).

Tableau 4 Les anticorps impliqués pour les immunomarquages de CSM-GW

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur
Anti-CD34/PE	Humain	IgG (Souris)	BD Pharmingen
Anti-CD45/FITC	Humain	IgG (Souris)	DakoCytomation
Anti-CD73/PE	Humain	IgG (Souris)	BD Pharmingen
Anti-CD90/FITC	Humain	IgG (Souris)	Beckman Coulter
Anti-CD105/PE	Humain	IgG (Souris)	Beckman Coulter
Anti-CD44/FITC	Humain	IgG (Souris)	Beckman Coulter
HLA-DR/FITC	Humain	IgG (Souris)	Beckman Coulter
Contrôle isotypique/PE	Humain	IgG (Souris)	Dako
Contrôle isotypique/FITC	Humain	IgG (Souris)	Dako

### **1.2.3 Mise en culture des CSM-GW**

La suspension cellulaire, conservée dans de l'azote liquide est progressivement chauffée dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la fonte totale du contenu du cryotube. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu complet pour éliminer le DMSO. Enfin, les CSM-GW sontensemencées en fioles de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated). Les cellules sont cultivées dans  $\alpha$ MEM (Lonza) contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 2 mM L-glutamine, et 10% (v/v) de SVF dé-complémenté. L'ensemencement s'effectue à une densité de  $5 \times 10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont cultivées à 37°C en hypoxie (2% O<sub>2</sub>), le milieu de culture est changé tous les deux jours.

### **1.2.4 Passage et congélation**

Les cellules se multiplient et sont transférées dans de nouvelles fioles une fois à sub-confluence. Pour chaque passage, les cellules sont rincées avec du PBS (Gibco). 3 mL de trypsine (Gibco) sont ajoutés dans fiole de 75cm<sup>2</sup> et laissés en contact des cellules pendant 5 min à 37°C. La réaction enzymatique est arrêtée par addition d'un volume égal du milieu complet. La solution contenant les cellules est centrifugée (300 g, 5 min). Le culot cellulaire est repris dans du milieu complet et une numération cellulaire est effectuée avec la même méthode que celle utilisée pour les chondrocytes. Les CSM-GW sont répartis dans des fioles ou sur des plaques de culture à la densité désirée. Les cellules sont utilisées jusqu'au P5.

Pour la congélation des cellules, le culot cellulaire, obtenu après l'action de la trypsine, est repris par une solution de SVF contenant 10% de DMSO à 4°C, de façon à obtenir  $1 \times 10^6$  cellules/mL de milieu de congélation. La suspension cellulaire est enfin conservée dans un congélateur à -80°C pendant 24h puis stockée à plus long terme à -145°C.

## **2. Analyse de la prolifération, viabilité, apoptose et nécrose cellulaire**

### **2.1 Prolifération cellulaire**

#### **2.1.1 Chondrocytes humains arthrosiques**

La prolifération des chondrocytes est analysée par le test MTT à des intervalles de temps différents (1<sup>er</sup>, 4<sup>ème</sup>, et 7<sup>ème</sup> jours). Les chondrocytes sontensemencés avec  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques à 96 puits. Les cellules sont laissées dans l'incubateur à 37°C pendant 24h pour permettre l'adhésion des cellules, les cellules non adhérentes sont éliminées le lendemain pendant le premier changement du milieu. Ensuite, les cellules sont divisées en 4 groupes soumis à différentes concentrations de nicotine (Sigma-Aldrich): 0,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M dissoute dans le milieu de culture et incubées jusqu'à confluence. Le milieu est changé tous les jours afin de maintenir un niveau constant d'exposition à la nicotine dans les puits traités de nicotine. Le choix de ces doses résulte du fait qu'il a été rapporté que la moyenne concentration de nicotine dans le sang d'une personne qui fume 20 cigarettes par jour était d'environ  $1 \times 10^{-7}$  M (Henningfield and Keenan, 1993; Hill et al., 1983). Avant la fin de l'incubation, 20 µl de solution de MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrasodiumbromide) (5 mg/ml dans PBS) (Sigma-Aldrich) sont ajoutés dans chaque puits et mis en incubation pendant 4h à 37°C. Les milieux sont éliminés par aspiration et 150 µl de DMSO sont ajoutés pour chaque puits. L'absorbance  $A_{550nm}$  est mesurée dans un lecteur de microplaques (Lecteur multimode Varioskan™ Flash, Thermo Fisher Scientific).

#### **2.1.2 Les CSM-GW**

La prolifération des CSM-GW est analysée par test MTT à des intervalles de temps différents (1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, et 6<sup>ème</sup> jours). Les cellules sontensemencées avec  $1 \times 10^3$

cellules/puits dans des plaques 96 puits, les groupes de nicotine sont supplémentées avec différentes concentrations de nicotine. La méthode est décrite précédemment.

## **2.2 Viabilité cellulaire, apoptose et nécrose**

La viabilité cellulaire ainsi que l'apoptose et la nécrose des cellules ont été analysées par cytométrie en flux en utilisant le kit Vybrant/Apoptosis basé sur la procédure de coloration d'Annexin V/iodure de propidium (IP) (Invitrogen).

L'apoptose est un processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Dans les cellules vivantes, la phosphatidylsérine (PS) se situe sur la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire. Cependant, pour les cellules apoptotiques, la PS est transférée du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique, s'exposant ainsi à l'environnement cellulaire externe. L'anticoagulant humain, annexine V, est une protéine phospholipide-liante et  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante qui a une affinité élevée pour la PS. L'annexine V, marquée avec un fluorophore ou de la biotine, peut identifier les cellules apoptotiques en se liant aux PS exposées sur le feuillet extérieur. Contrairement à l'apoptose, pour les cellules nécrotiques, la membrane plasmique étant détruite, elle permet l'entrée de certaines molécules telles que l'IP.

A la fin de P3, les CSM-GW sont réparties dans 2 tubes à hémolyse ( $< 10^6$  cellules par tube, un tube d'analyse et un contrôle négatif qui permet d'éliminer l'auto-fluorescence des cellules) dans 1 mL de PBS puis centrifugées ( $>300$  g, 5 min). Les cellules sont ensuite reprises par 100  $\mu\text{L}$  de tampon Annexine-liant 1X pour le tube d'analyse et 103  $\mu\text{L}$  pour le contrôle négatif. A ceci sont ajoutés 1  $\mu\text{L}$  de solution d'Annexine V couplée au fluorochrome AlexaFluor®488 et 2  $\mu\text{L}$  de solution d'IP. Après une incubation de 15 min à l'obscurité, la réaction est arrêtée avec 200  $\mu\text{L}$  de tampon fixant Annexine-liant 1X. La suspension cellulaire est immédiatement analysée au cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter) qui mesure la

fluorescence à 530nm (fluorescence de l'AlexaFluor®488 correspondant aux cellules apoptotiques) et 575nm (fluorescence de l'IP correspondant aux cellules nécrotiques) sur un minimum de 10 000 évènements.

### **3. Analyse de migration – Wound healing test**

Les cellules sont cultivées en boîte  $\mu$ -Dish 35mm, high (Ibidi®) contenant une chambre en silicone délimitant deux compartiments de culture (Figure 19.A) et permettant de créer une brèche cellulaire lors du retrait de la chambre en silicone (Figure 19.C). Les cellules sontensemencées séparément dans chacune des deux chambres de l'insert à une densité de  $5 \times 10^3$  cellules dans 70  $\mu$ L du milieu sans antibiotique (Figure 19.B), et placées durant toute la nuit à l'incubateur à 37°C afin d'obtenir une adhésion complète.

Le lendemain, le mélange de milieu contenant différentes concentrations de nicotine est ajouté. Les cellules sont incubées à 37°C. 24h après le traitement, le milieu de culture et la chambre de silicone est retirée créant une brèche (Figure 19.C) au milieu des cellules des deux compartiments, et représentant le point de départ de notre test de migration (t=0h). La boîte de culture est remplie avec 2 mL de milieu complet (Figure 19.D) et des photos sont prises après 6h (t=6h), 24h (t=24h), et 30h (t=30h) de culture afin d'observer le recouvrement éventuel de la brèche par les cellules qui migrent. Le nombre de cellules ayant migré dans la brèche est déterminé en utilisant le logiciel Photoshop.

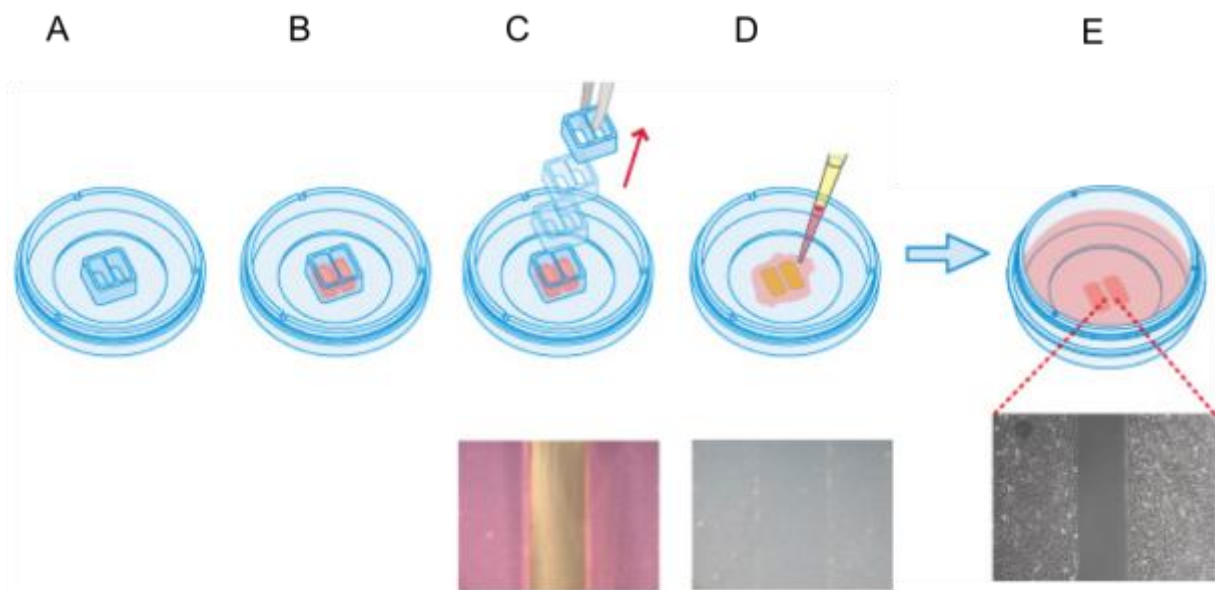


Figure 19 Principe de Wound Healing et Migration Assays. <http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-Removable-Chambers/Culture-Insert-2-Well>

## 4. Différenciation des CSM-GW

### 4.1 Adipogénèse

Les CSM-GW sont orientées vers une différenciation adipogénique suite à la mise en culture pendant 28 jours selon le protocole d'adipogénèse de Lonza en utilisant le milieu d'induction adipogénique (hMSC differentiation BulletKit™-adipogenic, Lonza). Il se compose de deux parties.

Partie 1 :

- Le milieu d'induction adipogénique
- h-insuline (recombinant)
- L-glutamine
- Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS)
- Dexaméthasone
- Indométhacine
- IBMX (3-isobuty-1-méthyl-xanthine)
- GA-1000 (30mg/mL Gentamicine et 15 µg/mL Amphotericine)

Partie 2 :

- Le milieu de maintenance adipogénique
- h-insuline (recombinante)
- L-glutamine
- Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS)
- GA-1000 (30 mg/mL Gentamicine et 15 µg/mL Amphotericine)

Les CSM-GW sontensemencées avec  $2,1 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans les plaques 48 puits avec 250 µL de αMEM (milieu de prolifération décrit dessus). Les cellules sont cultivées à 37°C en normoxie (20% O<sub>2</sub>), le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à confluence. Et puis une différenciation adipogénique optimale est induite par 3 cycles d'induction/maintenance. Chaque cycle consiste à alimenter les CSM-GW avec un milieu d'induction adipogénique supplémenté et à cultiver pendant 3 jours (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) suivi de 1-3 jours de culture dans un milieu de maintenance adipogénique supplémenté. Les puits contrôles avec seulement αMEM (milieu de prolifération) sont réalisés selon le même programme. Après 3 cycles complets d'induction/maintenance, les cellules sont cultivées pendant 7 jours supplémentaires dans un milieu de maintenance adipogénique supplémenté, le milieu est changé tous les 2-3 jours. L'état de différenciation adipogénique est confirmé par la coloration en utilisant AdipoRed<sup>TM</sup> Assay (détail dans la partie histologie).

## 4.2 Ostéogénèse

L'engagement vers la différenciation ostéogénique est obtenu par la mise en culture pendant 21 jours dans du milieu de différenciation ostéogénique (hMSC differentiation BulletKit<sup>TM</sup>-osteogenic, Lonza).

- Milieu basal de différenciation de hCSM - Ostéogénique
- Dexaméthasone
- L-glutamine
- Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS)

- Acide ascorbique
- Pénicilline/Streptomycine
- $\beta$ -glycérophosphate

Les CSM-GW sontensemencées avec  $3,1 \times 10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> dans les plaques 48 puits avec 250  $\mu$ L de  $\alpha$ MEM (milieu de prolifération). Les cellules sont laissées dans l'incubateur à 37°C en normoxie (20% O<sub>2</sub>) pendant 24 heures pour permettre l'adhésion des cellules, le milieu est remplacé par le milieu de différenciation ostéogénique complet. Les puits contrôles sont cultivés avec  $\alpha$ MEM (milieu de prolifération). Le milieu est changé tous les 2-3 jours pendant 21 jours. La différenciation ostéogénique est vérifiée par la coloration rouge alizarine (détail dans la partie histologie).

### 4.3 Chondrogénèse

La différenciation chondrogénique est réalisée en système tridimensionnel (3D pellets culture system). Le milieu d'induction chondrogénique (hMSC differentiation BulletKit™-chondrogenic, Lonza) additionné de 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 3 (Lonza) est utilisé.

- Milieu basal de différenciation de hCSM - Chondrogénique
- Dexaméthasone
- L-glutamine
- ITS + supplément
- Acide ascorbique
- GA-1000 (30 mg/mL Gentamicine et 15  $\mu$ g/mL Amphotericine)
- Sodium pyruvate
- Proline

Environ  $2,5 \times 10^5$  cellules sontensemencées dans un tube polypropylène de 15 ml et sont centrifugées selon le protocole du fabricant. A confluence, les tapis cellulaires sont lavés au PBS, décollés par la trypsine (Gibco) et centrifugés. Le surnageant est éliminé, le culot



cellulaire remis en suspension dans un milieu complet et une numération cellulaire est effectuée. Les cellules sont ensuite centrifugées (150 g, 5 min) et reprises par le milieu de différenciation sans TGF- $\beta$ 3. Après la seconde centrifugation (150 g, 5 min) et retrait du surnageant, le culot cellulaire est mis en suspension dans 0,5 mL de milieu de différenciation complet en présence de TGF- $\beta$ 3 et réparti dans les tubes Falcon 15 mL. Les tubes sont ensuite centrifugés une dernière fois (150 g, 5 min) puis placés en hypoxie (2% O<sub>2</sub>) à 37°C pendant 28 jours. Le couvercle du tube est laissé ouvert pour permettre l'échange de gaz. Le milieu est changé tous les jours afin de maintenir un niveau constant d'exposition à la nicotine. Les cellules sont traitées ou non avec différentes concentrations de nicotine pendant toute la durée de la différenciation.

À J28, les culots sont rincés avec 1 mL de PBS à deux reprises. Les culots sont fixés avec 0,5 mL de 4% paraformaldéhyde pendant 24h à 4°C, puis de nouveau rincés au PBS et enfin stockés à 4°C jusqu'à utilisation pour histologie. La coloration bleu alcian est utilisée pour confirmer la différenciation chondrogénique (détail dans la partie histologie).

Les culots restants sont congelés dans 0,5 mL de Trizol (Life Technologies) pour une utilisation ultérieure en biologie moléculaire (3 culots dans un tube Eppendorf® 1,5 mL).

## **5. Analyses moléculaires**

### **5.1 Extraction des ARNm totaux**

#### **5.1.1 À partir de cellules en monocouche**

Les ARNm des cellules sont extraits suivant les instructions du Rneasy Mini kit (Qiagen). Les cellules à confluence sont rincées avec PBS, puis sont reprises dans un volume de tampon RLT additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol (10  $\mu$ L/mL, Sigma Aldrich). Cette étape permet la lyse des cellules, et ainsi la libération des acides nucléiques. Le même volume d'éthanol à 70 %

(v/v) est ajouté avant de passer ce mélange sur la colonne d'extraction d'ARN qui est ensuite lavée avec les tampons RW1 (1 fois, 700 µL) et RPE (2 fois, 500 µL/fois) fournis dans le kit. L'élution est réalisée avec 20-30 µL d'eau Dnase/Rnase-free.

### **5.1.2 À partir de cellules en système tridimensionnel (culots)**

La qualité de la MEC produite par la différenciation des CSM-GW en culots ne permet pas une extraction optimale des ARNm en utilisant la méthode décrite dessus. L'extraction se fait par la méthode classique en utilisant du Trizol.

Les culots sont broyés à l'aide d'un pilon en téflon et 100 µL de chloroforme (Sigma-Aldrich) sont ajoutés dans les tubes Eppendorf<sup>®</sup>, après en utilisant 500 µL Trizol (Life Technologies) /3 culots selon les instructions du fabricant. La solution est homogénéisée et ensuite agitée vigoureusement pendant 15 s. Les tubes sont ensuite centrifugés (12000 g, 15 min, 4°C) ; la phase aqueuse formée est transférée dans un nouveau tube Dnase/Rnase-free, et l'ARNm est précipité suite à l'ajout de 250 µL d'isopropanol. L'ARNm est enfin purifié par lavage à l'éthanol 75%, puis le culot d'ARNm est dissous dans l'eau Dnase/Rnase-free.

## **5.2 Dosage spectrophotométrique**

La concentration des ARNm est ensuite évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm sur le spectrophotomètre Nanodrop<sup>®</sup> (Spectrophotometer ND-1000, Thermo Fisher Scientific) qui permet une mesure sur 1 µL. La qualité et la pureté des ARNm extraits sont évaluées grâce au rapport A260nm/A280nm qui doit être compris entre 1.8 et 2.

### 5.3 Rétro-transcription

La rétro-transcription permet d'obtenir un ADN simple brin complémentaire (ADNc) de l'ARNm.

La rétro-transcription est effectuée en utilisant 1µg d'ARNm à l'aide du kit iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur (Tableau 5) dans les conditions expérimentales suivantes : (1) 5 min à 25°C, (2) 20 min à 46°C, (3) 1 min à 95°C. La réaction est exécutée dans un Master cycle gradient™ (Eppendorf). Les échantillons d'ADNc sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

Tableau 5 Composants de la réaction de rétro-transcription

Composants	Volume par réaction, µL
iScript RT Supermix	4
ARN modèle (1 µg)	Variable
Eau Dnase/Rnase-free	Variable
Volume total	20

### 5.4 RT-PCR

La technique de PCR est une méthode qui permet de suivre l'amplification par une polymérase, de fragments d'ADN spécifiques de longueur définie. La réaction de PCR se déroule en trois étapes: dénaturation, hybridation, élongation et synthèse du brin néo-synthétisé.

La phase d'amplification de RT-PCR est réalisée en utilisant la Taq PCR kit Master Mix (Qiagen) dans un mélange final de 50 µL (Tableau 6).

Tableau 6 Composants de la phase d'amplification

Composants	Volume/réaction	Concentration Finale
		2,5 unités Taq ADN Polymérase
Taq PCR Master Mix	25 µL	1×Tampon de PCR Qiagen
		200 µM de chaque dNTP
Amorce A	2.5 µL	0.5 µM
Amorce B	2.5 µL	0.5 µM
RNase-free	Variable	
ADNc	Variable	1 µg/réaction
Volume total	50µL	

Le schéma d'amplification (Tableau 7) est commencé par une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 min, suivent 35 cycles de dénaturation, hybridation et élongation. Puis les échantillons sont soumis à 10 min d'élongation à 72°C. Ensuite ils sont maintenus à 4°C. Les ADN peuvent être gardés à -80°C jusqu'à l'électrophorèse.

Tableau 7 Condition de Cycle thermal

Dénaturation Initiale	3 min	94°C
Cycles de 3 étapes		
Dénaturation	1 min	94°C
Hybridation	1 min	60°C
Élongation	1 min	72°C
Nombre de cycle	35	
Élongation Finale	10 min	72°C

## **5.5 Electrophorèse des produits d'ADN**

### **5.5.1 Préparation du gel**

1g d'agarose (Lonza) est dissous dans 100 mL de tampon d'électrophorèse TBE 1× (Euromedex), puis chauffé jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Ensuite, ajoute 10 µL GelRed™ (Biotium) (1%) qui est un agent intercalant les acides nucléiques. La solution est alors transférée dans une cuve dans laquelle est placé un peigne. Lorsque le gel est polymérisé, le peigne est retiré formant ainsi des puits pour déposer les échantillons d'ADN.

### **5.5.2 Migration**

15 µL d'échantillon d'ADN sont additionnées à 3 µL de tampon de charge 6×, 6 µL de marqueur de taille (Invitrogen) est déposé parallèlement dans les puits de gel. La migration est réalisée à un voltage de 50V pendant 5 min dans du tampon TBE 1×, puis à un voltage constant de 100V pendant 30 min. Les fragments d'ADN amplifiés sont photographiés en utilisant GBOX (Syngene, Frederick).

## **5.6 PCR quantitative en temps réel**

Le système de détection utilisé repose sur l'inclusion d'un agent intercalant fluorescent dans le milieu réactionnel de la PCR. L'agent le plus communément utilisé, le Sybr Green I, va se lier préférentiellement à l'ADN double brin et, lorsqu'il sera excité par un rayonnement lumineux (longueur d'onde entre 470 et 490 nm), il émettra un signal fluorescent (longueur d'onde entre 510 et 530 nm). Ainsi, la mesure de l'intensité de fluorescence émise à chaque fin d'étape d'élongation permet le suivi de la réaction de PCR.

La réaction de PCR est réalisée en plaques 96 puits (MicroAmp® Optical 96-Well

Reaction Plate, Applied Biosystems) sur l'appareil StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) dans un volume final de 20 µL, contenant 2 µL de la dilution (dans l'eau DNase-RNase free au 1:2) d'ADNc, 2 µL des amorces du gène d'intérêt ou 2 µL des amorces de Ribosomal Protein S29 (RPS 29) utilisée comme gène de référence, 6 µL d'eau DNase-RNase free et 10 µL de SYBR Green (Bio-Rad). Après dépôt des échantillons, la plaque est scellée par un film transparent, puis centrifugée. La réaction comprend les étapes suivantes: 95°C pendant 10 min (activation de la polymérase), puis 40 cycles 95°C pendant 15 s et 60°C pendant 60 s. Les séquences des amorces pour les gènes d'intérêts sont présentées dans le Tableau 8. La méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Nolan et al., 2006) est utilisée pour déterminer les niveaux d'expression relatifs des ARNm dans les différentes conditions expérimentales après normalisation par rapport au gène de référence RPS 29.

Tableau 8 Les séquences des amorces utilisées pour la PCR analyse d'ADNc humain

Gène	Amorce Forward (5'- 3')	Amorce Reverse (5'- 3')
RPS29	GGGTCAACCAGCAGCTGTACT	CAGACACGACAAGAGCGAGA
Sox9	GAGGCAGAGGAGGCCACGGA	CCGGAGGAGGAGTGTGGCGA
Col2a1	ATGACAATCTGGCTCCCAAC	GAACCTGCTATTGCCCTCTG
Aggrecan	TCTGTAACCCAGGCTCCAAC	CTGGCAAAATCCCCACTAAA
MMP13	AATTGTCCGGTTTGTCTTGGA	GGGAAGTGCTGGGGGATTTT
Runx2	GCTGTTATGAAAAACCAAGT	GGGAGGATTTGTGAAGAC
ColX	TGCCACAGGCATAAAAAGGCC	TGGTGGTCCAGAAGGACCTGGG
IL-1β	Qiagen	
XT-1	PPH 16546E-200 SuperArray Biosciences	
GlcAT-1	PPH 14293A-200 SuperArray Biosciences	
α3 nAChR	ACGAGGGCAACGCTCAGAAG	CTCTTTGGCTTCATTTTGTGC
α4 nAChR	ATCGAGTCCATGCATAAGATG	ACCGAGAAGTCTGTGTCTTC
α5 nAChR	TTCACACGCTTCCCAAAGTGC	ATCATTTTCCTTCATGATGTGTG
α7 nAChR	CGTGGTTCCTGCGAATGAAG	AAGCGGTTGGCAATGTAGCG
β2 nAChR	AGCAGCCACGCCATCATTGC	CTCTGGTCATCGTCCTCGC
β4 nAChR	TCTTCATGAAGCGCCCTGGC	TCTCTGGTCTTCATCGTCATTC

## **6. Étude histologiques et colorations**

### **6.1 Colorations des cellules en monocouche**

Pour confirmer l'état de différenciation des CSM-GW, différentes colorations spécifiques des ostéoblastes et des adipocytes ont été utilisées. Après culture en plaque selon différents protocoles de différenciation, les cellules sont fixées par 4% paraformaldéhyde (PAF) (p/v, Sigma) (pH 7.4) dans du tampon PBS (Eurobio) pendant 15 min, et ensuite colorées.

#### **6.1.1 Rouge Alizarine**

Le Rouge Alizarine est un colorant qui permet de visualiser les dépôts calciques. Le Rouge Alizarine (Sigma) est préparée à 1% (pH 4,1-4,3) dans de l'eau distillée. 250 µL de Rouge Alizarine sont ajoutés dans un puits (plaques 48 puits) de plaque en différenciation ostéogénique pendant 45 min sous agitation, puis les plaques sont rincées 5 fois avec du PBS. Les photos sont prises par un microscope (DMI 3000B, Leica) et l'appareil photo (Canon).

#### **6.1.2 AdipoRed™ Assay**

AdipoRed™ est un réactif très performant qui permet de quantifier les vésicules lipidiques intracellulaires. AdipoRed™ est une solution de Hydrophilic Stain Nile Red. Lorsque Nile Red est dans un environnement hydrophobe, il devienne fluorescent. 12 µL de AdipoRed™ sont ajoutés dans un puits (plaques 48 puits) avec 400 µL de PBS, et les plaques sont incubées pendant 15 min à température ambiante. Les photos sont prises à partir d'un microscope (DMI 3000B, Leica).

## **6.2 Préparation des échantillons (culots)**

Après 28 jours de culture, les culots sont fixés dans 4% paraformaldéhyde (p/v, Sigma) (pH 7.4) dans du PBS pendant 24h, puis déshydratés par une série de concentrations croissantes d'éthanol. Trois bains d'une heure dans l'éthanol 70%, suivis de trois bains d'une heure dans l'éthanol à 95%, et enfin trois bains d'une heure dans l'éthanol absolu. Et puis l'éthanol absolu est éliminé par trois bains de 30 min dans du toluène. Enfin, les culots sont placés dans trois bains successifs de paraffine liquide à 58°C. Le processus de déshydratation s'effectue en utilisant l'appareil de déshydratation automatisée (Leica ASP 300S).

Les culots sont ensuite inclus dans des blocs de paraffine, les blocs sont solidifiés par une diminution de la température sur une plaque à -4°C (Sakura Tissue-Tek TEC) et conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation. Les blocs sont coupés en sections d'épaisseur 5 µm à l'aide d'un microtome (Leica RM 2135) et les sections sont montées sur des lames de verre.

## **6.3 Différentes colorations**

Pour l'analyse morphologique, les sections sont colorées en utilisant Hématoxyline-érythrosine-Safran (HES), ainsi Rouge Sirius et Bleu Alcian sont utilisés pour évaluer la quantité des collagènes totaux et PGs, respectivement. Les colorations ont été faites en utilisant l'appareil de coloration automatisée (Sakura Tissue-Tek DRS). Les lames sont montées avec une résine synthétique Pertex<sup>®</sup> (HistoLab) afin de permettre leur conservation et observées par microscopie optique (DMD 108, Leica).

### **6.3.1 Hématoxyline-érythrosine-Safran**

HES est une coloration standard qui permet de visualiser la cellularité. L'hématoxyline (0,5%, 5 min, RAL Diagnostics) colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine (1%, 5 min, RAL



Diagnostics) se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme), et le safran (1%, 5 min, RAL Diagnostics) se lie aux collagènes et à certaines protéines (coloration jaune) (Tableau 9).

Tableau 9 Programme de la coloration HES

1	Xylène	10 min	10	Eau distillée	3 min
2	Alcool 100%	5 min	11	Eosine	5 min
3	Alcool 95%	5 min	12	Lavage	3 min
4	Alcool 70%	5 min	13	Alcool 95%	3 min
5	Lavage	5 min	14	Alcool 100%	3 min
6	Hematox	5 min	15	Safran	5 min
7	Lavage	3 min	16	Alcool 100%	5 min
8	Alcool Ammoniacal	1 min	17	Xylène	5 min
9	Lavage	3 min			

### 6.3.2 Rouge Sirius

Rouge sirius est un colorant acide hydrophile qui colore en rouge les fibres de collagène.

Rouge sirius (Prolabo, France) 0,1% dans une solution d'acide picrique saturée (Tableau 10).

Tableau 10 Programme de la coloration Rouge Sirius

1	Xylène	10 min	6	Rouge Sirius	1 h
2	Alcool 100%	5 min	7	HCL 0.01N	2 min
3	Alcool 95%	5 min	8	Alcool 95%	2 min
4	Alcool 70%	5 min	9	Alcool 100%	2 min
5	Lavage	5 min	10	Xylène	5 min

### 6.3.3 Bleu Alcian

Bleu alcian permet la mise en évidence des PGs. La coloration est réalisée par du bleu alcian (Searle Diagnostic) (0,1%, 2 h), puis par des rinçages à l'eau courante. Un bain de 10 min dans du Kernechtrot (0.5 g Kernechtrot, 25 g de sulfate d'aluminium et 500 mL d'eau distillée) est ensuite réalisé afin de colorer les noyaux en rose (Tableau 11).

Tableau 11 Programme de la coloration Bleu Alcian

1	Xylène	10 min	8	Lavage	5 min
2	Alcool 100%	5 min	9	Kernechtrot	5 min
3	Alcool 95%	5 min	10	Lavage	5 min
4	Alcool 70%	5 min	11	Alcool 95%	30 s
5	Lavage	5 min	12	Alcool 100%	30 s
6	Bleu Alcian	1 h	13	Xylène	5 min
7	Bleu Alcian	1h			

Les images sont enregistrées et traitées par une méthode semi-quantitative en utilisant le logiciel open source multiplateformes Image J (National Institutes of Health, Bethesda) pour calculer le pourcentage de surface rouge ou bleu (María Lucía Gutiérrez et al., 2012, p.). Les images sont codées en 8 bits. Selon nos réglages instrumentaux, bleu alcian correspond à l'histogramme de la teinte du filtre (137-193), Kernechtrot est l'intervalle de segmentation (195-237). En ce qui concerne rouge sirius, la segmentation était basée sur la composante de saturation de l'image en filtrant les canaux (250-255). La valeur obtenue est définie en pourcentage en multipliant par 100.

## **7. Étude de l'expression des protéines par Western blot**

Le western blot est une méthode permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines que l'on souhaite détecter. Cette technique utilise l'électrophorèse sur gel polyacrylamide pour séparer des protéines, préalablement dénaturées, selon leur taille. Ces protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane, où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine, d'évaluer sa taille, sa concentration relative, les variations de cette concentration, effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes, etc.

### **7.1 Extraction et préparation des protéines**

Après rinçage au PBS, les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. 50 µL de RIPA buffer (Cell Signaling) ou 100 µL de tampon de charge (1:19 β-mercaptoéthanol : Laemmli composé de 62.5 mM tris-HCl (pH 6,8), 2% (p/v) SDS, 25% glycérol, 0.01% (p/v) bleu de bromophenol), sont ajoutés dans chaque puits d'une plaque 6 puits. Les plaques sont incubées sur glace pendant 5 min. Les cellules sont grattées et transférées dans des nouveaux microtubes, elles sont homogénéisées par sonication (utilisation d'ultra-sons pour rompre les membranes) 3 fois 5 s. Les lysats cellulaires sont centrifugés ensuite à 14000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines totales est récupéré.

Les échantillons sont ensuite bouillis à 95°C pendant 5 min. Pour les échantillons traités par RIPA, une fois la concentration de protéine calculée, 30 µg de protéine sont mélangées avec le même volume de tampon de charge 2x, ensuite bouillis. Enfin, les protéines sont mises dans de la glace puis congelées rapidement.

La concentration des protéines est déterminée grâce une réaction colorimétrique qui

consiste en premier lieu à préparer une gamme étalon à partir de sérum albumine bovine (BSA) (Euromedex) à 1 mg/mL, en utilisant le protocole standard de la méthode Bicinchoninic Acid Solution (BCA) (Sigma-Aldrich). Préparer le réactif 50 : 1 BCA : CuSO<sub>4</sub>, ajouté 10 µL de la gamme ou de l'échantillon additionné 200 µL de réactif dans un puits de micorplaque 96 puits, après incubé 45 min à 37°C. L'absorbance de la coloration est lue à 562 nm.

## **7.2 Électrophorèse sur gel et transfert sur membrane**

Le gel gradient de 4-15% (Criterion™ TGX, Bio-Rad) est utilisé. La migration s'effectue à 150V pendant environ 1h dans le tampon de migration (25 mM de Tris-Base, 192 mM de Glycine, 0,1% SDS, pH=8,3).

Les membranes de PVDF (Bio-Rad) sont humidifiées dans du méthanol pendant 2 à 3 min et puis plongées dans le tampon de transfert (25 mM de Tris, 192 mM de Glycine, 0,05% SDS, 20% de Méthanol, pH=8,3). Le transfert est réalisé dans un appareil d'électro-transfert Trans-Bolt (Bio-Rad), sous un voltage constant de 12V par gel pendant 30 min. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel.

## **7.3 Blocage et détection**

Le blocage est réalisé en plongeant la membrane dans une solution à 5% (p/v) du lait sans matières grasses dans un tampon tris buffer saline tween (TBST, composé de 150mM Tris-Base (pH 8,5), 10mM NaCl, 1% (v/v) Tween20, 0,02% (p/v) azide de sodium) pendant 1 h à température ambiante sous agitation.

Les anticorps primaires sont dilués à différentes concentrations selon leur spécificité (Tableau 12), dans du tampon 5% (p/v) de BSA dans TBST. Un anticorps monoclonal dirigé contre le propeptide-C du procollagène II (pro-COL2, clone 11D3) a été produit chez Eurogentech et utilisé pour détecter le procollagène complet de type II (Vincourt et al., 2012). La membrane est incubée dans la solution diluée d'anticorps primaire sous agitation modérée à 4°C pendant toute la nuit.

Tableau 12 Anticorps primaires impliqués

Anticoprns	Isotype	Dilution	Fournisseur
Anti-AChR $\alpha$ 7-HRP	IgG (Rat)	1/200	Santa Cruz
Anti-Sox9	IgG (Souris)	1/200	Santa Cruz
$\beta$ -Actin	IgG (Souris)	1/6000	Sigma-Aldrich

Après lavage au TBST, l'anticorps secondaire lié à la horseradishperoxidase (HRP) est utilisé (Tableau 13). La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 h sous agitation.

Tableau 13 Anticorps secondaires impliqués

Anticoprns	Dilution	Fournisseur
Goat anti-mouse IgG-HRP conjugate	1/2000	Cell Signaling

La détection par la chimiluminescence (enhanced chemiluminescence, ECL) est utilisée. Les membranes sont transférées dans l'enceinte de l'appareil ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad), incubées avec un mélange des deux réactifs du kit ECL (Bio-Rad). Enfin, les photos sont prises après la révélation.

## 8. Étude de l'expression de protéines en immunofluorescence

Il existe deux types de fluorescence, directe et indirecte (Figure 20). L'immunofluorescence indirecte est basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps : le premier anticorps de type monoclonal reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt. Le second anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire.

Après fixés par une solution de paraformaldéhyde (4% dans du PBS, pH 7,4, Sigma-Aldrich) pendant 15 min à température ambiante puis lavées 3 fois au PBS. Les cellules sont incubées dans la solution de tampon de blocage (1x PBS, 5% BSA) pendant 1h. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire (Anti-nAChR,  $\alpha$ 7-Subunit, BioLegend) dilué dans du tampon de dilution anticorps (1x PBS, 1% BSA) (dilution 1/50) pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire conjugué au fluorochrome (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, FITC, Thermo Fisher) dilué dans du tampon de dilution anticorps (1 :200) pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après rinçage, les noyaux sont marqués avec DAPI (Sigma-Aldrich) (dilution 1/2000) pendant 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

À la fin des marquages, les cellules sont lavées 3 fois avant d'être observés en microscopie à fluorescence. Un contrôle négatif est préparé en même temps. Les plaques sont observées sous un microscope à épifluorescence (DMI 3000B, Leica) équipé de différents filtres (FITC ou DAPI).

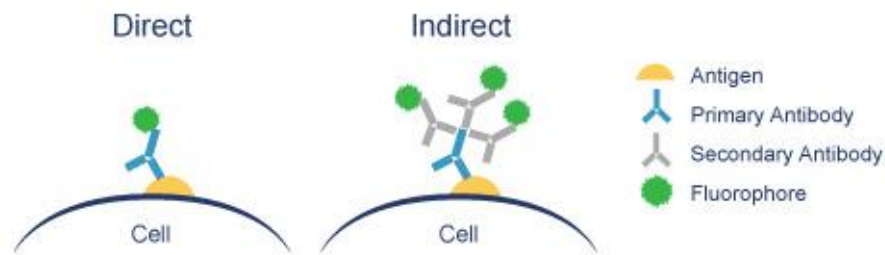


Figure 20 Principe du marquage par immunofluorescence. <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>

## 9. Étude de l'expression de protéines en LC-MALDI

L'identification et la quantification des protéines les plus sécrétées par les chondrocytes et leurs quantités relatives (entre échantillons) sont déterminées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Desorption Ionization-Time Of Flight) sans marquage, couplée à la chromatographie liquide (label-free LC (Liquide Chromatography)-MALDI) selon la méthode développée par Riffault et al (Riffault et al., 2015).

### 9.1 Préparation des échantillons

Les chondrocytes sont préparées dans des boîtes de Pétri (100 mm) jusqu'à sub-confluence dans DMEM/F12 contenant 15% de SVF. Les cellules sont rincées deux fois avec PBS, puis remplacées par le milieu complet sans SVF. Les milieux sont transférés dans un tube Falcon 15 ml après 48 h d'incubation. Après une centrifugation (1000 g, 5 min), le surnageant est transféré pour analyse des secrétomes.

## 9.2 Traitement de secrétome soluble pour la digestion et LC-MALDI

A partir de chaque milieu conditionné en boîtes de Pétri (100 mm), un aliquote de 1 ml du surnageant est récupéré pour la digestion en solution. Le détergent Deoxycholate (DOC) est ajouté à 0,02% pendant 15 min sur la glace et de l'acide trichloroacétique (ATA) est ajouté à 15% pendant 1 h. Les culots des protéines sont obtenus par la centrifugation à 16000 g pendant 15 min à 4 °C et rincées deux fois avec de l'acétone glacée. Les culots sont séchés 5 min à pression atmosphérique et remis en suspension dans 30 µl d'urée 6 M, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) sous sonication (pour la mesure de la teneur totale en protéines, basée sur l'absorbance à 280 nm, mesurée sur un spectrophotomètre Nanodrop). Une fraction correspondant à un maximum de 10 µg de protéines totales est traitée pour la digestion comme suit: Les résidus cystéine sont réduits par addition de 4 mM DTT pendant 45 min, alkylés par addition de 40 mM iodoacétamide (IAA) pendant 30 min et l'IAA restante est bloquée par addition de 40 mM de DTT pendant 15 min. Les solutions de protéine sont diluées 10 fois dans 50 mM Tris, pH 8,0, 1 mM CaCl<sub>2</sub> et 1 ng de trypsine sont ajoutées pour 100 ng de mélange de protéines. La digestion est laissée pendant une nuit à 37 °C et arrêtée par addition d'acétonitrile (ACN) à 2% et 0,5% de l'TFA. Un maximum de 500 ng de digestion de protéines est séparé par nanoHPLC sur un système Ultimate 3000 (Dionex) équipé d'une boucle d'échantillon de 20 µl, d'une précolonne de dessalage pepMap 100 C18 (Dionex) et d'une colonne de fractionnement 15 cm pepMap RSLC C18 (Dionex). Des échantillons (5 µl) sont injectés en utilisant le mode µpickup et élués par un gradient d'ACN de 2 à 45% pendant 30 min à 300 nl/min. Les fractions (170, 6 secondes chacune) sont collectées sur un ProteinerFcII (Bruker) pendant 21 min et les élués sont directement mélangés sur MTP-1536 TF target (Bruker) à l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (Bruker).

Les opérations LC-MALDI dédiées à la quantification sont traitées à l'aide de méthodes automatiques dédiées pilotées par le logiciel WARP-LC sur un spectromètre de masse



MALDI-TOF/TOF (Bruker) à vitesse Autoflex dans la gamme de masses 800-3500, en utilisant un calibrage externe voisin pour tous les spots MALDI. Le milieu de culture sans nicotine est utilisé comme référence. Les mesures de quantifications relatives des peptides ainsi que les statistiques associées sont traitées à l'aide du logiciel dédié Profile Analysis 2.0 et compilées par protéine sur le serveur Proteinscape, la variation de chaque protéine étant la médiane des valeurs obtenues pour l'ensemble des peptides correspondant, les 2 valeurs extrêmes étant exclues. La variation affichée correspond au coefficient de variation entre les peptides considérés. La signification des différences est, elle, évaluée sur la base des p-values observées pour chaque peptide utilisé pour la mesure.

## **10. Flux calcique**

Le Fluo-4 NW Calcium assay kit (Molecular Probes, Invitrogen) est utilisé pour détecter la mobilisation du calcium médiée par la nicotine. Les cellules sont ensemencées en plaques de 24 puits, cultivées jusqu'à sub-confluence, puis les cellules sont lavées avec le tampon d'essai. Le Fluo-4 AM est ajouté aux cellules et incubé à 37°C pendant 30 min, puis à température ambiante pendant un temps supplémentaire de 30 min. La fluorescence relative est mesurée avant et après l'addition de nicotine ou un tampon d'essai pour le groupe témoin. Les mesures sont faites dans un lecteur de microplaques (Lecteur multimode Varioskan™ Flash, Thermo Fisher Scientific) en prenant les mesures toutes les 5 s pendant 90 s. Les résultats sont présentés par le changement de fluorescence entre cellules témoins et cellules traitées par la nicotine.

## 11. Analyses statistiques

Toutes les données présentées sont la moyenne  $\pm$  erreur standard. Pour chaque étude, un minimum de 3 intra-essais est réalisé. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student (test non paramétrique, de Mann-Whitney) et est effectué à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad). Les valeurs *P* inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

# Résultats

## 1. Caractéristiques des prélèvements du cartilage

31 articulations de genou arthrosique ont été prélevées à l'Hôpital Central de Nancy (Service d'Orthopédie, Pr D. Mainard). Les caractéristiques concernant l'état civil des patients de cette collection sont les suivantes : âge moyen  $66,97 \pm 9,26$  ans, 7 hommes et 24 femmes, 5 fumeurs et 8 non-fumeurs. Nous n'avons pas d'informations sur la consommation de tabac concernant 18 patients. L'ensemble des données pour tous les patients inclus dans notre étude est résumé dans Tableau 14. Il n'y a pas de différence statistique entre les deux groupes concernant l'âge ( $P=0.244$ ). Cependant, on a trouvé qu'il y a une différence significative selon le sexe entre les deux groupes ( $P=0.032$ ) : 7 femmes (87.5%) sur 8 chez le groupe non-fumeur, 4 hommes (80%) sur 5 dans le groupe de fumeurs.

Tableau 14 Variables démographiques et cliniques recueillies pour tous les patients, avec les différences entre les groupes identifiés

Variabes	Non-fumeurs	Fumeurs	<i>P</i>
No. de sujets	8	5	
Âge	$70 \pm 7.8$	$61.6 \pm 12.2$	0.244 <sup>a</sup>
Hommes	1 (12.5%)	4 (80%)	0.032 <sup>b</sup>
Femmes	7 (87.5%)	1 (20%)	

Notes: L'âge est rapporté par la moyenne  $\pm$  SD ; <sup>a</sup> Mann Whitney test; <sup>b</sup> Fisher exact test.

## 2. Optimisation des conditions de culture du chondrocyte humain arthrosique

Deux prélèvements indépendants à partir de patients non fumeurs ont été effectués pour optimiser l'obtention de chondrocytes. Nous avons trouvé :

- 1) La zone de cartilage relativement saine est meilleure que la zone abîmée en mesurant l'expression de marqueurs chondrocytaires, tels que Sox9 (Figure 21.A), Col II (Figure 21.B), et Agrécane (Figure 21.C);
- 2) Le passage 0 (P0) est meilleur que passage 1 (P1) concernant le maintien de phénotype chondrocytaire selon l'expression des mêmes marqueurs (Figure 21).

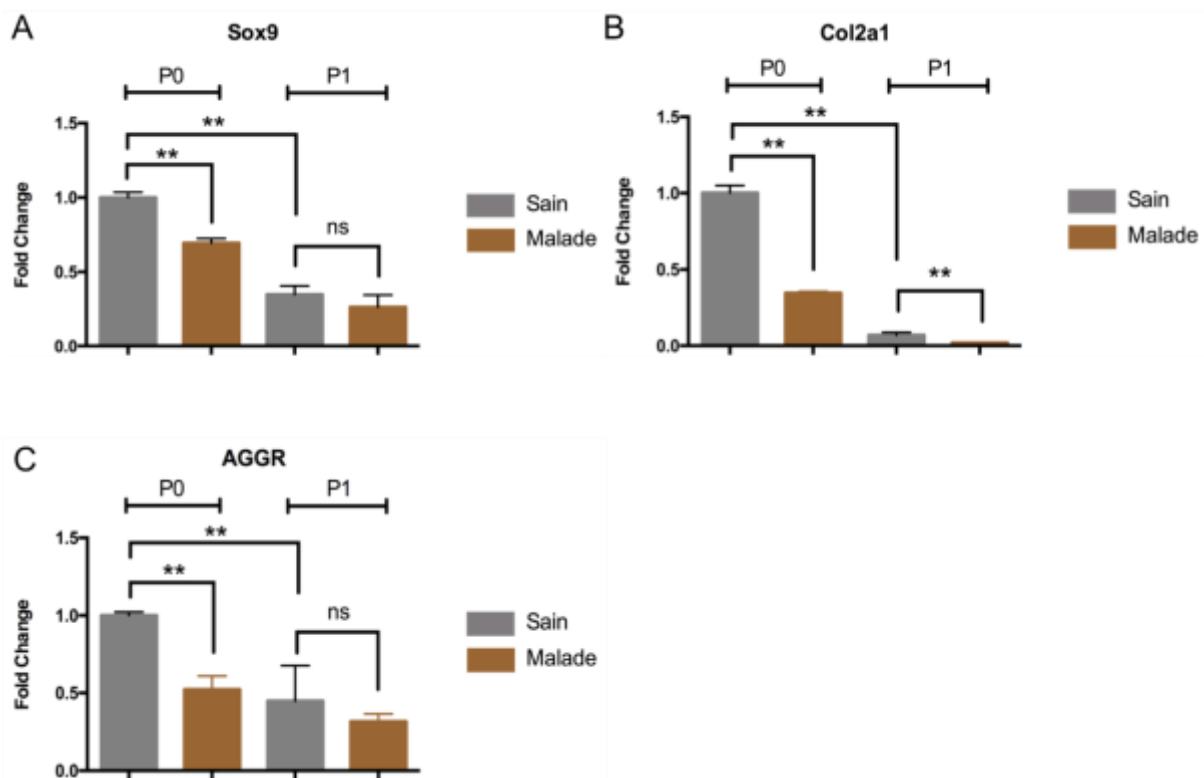


Figure 21 Expression de différents marqueurs chondrocytaires, selon le passage et la zone de prélèvement du cartilage. A) Sox9 ; B) Col II ; C) Agrécane. Les résultats sont exprimés en changement relatif d'expression par rapport à la zone saine. Dans les graphiques, est représentée la valeur moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences réalisées en 2 prélèvements indépendants par PCR quantitative en temps réel. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; ns : non significatif.

3) Ensuite, trois cartilages articulaires ont été utilisés pour évaluer l'effet de la pression d'oxygène. Nous avons trouvé que l'hypoxie (2% O<sub>2</sub>) permet de mieux maintenir les expressions de marqueurs chondrocytaires en comparaison avec la normoxie (20% O<sub>2</sub>) (Figure 22).

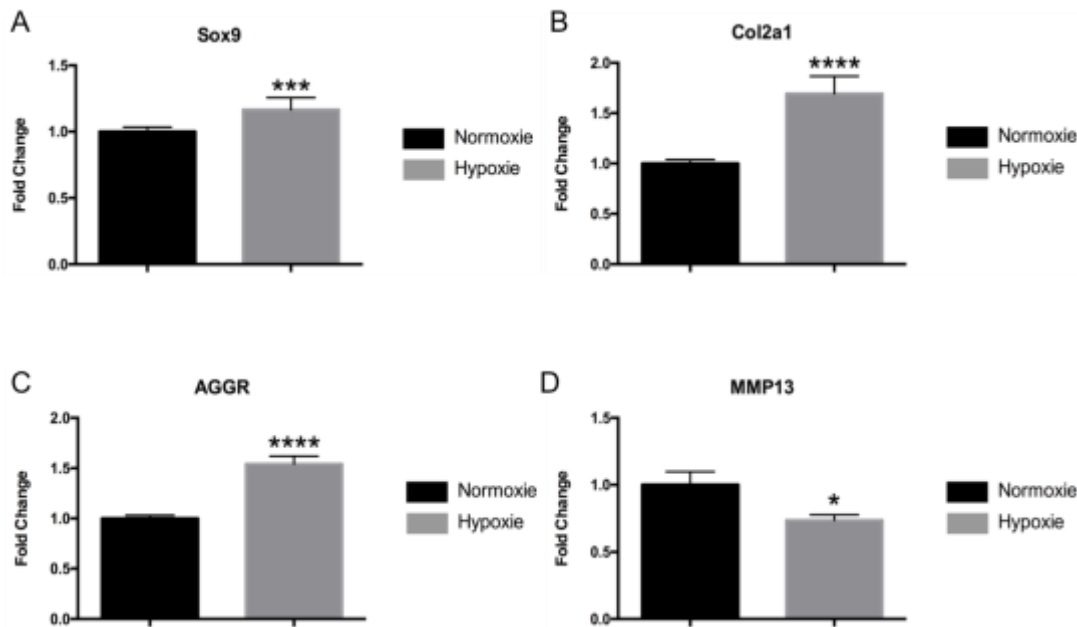


Figure 22 Expression de différents marqueurs chondrocytaires de la zone relativement saine en condition de normoxie et hypoxie. A) Sox9 ; B) Col II ; C) Aggrécane ; D) MMP13. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression par rapport à normoxie. Dans les graphiques, est représentée la valeur moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences réalisées en 3 prélèvements indépendants par PCR quantitative en temps réel. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,0005$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$

Après optimisation des conditions de culture, les chondrocytes maintiennent une morphologie chondrocytaire bien caractéristique par observation sous un microscope (DMI 3000B, Leica) (Figure 23).

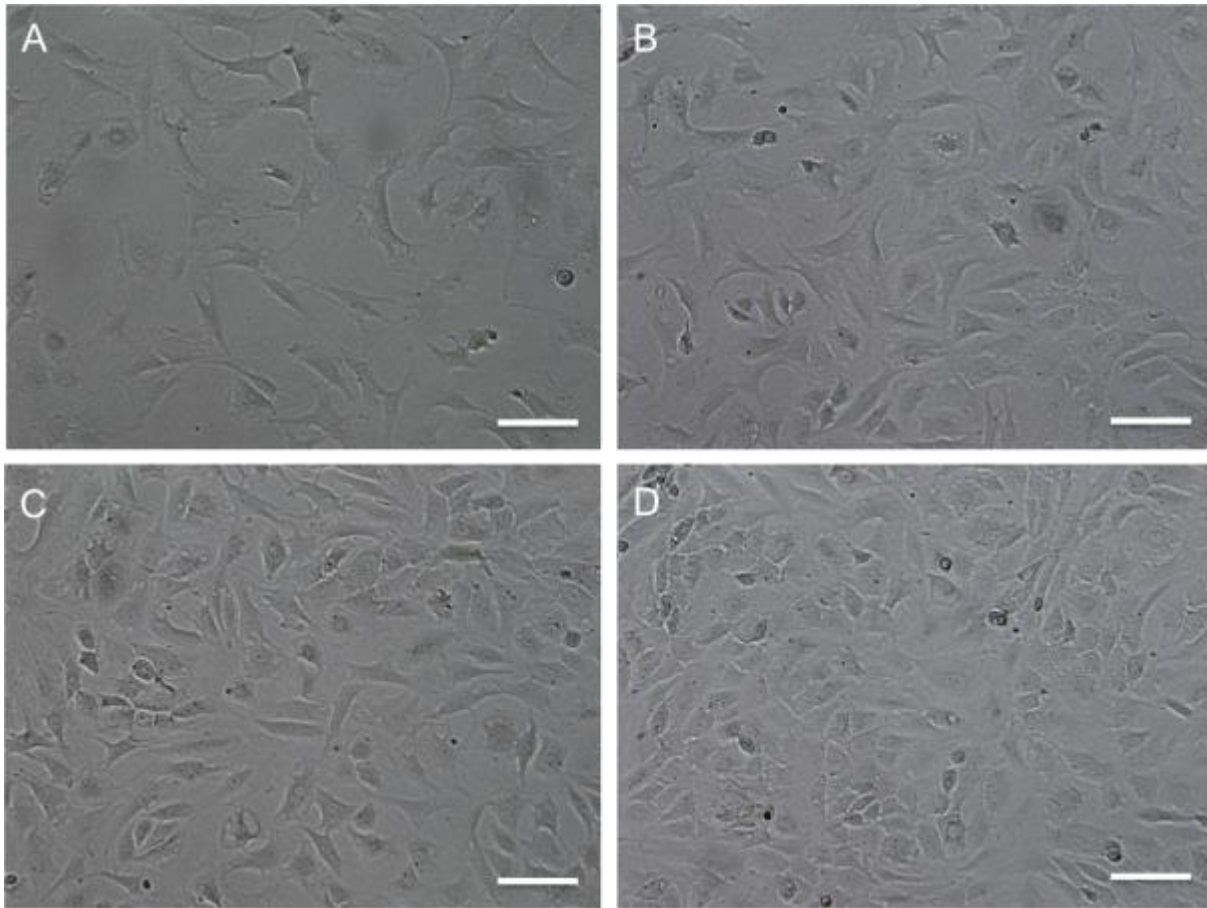


Figure 23 Observation au microscope optique de chondrocytes humains arthrosiques après optimisation des conditions de culture. A) 3<sup>ème</sup> jour ; B) 5<sup>ème</sup> jour ; C) 7<sup>ème</sup> jour ; D) 9<sup>ème</sup> jour. Observation à l'objectif x10. La barre d' échelle représente 100 µm.

### **3. La nicotine n'a pas d'effet sur la prolifération de chondrocytes humains arthrosiques**

L'addition de 0,1, 0,5, et 5 µM de nicotine ne provoque pas de différence significative concernant la prolifération cellulaire par rapport au groupe témoin (Figure 24).

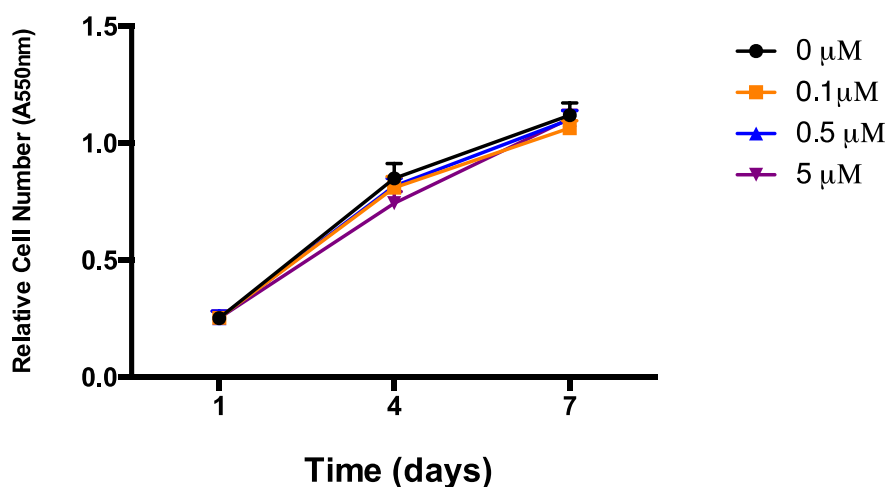


Figure 24 Prolifération cellulaire des chondrocytes humains arthrosiques en présence de concentrations croissantes de nicotine. La prolifération est analysée au 1<sup>er</sup>, 4<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> jour. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart type (n = 3).

#### 4. La nicotine n'a pas d'effet sur le sécrétome des chondrocytes humains arthrosiques

Pour l'analyse protéomique du sécrétome, les chondrocytes sont obtenus à partir de trois patients. Les cellules sont traitées avec 0,1, 0,5, et 5,0  $\mu$ M nicotine (N=3) et comparées avec des cellules provenant du même donneur dans des conditions sans nicotine. L'analyse comparative des sécrétomes montre l'identification de nombreuses protéines dont le taux d'expression n'est pas significativement modifié par la nicotine (Figure 25). La raison est probablement liée à une grande variation interindividuelle. De plus, nous n'avons pas pu identifier dans le sécrétome des protéines marqueurs comme Col II ou MMP13.

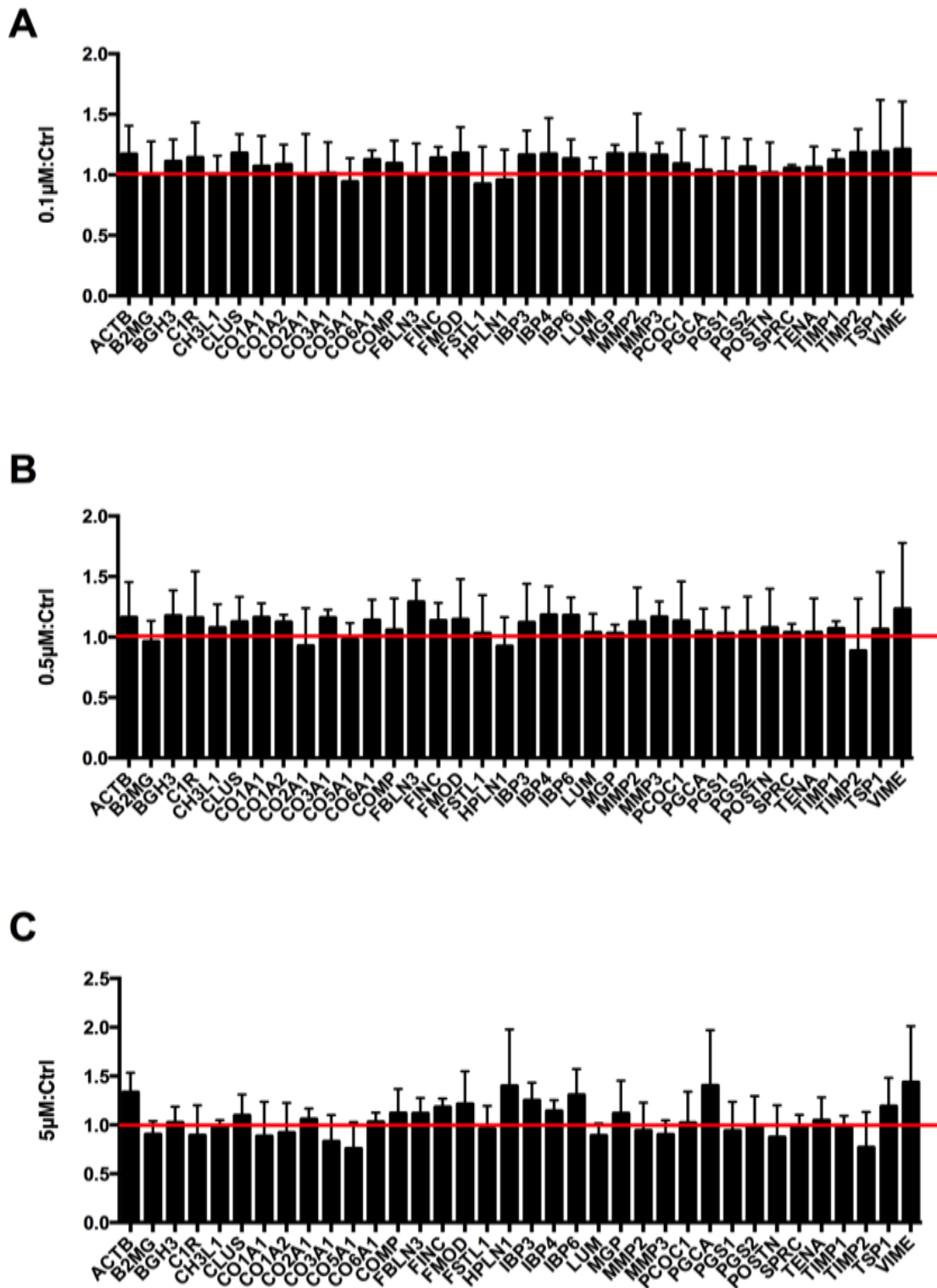


Figure 25 Modulation des niveaux de sécrétion de protéines individuelles lors d'un traitement par différentes concentrations de nicotine. Les protéines sont annotées avec leur nom abrégé dans la banque Swissprot® et répertoriées par l'augmentation facteur de variation. (A), Nicotine 0,1 μM vs contrôle, (B), Nicotine 0,5 μM vs contrôle, (C), Nicotine 5 μM vs contrôle. Contrôle: chondrocytes arthrosiques sans nicotine. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type (n = 3).



## **5. Effet de la nicotine sur l'expression de l'ARNm de marqueurs de différenciation / dédifférenciation chondrocytaire**

L'expression de marqueurs de différenciation chondrocytaire (Sox9, Col2a1, Agrécan) ou de dédifférenciation chondrocytaire (ColX, MMP13) est déterminée par PCR quantitative en temps réel au point de confluence sur des prélèvements de cartilage articulaire issus de 23 patients. Aucun effet n'est observé sur l'expression de Sox9 et Col2a1 dans les chondrocytes arthrosiques avec toutes les concentrations de nicotine utilisée, par rapport au groupe témoin (Figure 26.A-B). Cependant, il y a une faible augmentation de l'expression d'agrécan à la concentration de 0,1  $\mu$ M et 5  $\mu$ M de nicotine. Cette différence d'augmentation est significative (Figure 26.C). Au niveau de l'expression de marqueurs dédifférenciation, nous avons trouvé que la nicotine induit l'augmentation de l'expression de MMP13. Cet effet est dose-dépendant (Figure 26.E), et l'expression de ColX à 0,1  $\mu$ M de nicotine est augmentée par rapport au témoin (Figure 26.D).

De plus, nous avons trouvé qu'il y avait une grande variation inter-individuelle, les données concernant le tabagisme de 13 patients sont collectées, divisées en deux groupes, les fumeurs et les non-fumeurs, et nous avons comparé l'expression de ces marqueurs entre les fumeurs et les non-fumeurs. L'expression de l'ARNm de Sox9, Col2a1, et Agrécan est augmentée dans le groupe des fumeurs (Figure 27.A-C). Cependant, l'expression de MMP13 est quand même plus élevée chez les fumeurs (Figure 27.D).

En conclusion, la nicotine induit une augmentation de l'expression d'ARNm de MMP13 sur les chondrocytes humains arthrosiques. Par contre, il n'y a pas de changements significatifs au niveau des protéines sécrétées. Ces données montrent que la nicotine a un effet catabolique, quoique modéré, sur les chondrocytes humains, en stimulant la dégradation matricielle. De plus, l'expression de marqueurs chondrocytaires et de dégradation matricielle est plus élevée chez les fumeurs.

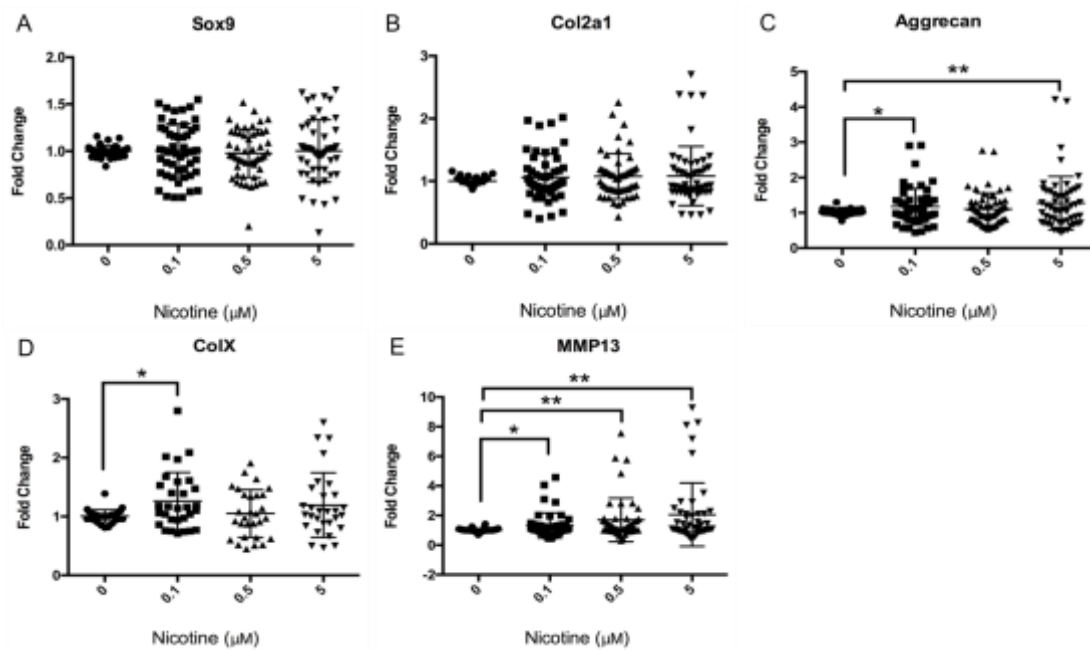


Figure 26 Effet de différentes concentrations de nicotine sur l'expression des marqueurs de différenciation /dédifférenciation chondrocytaires: A) Sox9 ; B) Col II ; C) Agrécan; D) Col X ; E) MMP13. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression par rapport aux témoins (non fumeurs). Dans les graphiques est indiquée la valeur moyenne  $\pm$  écart-type de 23 expériences (23 patients) réalisées en triple pour la PCR quantitative en temps réel. Les statistiques sont calculées par rapport au groupe sans nicotine. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$

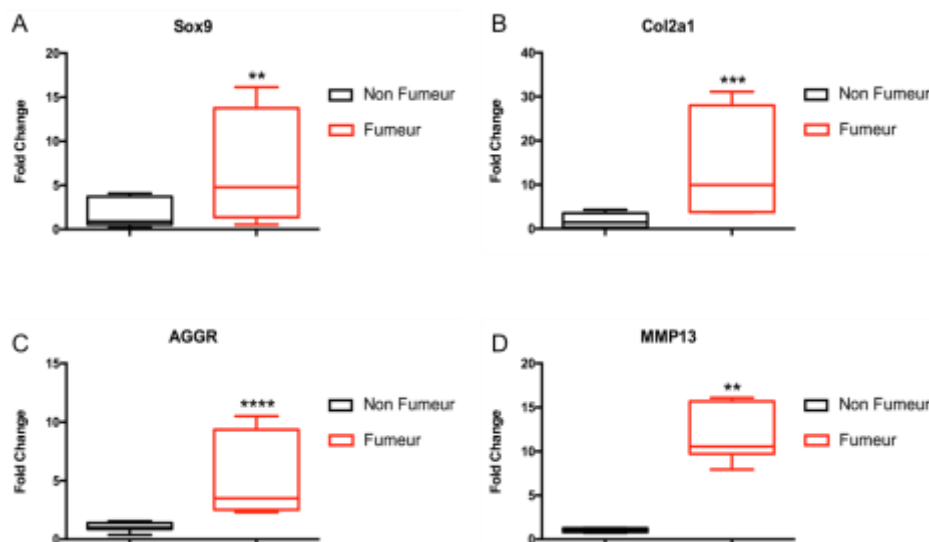


Figure 27 Analyse des marqueurs de différenciation/dédifférenciation des fumeurs contre les non-fumeurs par PCR quantitative en temps réel. A) Sox9 ; B) Col II ; C) Agrécan ; D) MMP13. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression à témoin (non-fumeurs). Dans les graphiques est représentée la valeur moyenne  $\pm$  écart-type de tous les patients pour chaque groupe effectué en triple. Les statistiques ont été calculées par rapport au groupe non-fumeurs. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,0005$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$

## 6. Caractérisation phénotypique de CSM-GW

Le phénotype des CS avec des marqueurs de surface caractéristiques des CSM-GW est analysé par cytométrie en flux. Les cellules utilisées pour cette étude sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34, HLA-DR) et positives pour les marqueurs mésenchymateux (CD90, CD73, CD105) (Figure 28).

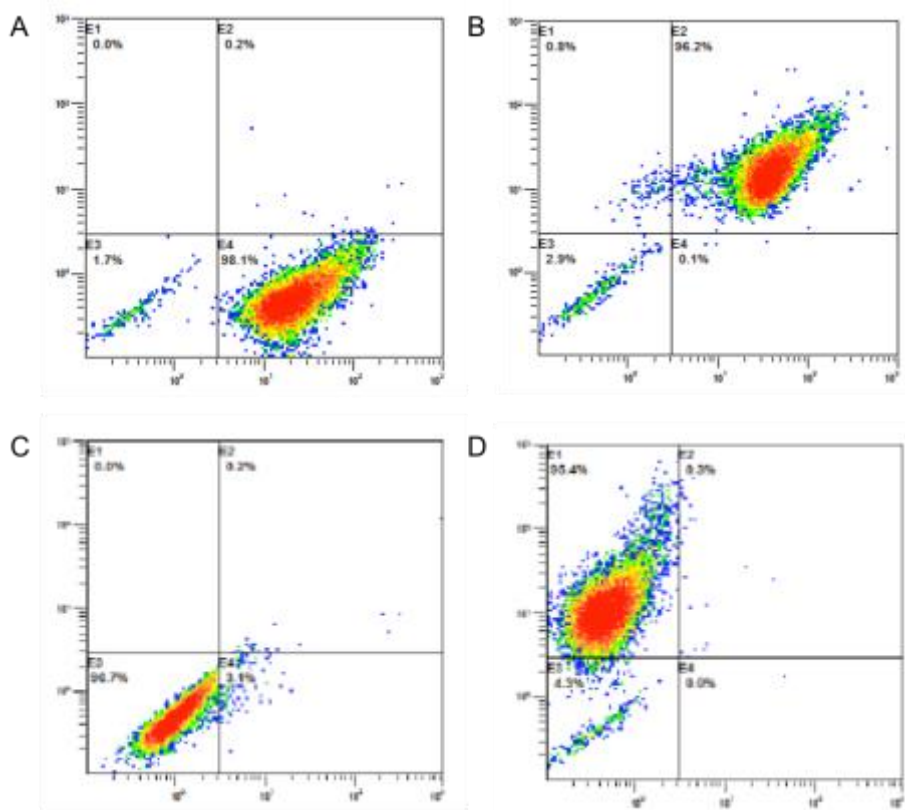


Figure 28 Immunophénotypage de CSM-GW. Les CSM-GW ont été marquées avec des anticorps monoclonaux spécifiques des marqueurs étudiés. A) CD90 FITC - CD34 PE ; B) CD44 FITC – CD105 PE ; C) CD45 FITC ; D) HLA-DR FITC – CD73 PE.

## **7. Capacité de différenciation de CSM-GW**

### **7.1 Etudes histologiques et cellulaires par coloration**

La capacité des différentes voies de différenciation a été appréciée par différentes colorations. Le marquage des vésicules lipidiques au AdipoRed<sup>TM</sup> nous a permis de confirmer la différenciation adipocytaire (Figure 29). Nous constatons que la culture en milieu adipogénique a permis une forte induction de la production de corps lipidiques (Figure 29.A.C : milieu de contrôle ; 29.B.D : milieu adipogénique). La coloration de dépôts calciques en rouge alizarine pour la différenciation ostéogénique (Figure 30), (Figure 30.D) pour mise en évidence la synthèse de dépôt calcique par rapport aux cellules cultivées en milieu de prolifération (Figure 30.C). Concernant la différenciation chondrogénique, les colorations au bleu alcian des PGs et au rouge sirius des collagènes nous ont permis de comparer l'état de différenciation chondrogénique par rapport au groupe témoin en fonction du temps (Figure 31). La culture en milieu de prolifération n'induit pas de synthèse de PGs (Figure 31.C). Le milieu de différenciation induit une forte synthèse de PGs, comme constaté grâce à l'intensité et le pourcentage de la coloration bleue (Figure 31.D&E). Aussi la quantité des collagènes est augmentée en regardant la coloration rouge sirius (Figure 31.G&H) comparé au contrôle (Figure 31.F).

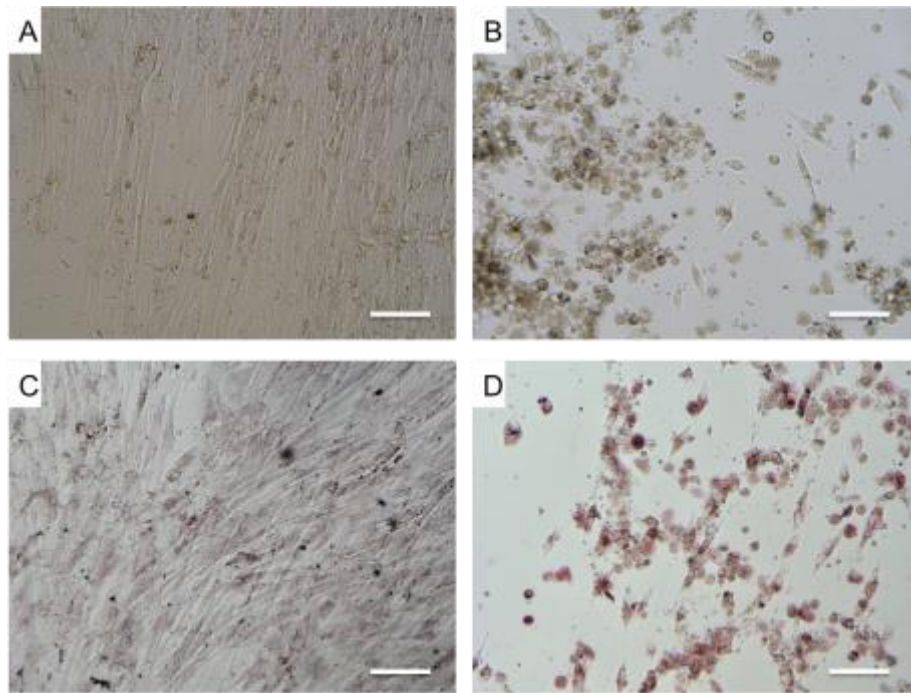


Figure 29 Coloration des lipides au AdipoRed™ pour apprécier la différenciation en adipocytes des cellules en monocouche. (A-B), Les cellules cultivées avant la coloration ; (C-D), Après la coloration ; (A,C), Contrôle ; (B,D), Différenciation adipocytaire. La barre représente 100 µm.

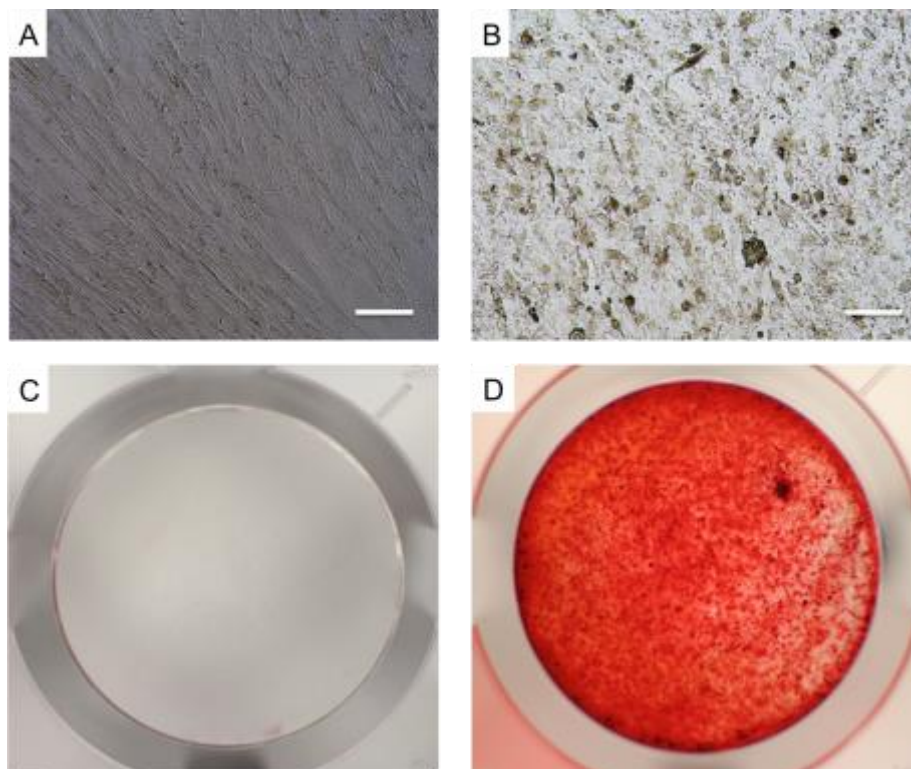


Figure 30 Coloration au rouge alizarine pour apprécier la différenciation ostéogénique des cellules en monocouche (plaque 48 puits). A,C) Contrôle ; B,D) Différenciation ostéogénique ; A,B) Après 21 jours de culture, avant la coloration. La barre représente 100 µm, observation à l'objectif x10; C,D) Après la coloration.

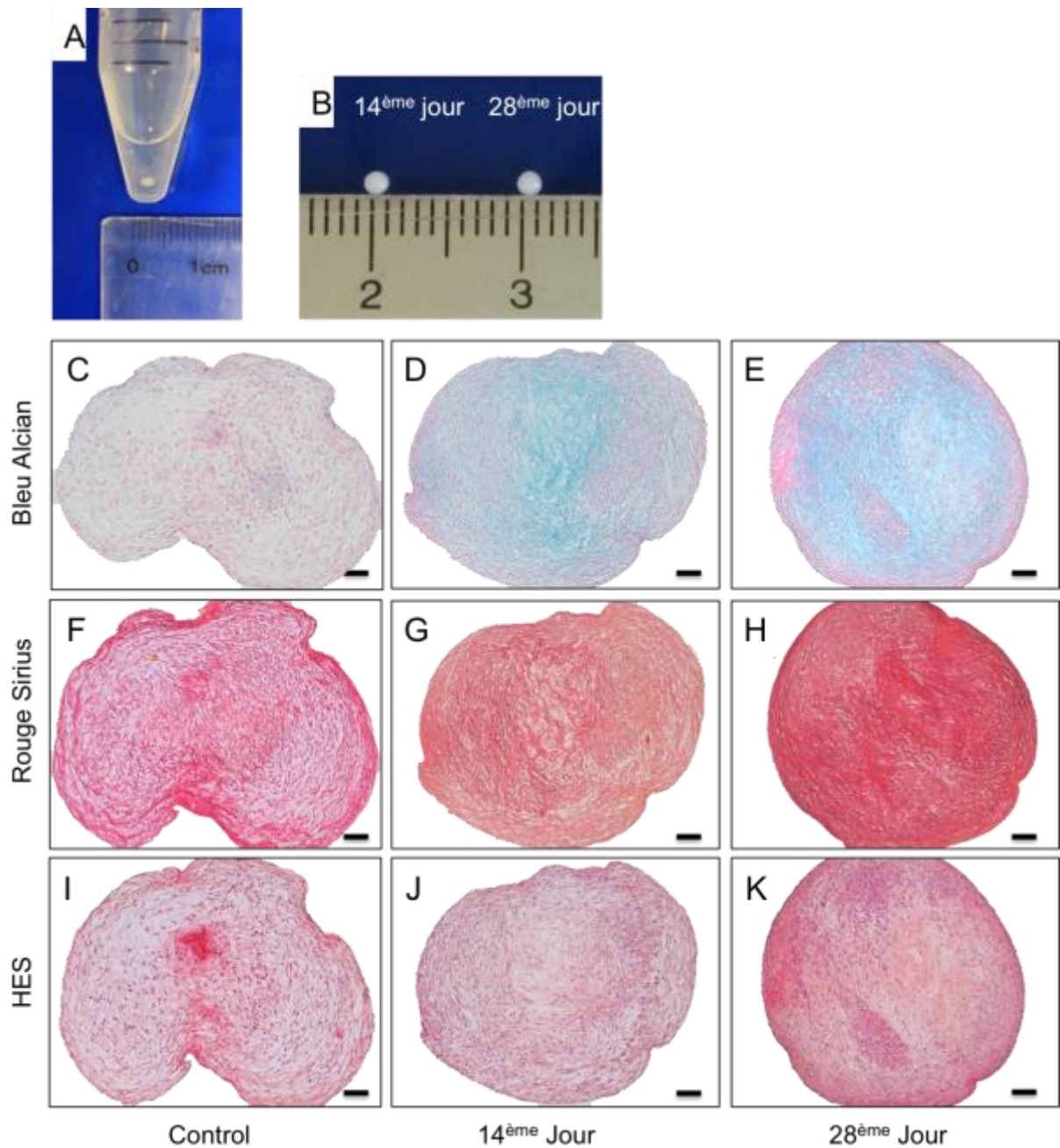


Figure 31 Différenciation chondrogénique des CSM-GW. A & B : Culots en culture ; C, D & E : Marquage des protéoglycanes au bleu alcian sur des coupes de culots. F, G & H : Marquage des collagènes au rouge sirius sur des coupes de culots pour l'évaluation de la différenciation chondrogénique. I, J & K : HES sur des coupes de culots. La barre d'échelle représente 100µm, observation à l'objectif x10.

## **7.2 Mesure de l'expression de marqueurs de la différenciation chondrogénique**

Les cellules sont cultivées en culots dans un milieu connu pour induire un engagement vers la voie de différenciation chondrogénique. Un témoin négatif est réalisé en cultivant les culots dans un milieu de prolifération neutre. L'expression d'ARNm marqueurs de la différenciation chondrogénique (Sox9, Col II, Agrécan, Xylosyltransférase (XT-1) et  $\beta$ 1,3-glucuronosyl transférase 1 (GlcAT1)) est présentée dans la Figure 32. En parallèle, la mesure de l'expression de protéines a été faite par western blot (Figure 32.B).

La culture en culots dans un milieu de différenciation provoque une augmentation du taux d'ARNm de Sox9, de Col II, de l'Agrécan, de XT-1 et de GlcAT1 en comparaison au témoin cultivé sans milieu de différenciation. Les résultats de western blot ont montré une augmentation de Sox9 et de procollagène II, cette augmentation est plus importante concernant le pro-collagène II.



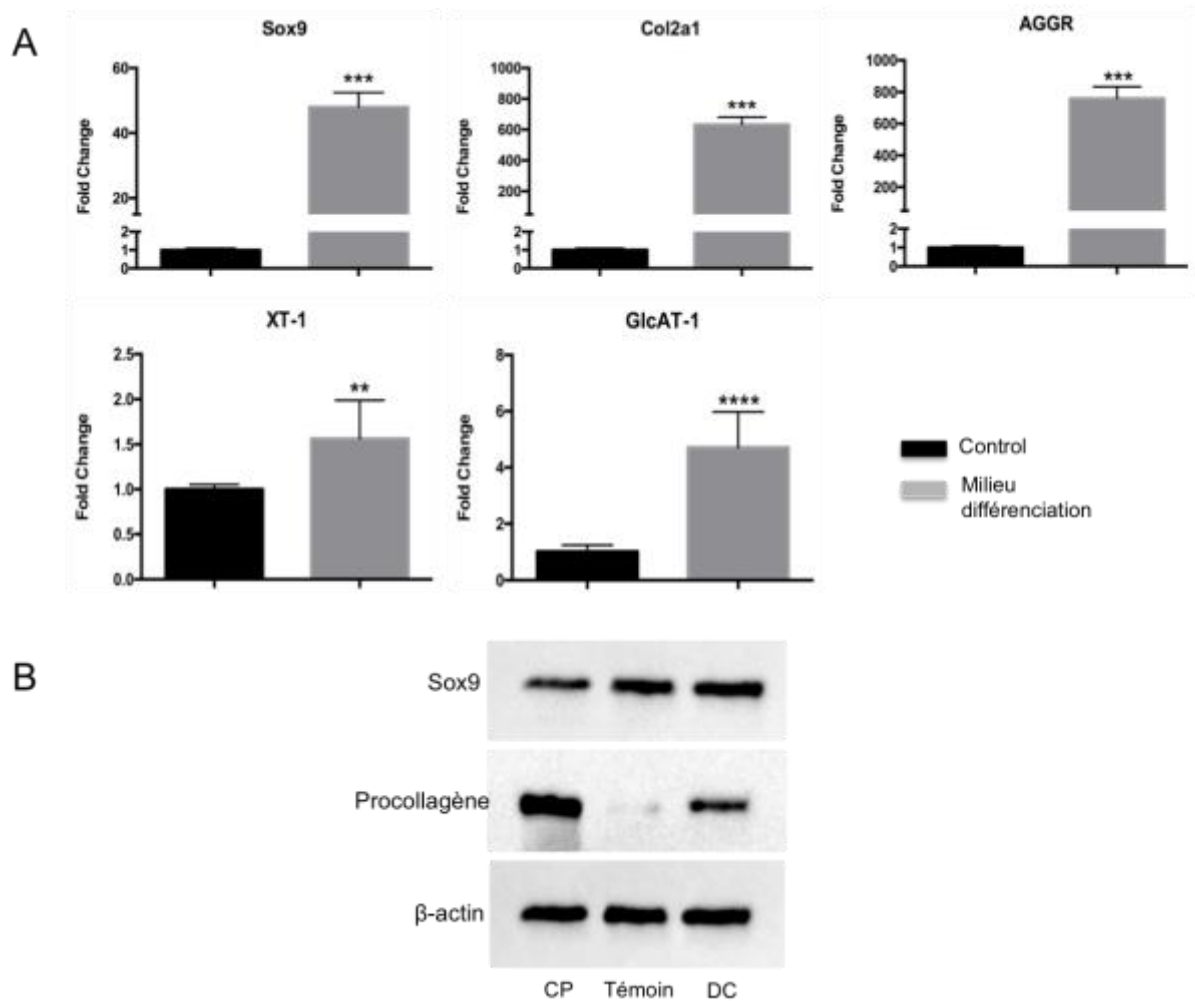


Figure 32 Différenciation de CSM-GW vers la voie chondrogénique. A). L'expression en ARNm de Sox9, Col II, Agrécan, XT-1 et GlcAT1 est mesurée par PCR quantitative en temps réel, pour des CSM-GW différenciées et cultivés en culots avec ou sans milieu de différenciation. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression par rapport au témoin. Dans les graphiques est représentée la valeur moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=3$ . \*\* $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,0005$ . B). L'expression en protéines de marqueurs chondrocytaires est mesurée par western blot. CP : Contrôle positif, chondrocyte humain ; DC : Différenciation Chondrogénique.



## 8. La prolifération de CSM-GW est diminuée par la nicotine

La prolifération de CSM-GW est examinée après traitement par différentes concentrations de nicotine, et analysée au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, et 6<sup>ème</sup> jour. La prolifération cellulaire estimée par la valeur de l'absorbance est significativement diminuée dans le groupe nicotine dès une période de 3 jours (Figure 33), et cet effet est dose-dépendant.

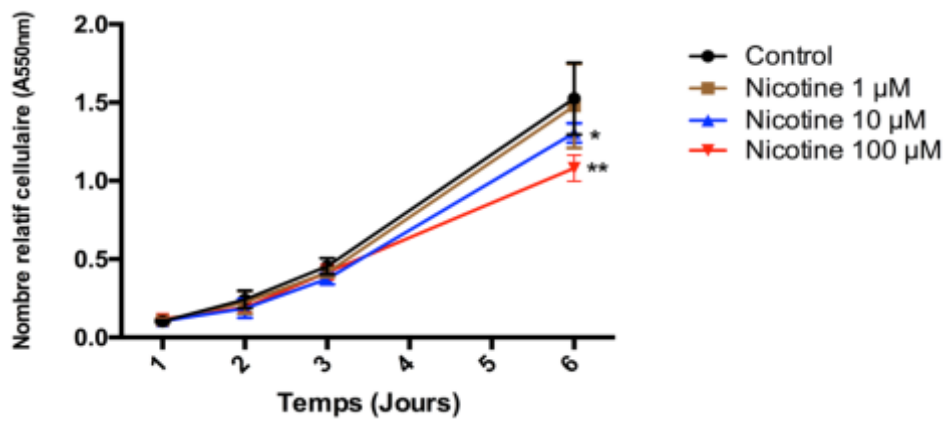


Figure 33 Effet de la nicotine sur la prolifération cellulaire des CSM-GW. La prolifération cellulaire est analysée par le test MTT au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, et 6<sup>ème</sup> jour. Le nombre de cellule (mesure de l'absorbance) est diminué par la nicotine par rapport au groupe témoin. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type (n = 3). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  par rapport au contrôle par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney).

## 9. La nicotine n'a aucun effet sur la viabilité des CSM-GW

La viabilité cellulaire, l'apoptose et la nécrose de CSM-GW sont analysées après traitement avec 1  $\mu\text{M}$  nicotine (Figure 34). Les cellules nécrotiques et apoptotiques sont marquées avec de l'IP et de l'annexine V-Alexa 488, respectivement. La viabilité est exprimée en pourcentage de cellules vivantes (Figure 34.C). Il n'y a aucune différence significative de la viabilité entre groupe témoin (Figure 34.A) et celle du groupe de nicotine (Figure 34.B). Ainsi, à la concentration utilisée, la nicotine n'induit pas de modification significative de la viabilité cellulaire, l'apoptose et la nécrose.

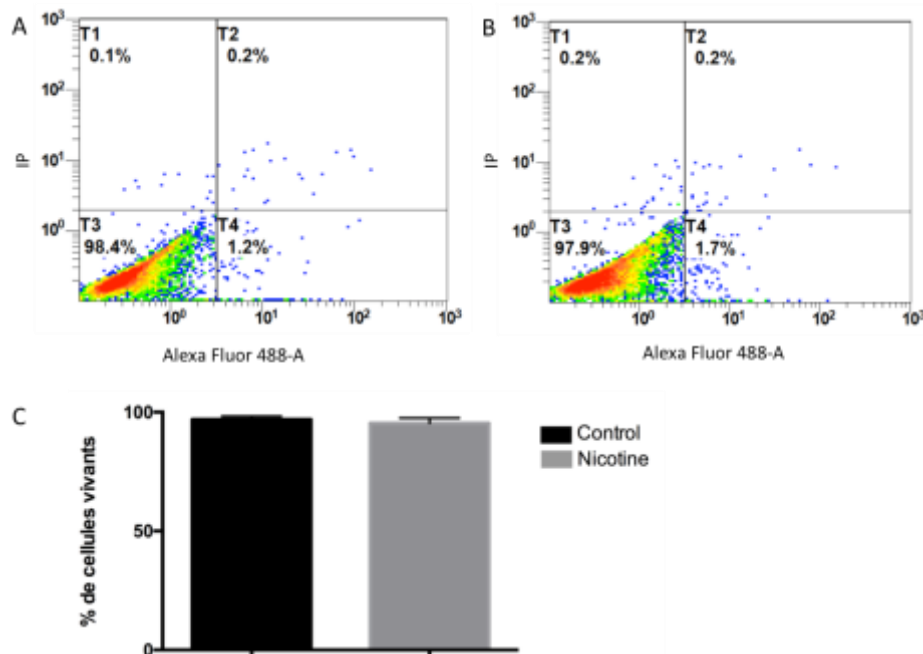


Figure 34 Effet de la nicotine sur la viabilité des CSM-GW. Les cellules sont traitées par 1  $\mu\text{M}$  de nicotine jusqu'à confluence et leur viabilité est estimée par cytométrie en flux. Les cellules nécrotiques et apoptotiques sont marquées avec de l'iodure de propidium et annexine V-Alexa 488, respectivement. La nicotine n'a pas altéré la viabilité des cellules dans la concentration utilisée. (A), la viabilité des cellules du groupe témoin (sans nicotine); (B), la viabilité des cellules du groupe de nicotine; (C), la viabilité cellulaire évaluée entre les deux groupes est exprimée par le pourcentage de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type (n=3).

## 10. La migration cellulaire de CSM-GW est diminuée par la nicotine

La migration cellulaire de CSM-GW en présence des différentes concentrations de nicotine est évaluée par le wound healing test. Les résultats montrent que la nicotine inhibe la migration, et que cet effet est dose-dépendant (Figure 35).

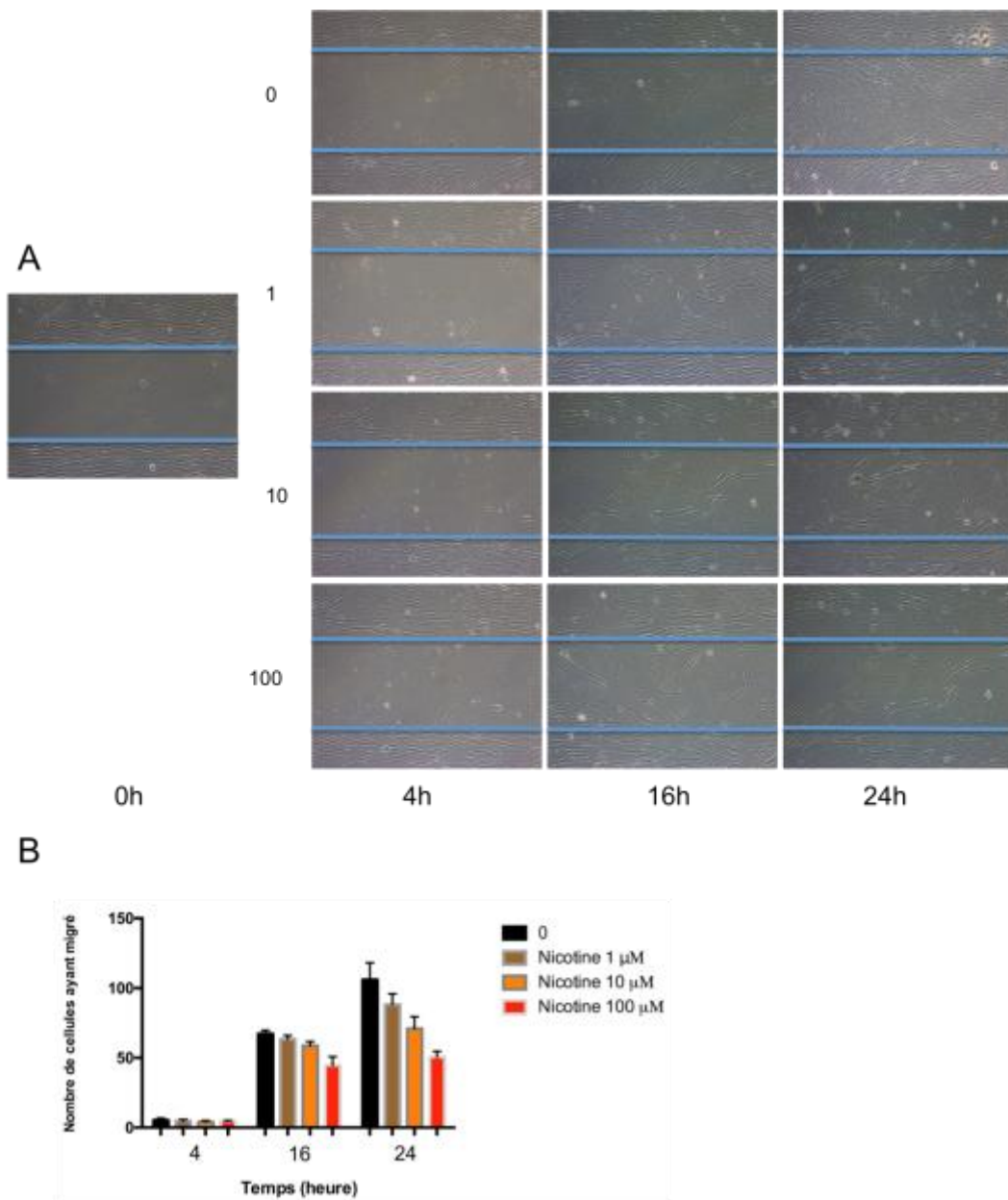


Figure 35 Effet de la nicotine sur la migration cellulaire de CSM-GW. La migration cellulaire est analysée par le wound healing test à la 4<sup>ème</sup>, 16<sup>ème</sup>, et 24<sup>ème</sup> heure. A), Les photos des différents groupes sont prises à l'objectif x10. B), Le nombre de cellules ayant migré est diminué par la nicotine par rapport au groupe témoin, et cet effet est dose-dépendant. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type (n = 3).

## 11. L'expression de marqueurs chondrogénique est diminuée par la nicotine pendant la prolifération

L'expression génique des marqueurs chondrogénique (Sox9, Col2a1, et Agrécane) de CSM-GW en prolifération traités par différentes concentrations de nicotine pendant 24h est évaluée par PCR quantitative en temps réel. Nous avons trouvé que l'expression de Sox9, de Col2a1, et de l'Agrécane est diminuée par les différentes concentrations de nicotine (Figure 36.A-C), cet effet est dose-dépendant. En outre, nous avons traité les CSM-GW par 100  $\mu$ M nicotine en fonction du temps. Les résultats montrent que l'effet délétère de la nicotine est temps-dépendant (Figure 36.D-F).

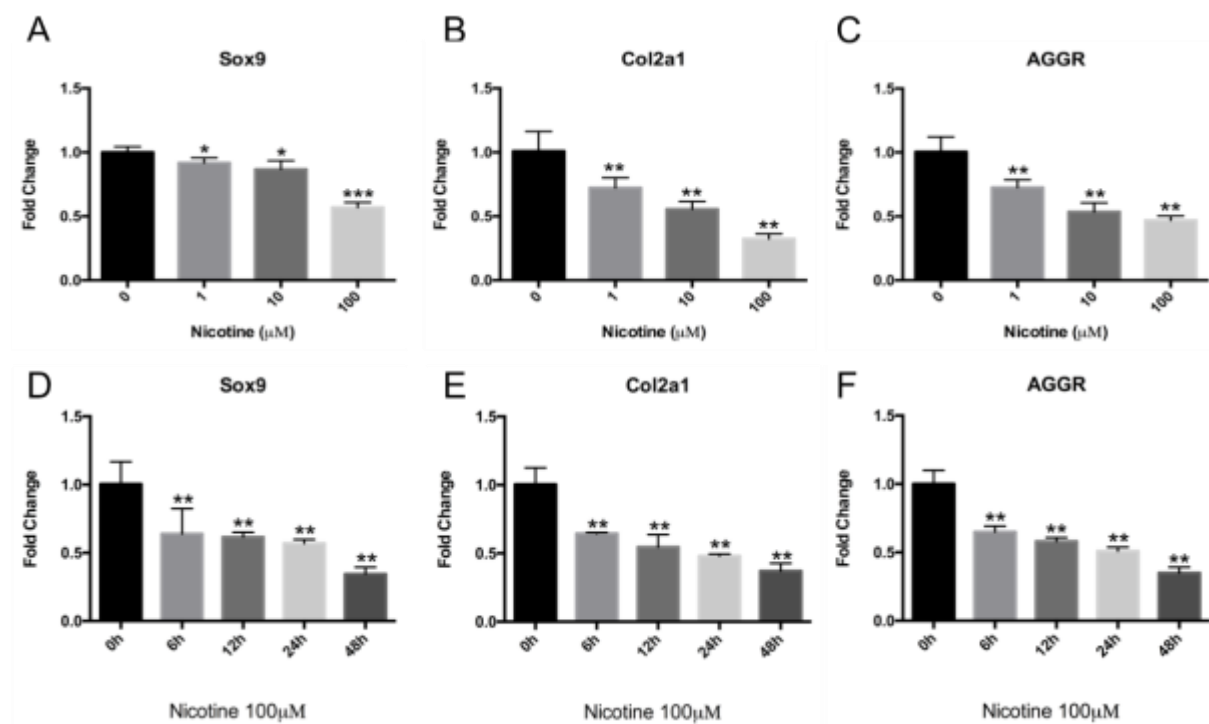


Figure 36 Analyse de marqueurs chondrogéniques de CSM-GW pendant la prolifération cellulaire par PCR quantitative en temps réel. (A-C), les CSM-GW culture en présence des différentes concentrations de nicotine (0, 1, 10, 100  $\mu$ M) pendant 24h : A), Sox9 ; B), Col2a1 ; C), Agrécane ; (D-E), les CSM-GW sont traitées par 100  $\mu$ M nicotine pendant différents temps (6, 12, 24, 48 h) : D), Sox9 ; E), Col2a1 ; F), Agrécane. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression par rapport au témoin. Dans les graphiques est représentée la moyenne  $\pm$  SD pour tous les échantillons dans chaque groupe effectué en triple exemplaire. N = 3. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,0005$ , par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney).

## **12. La capacité de différenciation chondrogénique de CSM-GW est détériorée par la nicotine**

La différenciation chondrogénique des CSM-GW en présence des différentes concentrations de nicotine est évaluée par l'expression génique de marqueurs chondrogéniques, Sox9, Col2a1, Agrécane, XT-I, et GlcAT-1 (Figure 37.A-E), un marqueur chondrocytaire hypertrophique Runx2 (Figure 37.F), et un marqueur pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  (Figure 37.G). Après la culture dans milieu de différenciation chondrogénique supplémenté avec différentes concentrations de nicotine pendant 28 jours, l'expression de Sox9, de Col2a1, de l'Agrécane, de XT-1 et de GlcAT-1 est moins élevée par rapport au groupe témoin sans nicotine (Figure 37.A-E) et cet effet est dose-dépendant. Cependant, la nicotine a induit une augmentation de l'expression de Runx2 (Figure 37.F) et IL-1 $\beta$  (Figure 37.G). Cet effet est dose-dépendant.

En outre, nous avons constaté qu'après 28 jours de différenciation chondrogénique, la nicotine induit une diminution d'expression protéique de procollagène II, et cet effet est dose-dépendant (Figure 37.H).

De plus, la teneur en PGs colorées par le bleu alcian est diminuée dans le groupe de nicotine traité par rapport au groupe témoin (Figure 38.A-D, N), ce qui suggère que la nicotine peut altérer la synthèse des PGs des CSM-GW. Ainsi, il y a une diminution du taux de collagènes totaux coloré par rouge sirius à partir de 10  $\mu$ M de nicotine (Figure 38.E-H, O). Cependant, il n'y a pas de différence au niveau de la taille des culots entre les groupes (Figure 38.M).

En conclusion, la nicotine aux concentrations utilisées inhibe la prolifération et la migration cellulaire de CSM-GW. De plus, la nicotine a un effet délétère sur la différenciation chondrogénique des CSM-GW, ce qui indique que la nicotine inhibe la différenciation chondrogénique, induit la réaction inflammatoire et stimule la différenciation hypertrophique.

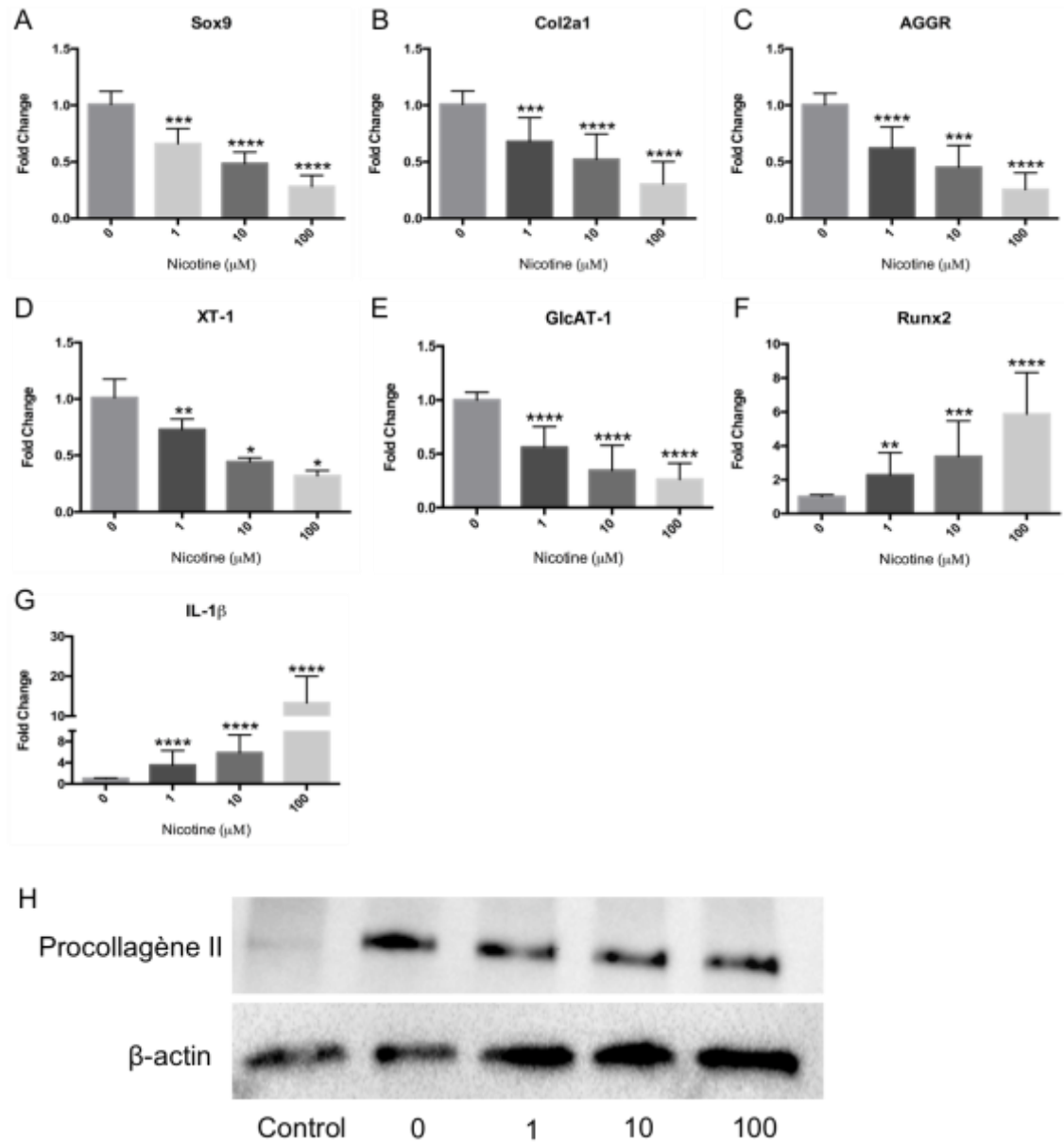


Figure 37 Analyse de la chondrogenèse après 28 jours de différenciation chondrogénique en présence des différentes concentrations de nicotine par PCR quantitative en temps réel et western blot. A), Sox9 ; B), Col2a1 ; C), Agrécane ; D), XT-1 ; E) GlcAT-1 ; F), Runx2 ; G), IL-1β. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression par rapport au témoin (sans nicotine). Dans les graphiques est représentée la moyenne  $\pm$  SD pour tous les échantillons dans chaque groupe effectué en triple exemplaire. N = 3. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,0005$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$  par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney). H). Expression protéique du procollagène II en présence des différentes concentrations de nicotine. Contrôle : CSM-GW non différenciées.

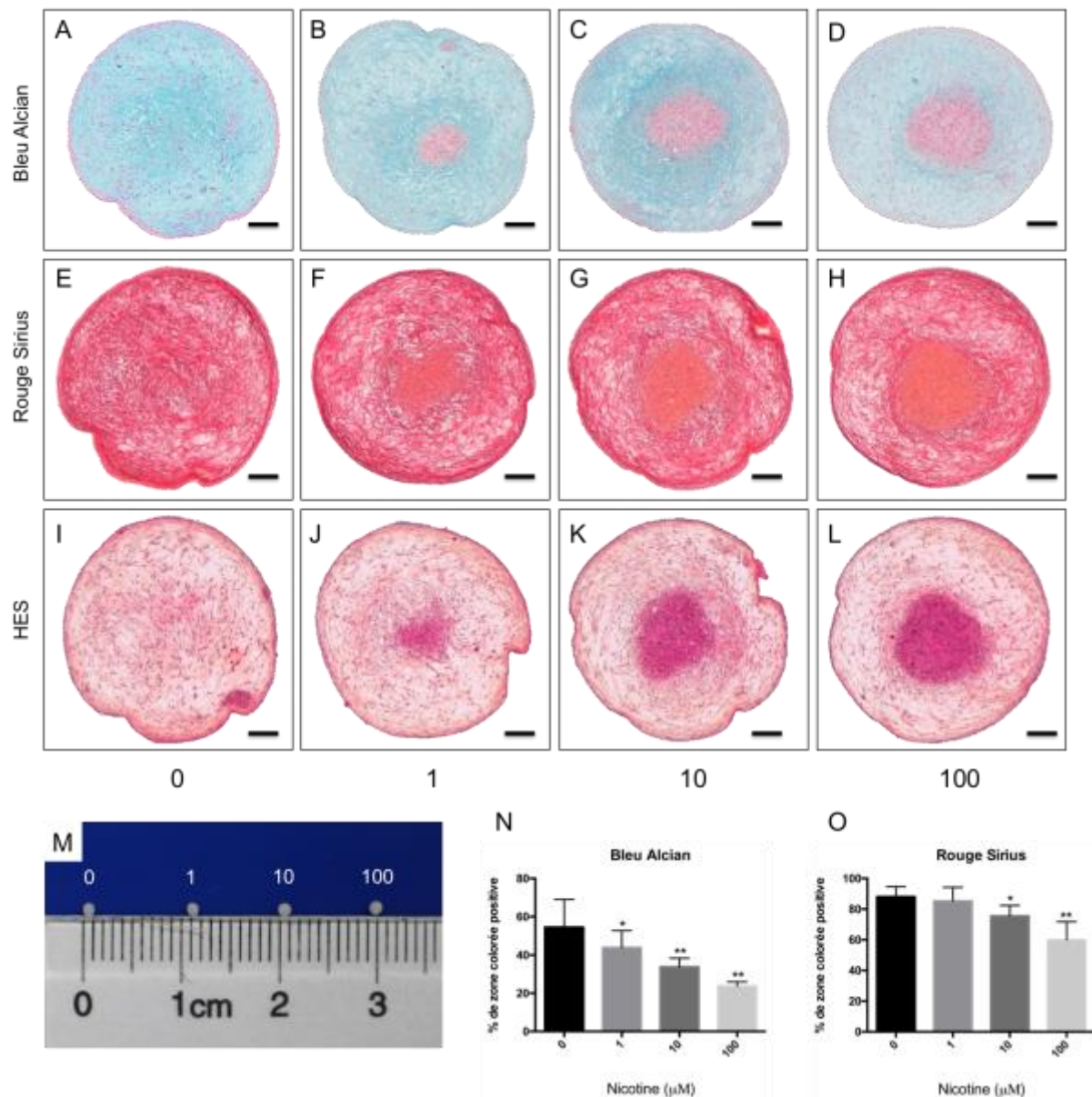


Figure 38 Analyse histologique de la différenciation chondrogénique après traitement par différentes concentrations de nicotine. (A-D), bleu alcian ; (E-H), rouge sirius ; (I-L), HES. A, H, I : sans nicotine ; B, F, J : 1 µM nicotine ; C, G, K : 10 µM nicotine ; D, H, L : 100 µM nicotine. La barre d'échelle noire représente 200 µm. (M), Les culots après 28 jours de culture. (N-O), La semi-quantification de coloration par le bleu alcian et le rouge sirius est effectuée et exprimée en pourcentage de la zone colorée positive et comparée entre le témoin et le groupe traité à la nicotine.  $N > 3$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney).

### **13. L' $\alpha 7$ nAChR est exprimé par les CSM-GW et est fonctionnellement actif par la stimulation de la nicotine**

Nous avons examiné l'expression de plusieurs sous-unités nAChRs ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 4$ ) au niveau de l'ARNm dans les CSM-GW (Figure 39.A). Les tailles de produits de PCR à partir des amorces présentées dans le Tableau 8 pour  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ , et  $\beta 4$  sont 305bp, 644bp, 169bp, 322bp, 292bp, et 306bp, respectivement. Des produits de RT-PCR de taille correcte pour les sous-unités  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ , et  $\beta 4$  sont détectés dans les CSM-GW. Les formes  $\alpha 3$  et  $\alpha 7$  sont exprimées majoritairement. Au contraire, l'expression de  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ , et  $\beta 4$  est beaucoup plus faible (Figure 39.A).

Étant donné que l' $\alpha 7$  nAChR joue un rôle important dans les CSM et est exprimé majoritairement dans les CSM-GW, les études suivantes se sont concentrées sur la fonction de l'homopolymère  $\alpha 7$ . Nous avons vérifié la présence de l' $\alpha 7$  nAChR au niveau protéique par western blot (Figure 39.B), le résultat montre que  $\alpha 7$  nAChR est bien exprimé dans les CSM-GW (Figure 39.B). De plus, nous avons détecté l'expression de l' $\alpha 7$  nAChR par immunofluorescence (Figure 40). Nous avons montré que l' $\alpha 7$  nAChR est présent sur une grande majorité de CSM-GW et est réparti sur la surface cellulaire.

La nicotine est un agoniste de l' $\alpha 7$  nAChR qui est un canal ionique calcique. L'activité fonctionnelle de l' $\alpha 7$  nAChR peut être mesurée par la détection de l'influx de calcium. Nous avons constaté que la fluorescence relative est significativement augmentée en présence de 1  $\mu\text{M}$  de nicotine suggérant que le calcium est transporté dans des cellules traitées par la nicotine (Figure 41). Ces résultats suggèrent que l' $\alpha 7$  nAChR est exprimée dans les CSM-GW et qu'il est fonctionnellement actif après stimulation par la nicotine.  $\alpha$ -BTX est une toxine antagoniste spécifique de l' $\alpha 7$  nAChR. Les CSM-GW sont prétraitées par 10 nM de  $\alpha$ -BTX pendant 30 min. Le résultat montre que  $\alpha$ -BTX peut diminuer partiellement l'influx calcique induit par la nicotine (Figure 41)



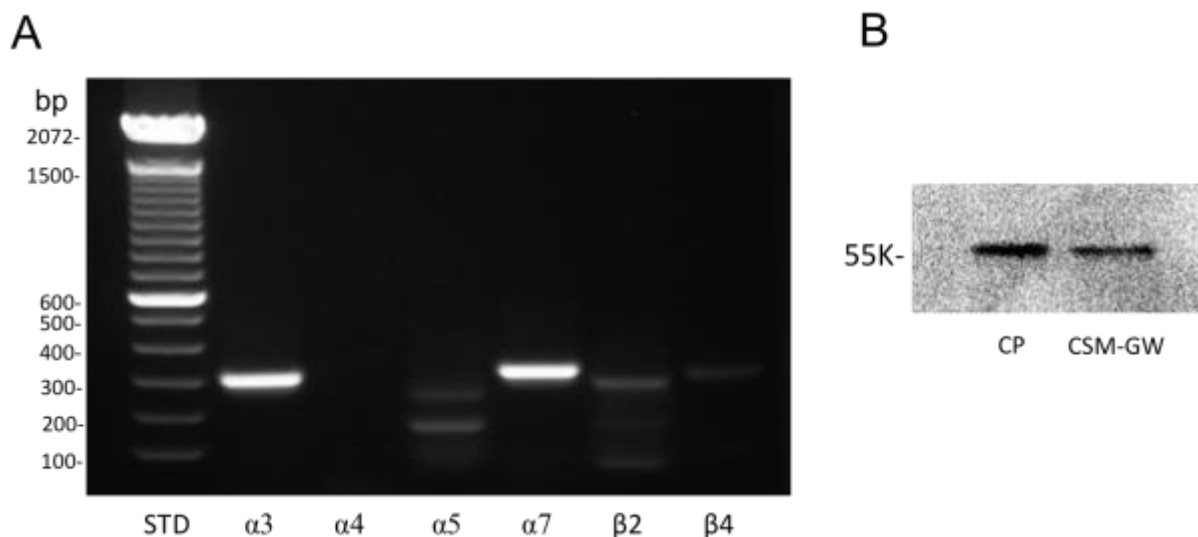


Figure 39 Expression de l' $\alpha 7$  nAChR dans CSM-GW. A), L'expression des différentes sous-unités nAChRs est suivie par RT-PCR. Le électrophorégrammes des produits de RT-PCR montrent des produits de transcription de taille attendue pour les sous-unités  $\alpha 3$  (305bp),  $\alpha 5$  (169bp),  $\alpha 7$  (322bp),  $\beta 2$  (292bp), et  $\beta 4$  (306bp). B), L'expression de l' $\alpha 7$  nAChR au niveau de protéine est suivie par western blot. CP : Contrôle positif – cerveau du rat.

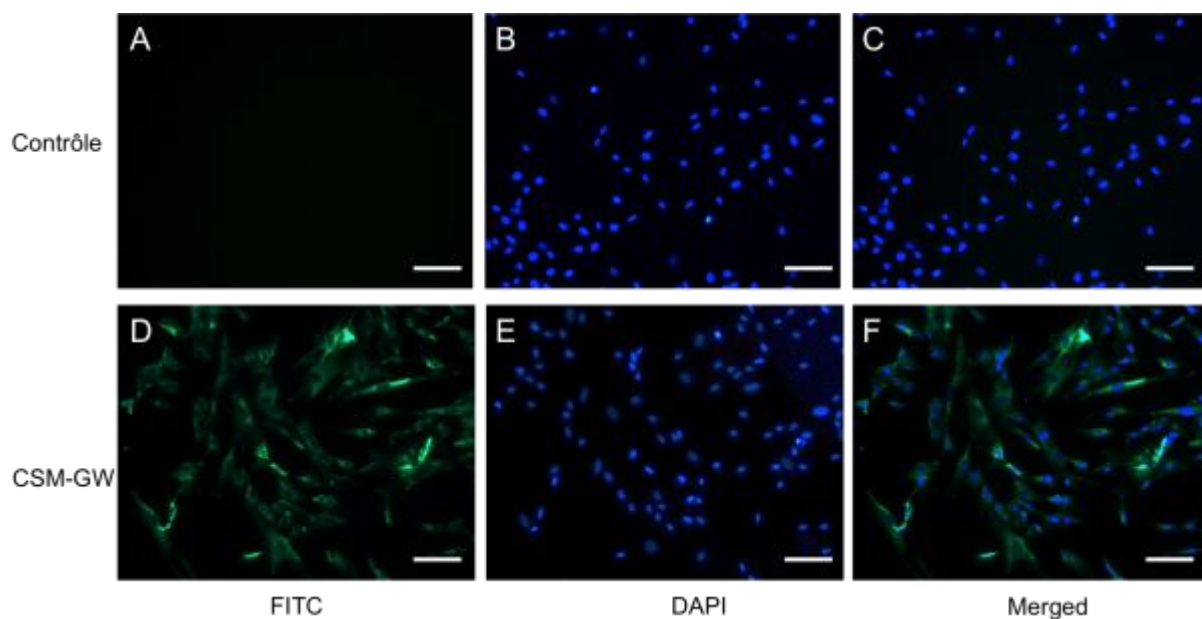


Figure 40 Expression de l' $\alpha 7$  nAChR dans CSM-GW par immunofluorescence. Les noyaux sont colorés avec du DAPI (bleu) (B,E). Pour visualiser la liaison des anticorps spécifiques de l' $\alpha 7$  nAChR, des anticorps secondaires marqués par FITC ont été utilisés (vert) (A,D). Les images fusionnées sont affichées (C,F). Les images sont représentatives de cinq diapositives colorées séparément avec des CSM-GW.

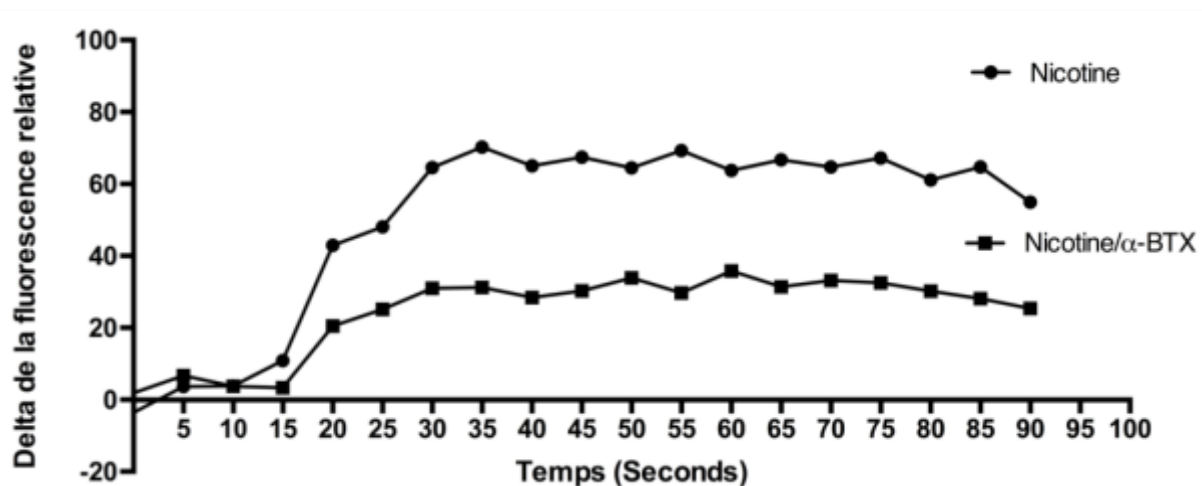


Figure 41 Activité fonctionnelle de l' $\alpha 7$  nAChR dans CSM-GW. L'activité fonctionnelle de  $\alpha 7$  nAChR est déterminée par l'influx de calcium. L'effet de  $1 \mu\text{M}$  de nicotine sur l'influx de calcium dans les CSM-GW est testé par l'essai du calcium Fluo-4NW. Les données sont présentées sous la forme d'un delta ( $\Delta$ ) de la fluorescence relative du Fluo-4 AM entre le contrôle et les échantillons de nicotine traités. La fluorescence relative a été rapidement augmentée par la stimulation de  $1 \mu\text{M}$  de nicotine.  $\alpha$ -BTX est un antagoniste spécifique de l' $\alpha 7$  nAChR,  $10 \text{ nM}$   $\alpha$ -BTX a réduit partiellement l'influx calcique induit par la nicotine. Les résultats sont la moyenne de trois expériences distinctes.

#### 14. L'expression de l' $\alpha 7$ nAChR est augmentée par la stimulation de nicotine

Nous avons évalué l'expression de l' $\alpha 7$  nAChR de CSM-GW en prolifération traitées par différentes concentrations de nicotine en fonction du temps par PCR quantitative en temps réel. Premièrement, les CSM-GW sont traitées par différentes concentrations de nicotine ( $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M) pendant 24h. Deuxièmement, les CSM-GW sont traitées par  $10^{-4}$  M nicotine pendant 6h, 12h, et 24h, l'expression de l' $\alpha 7$  nAChR est augmentée en fonction du temps. On a trouvé que l'expression de l' $\alpha 7$  nAChR est augmentée après stimulation par la nicotine. Cet effet est dose-dépendant (Figure 42.A) et temps-dépendant (Figure 42.B).

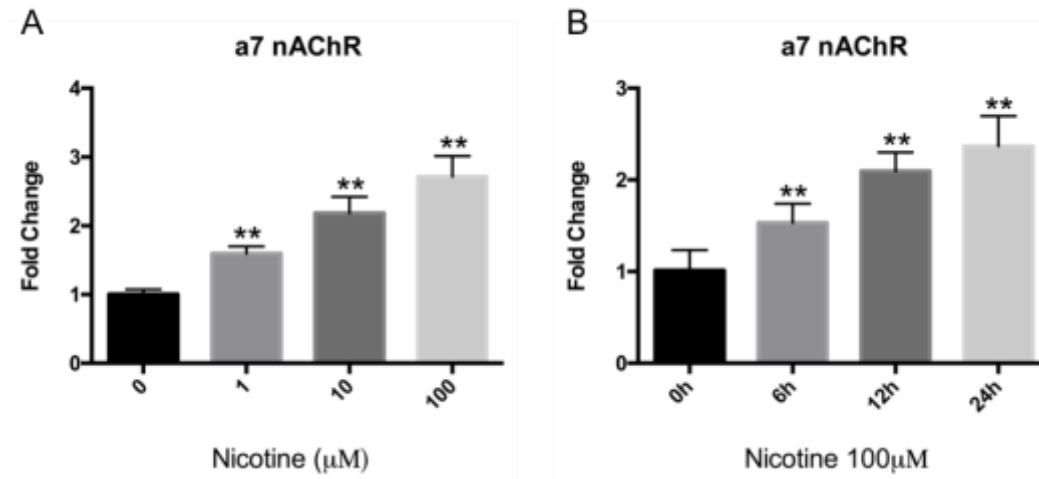


Figure 42 Analyse de l'expression de  $\alpha 7$  nAChR pendant la prolifération de CSM-GW avec le traitement de la nicotine par PCR quantitative en temps réel. (A), avec différentes concentrations de nicotine pendant 24h; (B), traitement par nicotine 100  $\mu$ M en fonction du temps. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression à témoin (sans nicotine). Dans les graphiques, est représentée la moyenne  $\pm$  SD pour tous les échantillons dans chaque groupe effectué en triple exemplaire. N = 3, \*\*  $P < 0,01$ , par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney).

## 15. $\alpha$ -BTX reverse partiellement l'effet délétère de la nicotine sur la prolifération et la migration de CSM-GW

Tout à bord, nous avons examiné la prolifération et la différenciation chondrogénique de CSM-GW en présence de différentes concentrations de  $\alpha$ -BTX (10 nM, 100 nM). Nous avons, trouvé que 100 nM de  $\alpha$ -BTX induit une diminution de la prolifération et de l'expression de marqueurs chondrogéniques (Figure 43). Donc, on a choisi 10 nM de  $\alpha$ -BTX pour les manipulations suivantes.

Pour mieux comprendre le mécanisme de la nicotine sur les CSM-GW et le rôle de l' $\alpha 7$  nAChR, nous avons utilisé 10 nM de  $\alpha$ -BTX, prétraité les CSM-GW pendant 30 min, et suivi la stimulation par la nicotine.

La prolifération cellulaire de CSM-GW est inhibée par stimulation de 100  $\mu$ M de nicotine après 3<sup>ème</sup> jour de culture (Figure 44.A). Un prétraitement par l' $\alpha$ -BTX (10 nM) peut réverser

partiellement l'effet de la nicotine (100  $\mu$ M) (Figure 44.A). Cependant, l' $\alpha$ -BTX (10 nM) seule n'induit pas une diminution significative de la prolifération cellulaire (Figure 44.A).

En outre, le wound healing assay a montré que le nombre de cellules migrantes de CSM-GW traitées par 100  $\mu$ M de nicotine est inférieur par rapport au group témoin (Figure 44.B). Un prétraitement par l' $\alpha$ -BTX (10 nM) peut réverser partiellement l'effet de la nicotine (100  $\mu$ M) sur la migration (Figure 44.B). Cependant, l' $\alpha$ -BTX (10 nM) seule n'a pas induit de diminution significative de la migration cellulaire (Figure 44.B).

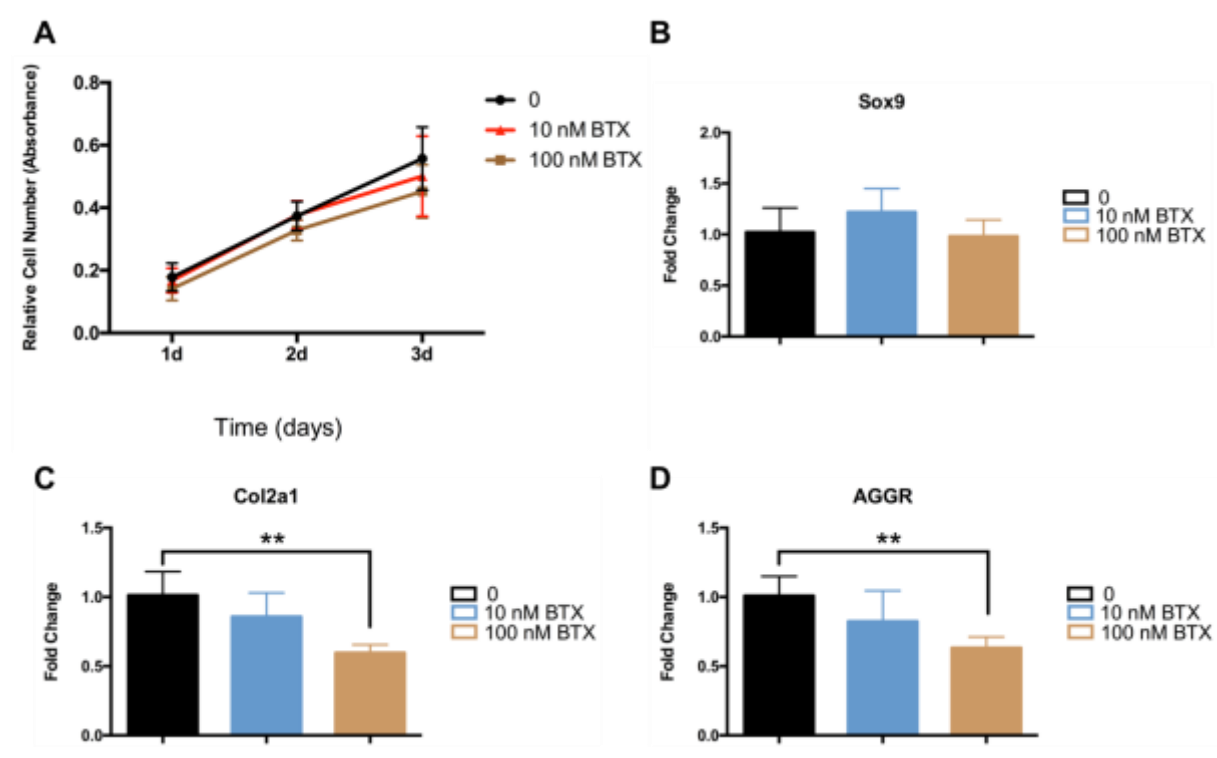


Figure 43 Effet de différentes concentrations de  $\alpha$ -BTX sur la prolifération et la différenciation de CSM-GW. A), La prolifération cellulaire est analysée par le test MTT au 1er, 2ème, et 3ème jour. B-D), Analyse de l'expression de marqueurs chondrogénique après 28 jours de culture en présence des différentes concentrations de  $\alpha$ -BTX par PCR quantitative en temps réel. B), Sox9 ; C), Col2a1 ; D), Agrécan. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression par rapport au témoin. Dans les graphiques est représentée la moyenne  $\pm$  SD pour tous les échantillons dans chaque groupe effectué en triple exemplaire. N = 2. \*\*  $P < 0,01$  par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney).

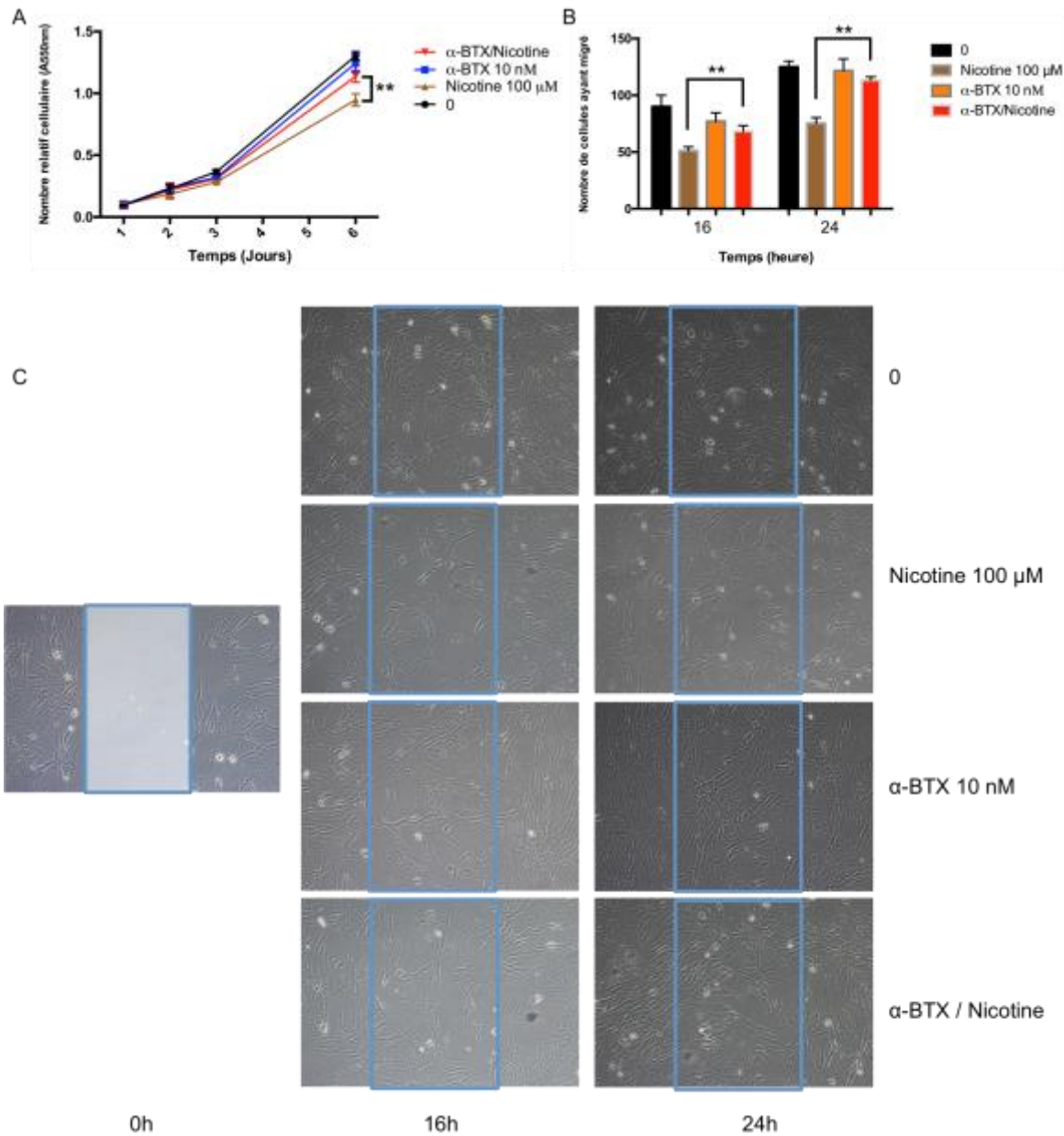


Figure 44 Effet de la nicotine et  $\alpha$ -BTX sur la prolifération et la migration cellulaire de CSM-GW. A), La prolifération cellulaire est analysée par le test MTT au 1er, 2ème, 3ème, et 6ème jour, Le nombre de cellules (absorbance) est diminué par 100  $\mu$ M nicotine par rapport au groupe témoin.  $\alpha$ -BTX (10 nM) peut réverser partiellement cet effet de nicotine et  $\alpha$ -BTX (10 nM) n'a pas d'effet toxique. B), La migration cellulaire est analysée par wound healing test à la 16<sup>ème</sup> et 24<sup>ème</sup> heure. Le nombre de cellules ayant migré est diminué par nicotine (100  $\mu$ M) par rapport au groupe témoin.  $\alpha$ -BTX (10 nM) peut réverser partiellement cet effet de nicotine (100  $\mu$ M). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type (n = 3), \*\*  $P < 0,01$ , par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney). C), Les photos de would healing test de différents groupes sont prises à l'objectif x10.

## 16. Interaction de l' $\alpha$ -BTX et la nicotine sur la différenciation chondrogénique de CSM-GW

L'effet de l' $\alpha$ -BTX sur la différenciation chondrogénique des CSM-GW en présence de 100  $\mu$ M de nicotine est évalué par l'expression génique de marqueurs chondrogéniques, Sox9, Col2a1, et Agrécane (Figure 45.A-C). Les cellules sont prétraitées dans milieu de différenciation chondrogénique supplémenté de 10 nM de l' $\alpha$ -BTX pendant 30 min, en présence de 100  $\mu$ M de nicotine. L'expression de Sox9, de Col2a1, et de l'Agrécane est évaluée après 28 jours de culture. Nous avons trouvé que 10 nM de l' $\alpha$ -BTX peut réverser partiellement l'effet délétère de la nicotine (Figure 45.A-C).

De plus, la teneur en PGs colorées par le bleu alcian est diminuée dans le groupe 100  $\mu$ M de nicotine. Un prétraitement par 10 nM de l' $\alpha$ -BTX peut réverser partiellement cet effet de nicotine (Figure 46.A-D, N). Ainsi, l' $\alpha$ -BTX a réversé partiellement aussi l'effet de la nicotine sur l'expression du taux de collagènes totaux colorés par rouge sirius (Figure 46.E-H, O).

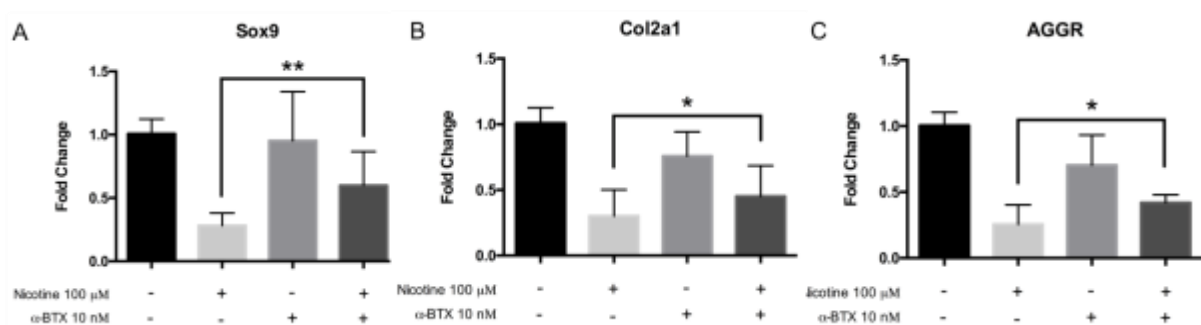


Figure 45 Analyse de la chondrogenèse après 28 jours de différenciation chondrogénique en présence de 100  $\mu$ M nicotine ou/et complétée avec 10 nM de l' $\alpha$ -BTX par PCR quantitative en temps réel. A), Sox9 ; B), Col2a1 ; C), Agrécane. Les résultats sont exprimés par le changement relatif d'expression par rapport au témoin. Dans les graphiques est représentée la moyenne  $\pm$  SD pour tous les échantillons dans chaque groupe effectué en triple exemplaire. N = 3. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney).



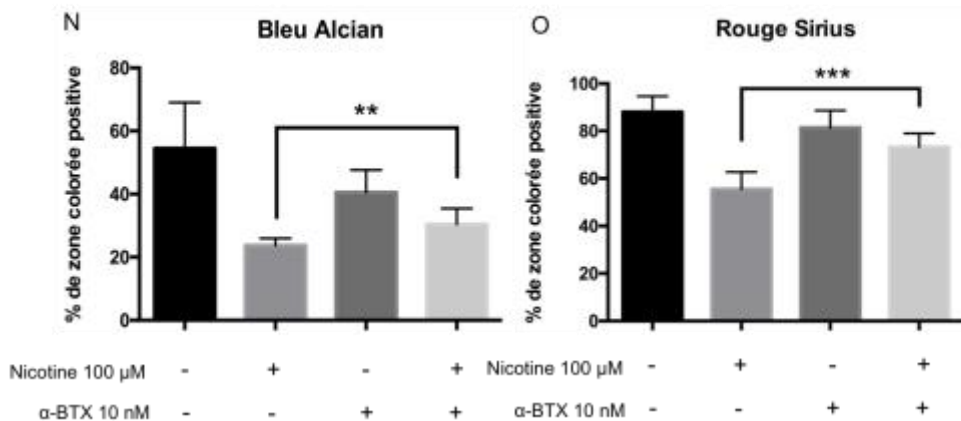
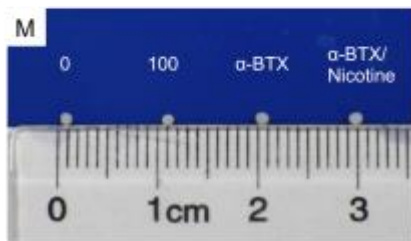
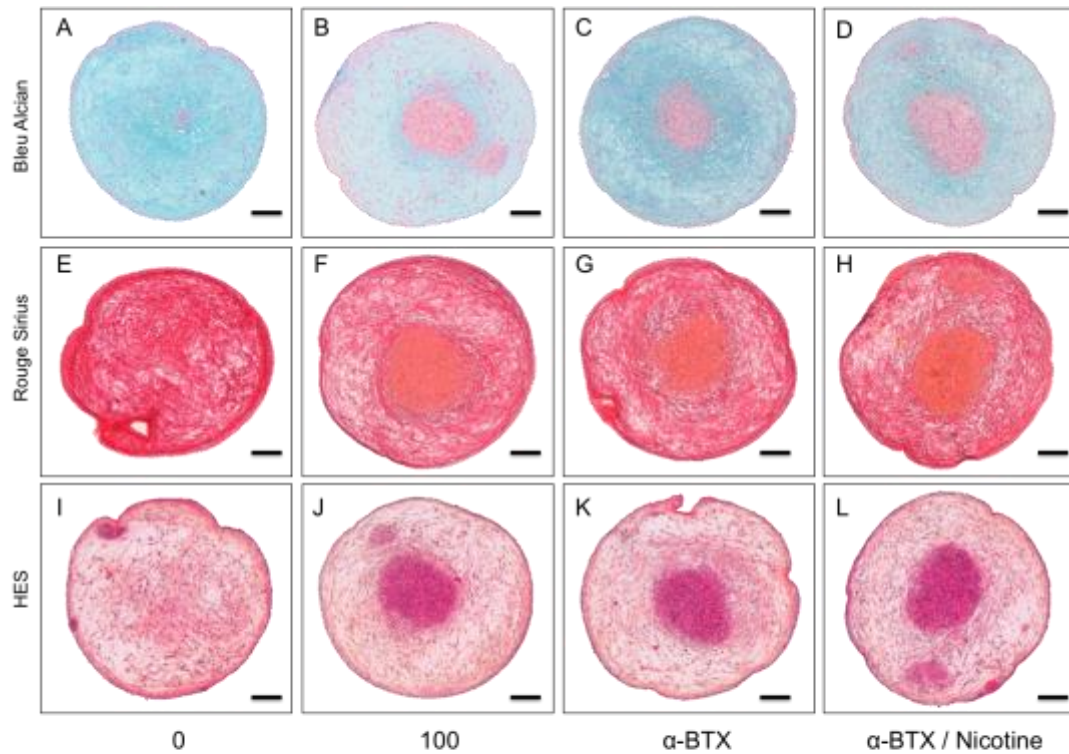


Figure 46 L'analyse histologique de la différenciation chondrogénèse après le traitement de 100 μM nicotine ou/et complété avec 10 nM de l'α-BTX. (A-D), bleu alcian ; (E-H), rouge sirius ; (I-L), HES. A, H, I : sans nicotine ; B, F, J : 100μM nicotine ; C, G, K : 10 nM α-BTX ; D, H, L :10 nM α-BTX+100 μM nicotine. La barre d'échelle noire représente 200 μm. (M), Les culots de différents groupes après 28 jours de culture. (N-O), La semi-quantification des colorations par alcian bleu et rouge sirius est exprimée en pourcentage de la zone colorée positif. N=3, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0005$ , par le test  $t$  de Student (test de Mann-Whitney).

# Discussion

## 1. L'environnement et l'arthrose

L'arthrose est une maladie plurifactorielle, l'âge et l'obésité étant les facteurs de risque prépondérants, à progression lente, ce qui complique fortement le développement d'approches thérapeutiques efficaces. Récemment l'impact de l'environnement dans la pathologie arthrosique a été mis en évidence. Comme beaucoup de maladies (cancers, maladies cardiovasculaires,...), l'environnement par la présence de polluants, pesticides, perturbateurs endocriniens, ou par des habitudes et des comportements quotidiens (prise de tabac, d'alcool) jouent des rôles importants dans l'initiation et l'évolution de ces maladies. Une grande partie de la population est exposée de façon plus ou moins importante à la fumée de cigarette soit activement chez les fumeurs, soit passivement chez les personnes inhalant non intentionnellement les produits de combustion du tabac. Ces produits sont donc susceptibles d'affecter à tous les âges d'un individu, en particulier dès le stade fœtal le fonctionnement des cellules et des tissus et de provoquer ou aggraver de nombreuses pathologies.

Notre travail de recherche a porté plus particulièrement sur la nicotine et son impact dans le développement de la maladie arthrosique. Les études épidémiologiques montrent que le rôle de la fumée de cigarette est assez controversé. Le tabagisme est liée à une plus forte prévalence de la douleur au genou (Miranda et al., 2002) et la perte de cartilage du genou (Amin et al., 2007; Ding et al., 2008). Il est connu pour avoir des effets négatifs sur la réparation des tissus et la guérison. La consolidation osseuse peut être retardée par la cigarette (Ding et al., 2008; Krannitz et al., 2009). En outre, les femmes fumeuses ont une plus grande propension pour IUGR et l'ostéoporose (Sopori, 2002). Ainsi des études épidémiologiques indiquent que l'arthrose est associée au IUGR car les modifications du cartilage au cours de la période de développement intra-utérin augmentent la sensibilité à l'arthrose chez l'adulte (Luo



et al., 2015; Ni et al., 2015).

Il nous a paru important de déterminer, au niveau cellulaire et moléculaire si la nicotine affecte la physiologie de la cellule chondrocytaire et quels sont les mécanismes impliqués.

L'approche méthodologique adoptée pour ce travail est pluridisciplinaire et multi-échelle. Elle a fait appel à des compétences dans les domaines de la biologie cellulaire, moléculaire et tissulaire, en relation avec des services cliniques et des plateformes technologiques. Ceci a permis notamment de mettre au point et de maîtriser les techniques de cultures cellulaires des chondrocytes humains arthrosiques et des CS, les processus de prolifération et différenciation chondrogénique. En effet, deux types de cellules ont été utilisés : des chondrocytes arthrosiques adultes, des CSM-GW. Les chondrocytes représentent l'archétype des cellules cartilagineuses. Il était donc important de connaître leur réaction biologique lors d'imprégnation nicotinique. L'utilisation d'une banque de patients arthrosiques des deux sexes, quoique limitée en nombre mais soigneusement sélectionnés pour leurs habitudes de fumeurs est un atout pour déterminer si la nicotine affecte l'homéostasie chondrocytaire. Du cartilage arthrosique a été utilisé, l'obtention de cartilage sain étant très difficile à obtenir. Nous avons toutefois prélevé du cartilage sous contrôle microscopique dans des zones suffisamment éloignées du cartilage nécrosé pour obtenir un tissu suffisamment intact.

Les CSM-GW sont une source de CSM fœtal qui, peuvent minimiser l'influence du donneur. En effet, les CSM-GW présentent des avantages comparés aux autres sources de CSM en particulier celles issues de la moelle osseuse pour laquelle l'âge des donneurs semble altérer leur propriétés (Benameur et al., 2015; Li et al., 2014). Le nombre de CSM, le potentiel de prolifération et de différenciation semblent diminuer avec l'âge du donneur (Li et al., 2014; Sethe et al., 2006). Le prélèvement des CSM-GW est simple, sans geste invasif ; leur densité cellulaire et leur potentiel d'expansion et différenciation en font des outils de choix dans le cadre de notre étude.

Par ailleurs, la différenciation chondrogénique nécessite un système de culture 3D, la culture en culot (Pellets), qui tire avantage des interactions cellule-cellule d'une manière similaire à la condensation pendant le développement du cartilage *in vivo* (Estes et al., 2010). Les CSM-GW avec la méthode de culots dans notre étude permettent de montrer l'impact de la nicotine sur le développement du tissu cartilagineux.

Nous avons évalué le rôle de la nicotine sur la prolifération et la différenciation en utilisant une sélection de marqueurs génétiques. Leur pertinence a été démontrée lors de nombreuses études au cours desquelles ces processus cellulaires ont été étudiés (Filip et al., 2016). Ainsi Sox9 est essentiel pour transformer les cellules de condensation en chondrocytes et agit encore à chaque stade de la différenciation des chondrocytes. Sox9 est exprimé dans des cellules de condensations mésenchymateuses et dans des chondrocytes proliférants, mais pas dans des chondrocytes hypertrophiques. Dans les cellules en culture, Sox9 stimule la transcription d'un certain nombre de gènes de la matrice cartilagineuse, y compris Col2a1, Col1a2 et l'agrécan. Donc, Sox9 est important pour toutes les phases de la lignée chondrocytaire, des condensations précoces à la conversion des chondrocytes proliférants en chondrocytes hypertrophiques (Kronenberg, 2003).

De plus, l'arthrose est une maladie caractérisée par la perte de composants du cartilage articulaire, principalement des PGs, entraînant la destruction des tissus et l'hypocellularité. Plusieurs gènes sont susceptibles d'être impliqués dans la sensibilité du cartilage à l'arthrose. Nous avons évalué les gènes codant pour le Col II (Col2a1) et d'autres protéines structurales de la MEC. La stimulation de la synthèse des PG et/ou l'inhibition de la dégradation des PG sont donc d'une importance capitale pour le traitement de l'arthrose. Les facteurs qui accélèrent la production et le dépôt de composés matriciels pourraient protéger contre la progression de l'arthrose.

Les PGs sont constitués de protéines porteuses de nombreuses chaînes latérales de GAG attachées de manière covalente. En raison de leur nature fortement polyanionique, les PGs interagissent avec différentes protéines, cytokines, facteurs de croissance et protéines de la MEC. L'agrécan, le PG majeur des PGs du cartilage articulaire, contient des chaînes de sulfate de chondroïtine comme GAG prédominants. La biosynthèse de GAG est initiée par la formation d'une amorce de tétrasaccharidique GlcA- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,4-Xyl, qui est liée à des résidus de sérine de la protéine porteuse. Cette amorce est formée par l'addition de chaque résidu de sucre catalysé par la O-xylosyltransférase I (XT-I), la 1,4-galactosyltransférase 7 (GalT-I), la 1,3-galactosyltransférase 6 (GalT-II), et la 1,3-glucuronosyltransférase I (GlcAT-I), et sert d'amorce pour l'allongement de la chaîne de sulfate d'héparane (HS) ou de sulfate de chondroïtine. Les GAG sont synthétisés à partir de cette amorce par addition alternative de N-acétyl hexosamine et de résidus d'acide glucuronique (Prydz and Dalen, 2000). L'identification des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de la chaîne GAG a mis en évidence le rôle clé de la GlcAT-I, qui a reçu beaucoup d'attention parce qu'elle joue un rôle central au point de ramification commun à différentes chaînes GAG. Venkatesan et al. ont déjà montré que la thérapie par la délivrance du gène GlcAT-I est prometteuse en tant que traitement de l'arthrose (Venkatesan et al., 2004). La XT-I est une enzyme essentielle de la voie de biosynthèse des PGs catalysant l'étape initiale et limitante dans l'assemblage de la chaîne GAG. Elle joue un rôle critique dans la régulation de la synthèse de PG dans le cartilage (Khair et al., 2013; Venkatesan et al., 2009). La perturbation de la capacité anabolique des chondrocytes, en particulier, la synthèse et l'assemblage des chaînes GAG des PGs, peut être critique pour la progression de la dégénérescence du cartilage.

Nous avons aussi évalué l'expression de marqueurs pré- et hypertrophiques (Col X, Runx2, respectivement), le marqueur de la dégradation matricielle (MMP13) et la cytokine

pro-inflammatoire IL-1 qui est une cytokine principale impliquée dans l'arthrose. Le cartilage hyalin est le support de la formation des tissus osseux par prolifération, maturation (première phase de différenciation) puis hypertrophie et minéralisation des chondrocytes qui conduisent à l'apoptose. Cette différenciation terminale peut être contrôlée par une régulation négative de l'expression de Sox9 et du Col II, une induction de celle du ColX et de la MMP-13 (Filip et al., 2016).

## **2. Optimisation des conditions de la culture cellulaire**

Dans notre étude, tout d'abord, nous avons évalué différentes conditions de culture. L'expansion des chondrocytes dépend de plusieurs facteurs, y compris le site de la biopsie, la densité d'ensemencement, la pression en oxygène, la composition du milieu de culture, et la durée de la culture (Grogan et al., 2007). Dans l'impossibilité d'avoir des prélèvements de patients jeunes avec un cartilage sain, nous avons comparé l'expression de marqueurs chondrocytaires de deux zones du prélèvement cartilagineux, une zone moins abîmée (saine relativement) et une zone abîmée. Nous avons trouvé qu'il y a une grande différence entre les deux zones, la zone moins abîmée présente une plus grande d'expression de Sox9, Col2a1, et Agrécan (Figure 21). Donc, pour notre étude, on a choisi plutôt les zones les moins abîmées, plus représentatives pour évaluer l'effet de la nicotine sur les chondrocytes humains.

La perte du phénotype chondrocytaire est toujours liée à la sénescence ou à une dédifférenciation rapide (Ashraf et al., 2016). Une étude a rapporté une dédifférenciation très rapide de chondrocytes dès le premier passage pendant la culture en monocouche (Darling and Athanasiou, 2005). Les chondrocytes obtenus à partir de cartilage sain par arthroscopie perdent rapidement leurs caractéristiques morphologiques et biologiques. Les chondrocytes d'adulte subissent une lente sénescence et dédifférenciation lors de l'expansion *in vitro*. Au cours de l'expansion, l'état des cellules est déterminé par le changement de l'expression de

gènes divers en réponse à leur microenvironnement, notamment le stress d'oxydation, le stress mécanique et des conditions de culture inadaptées. Il est difficile de maintenir l'activité physiologique normale de chondrocytes humains en culture à long terme. Notre étude est en accord avec cette conclusion (Figure 21).

Nous avons montré que l'hypoxie permet de mieux maintenir le phénotype des chondrocytes humains (Figure 22). Les chondrocytes existent naturellement dans un environnement à basse tension d'oxygène (environ 5% d'oxygène). Il est intéressant de noter que la faible tension d'oxygène *in vitro* favorise la production de la MEC du cartilage par les chondrocytes (Murphy and Polak, 2004), ainsi que la différenciation chondrogénique des CSM (Wang et al., 2005). Des facteurs de survie intracellulaire, tels que le facteur  $1\alpha$  inductible par hypoxie (HIF- $1\alpha$ ), sont nécessaires pour le maintien de l'homéostasie chondrocytaire (Martel-Pelletier et al., 2016). Dans les cellules de mammifères, la réponse transcriptionnelle à la pression d'oxygène est largement médiée par le facteur HIF- $1\alpha$ , qui augmente graduellement à mesure que la concentration d'oxygène diminue.

Des études récentes ont révélé que l'hypoxie affecte différents types de CS, comme les CSE (Ezashi et al., 2005), iPS (Bae et al., 2012; Yoshida et al., 2009) et les CSM-MO (Grayson et al., 2007; Hung et al., 2012; Yamamoto et al., 2013). Un environnement à faible tension d'oxygène est physiologiquement normal non seulement pour la plupart des embryons de mammifères, mais aussi pour les CSM. A ce jour, diverses méthodes de culture cellulaire ont été développées pour obtenir des CSM plus efficaces. Kakudo et al. ont montré que la prolifération des CSM des tissus adipeux est renforcée par l'hypoxie. L'activation de HIF- $1\alpha$ , la production de FGF-2 et la voie ERK1/2 et Akt ont été impliquées dans ce mécanisme de régulation (Kakudo et al., 2015). Donc dans notre étude, l'hypoxie a été utilisée pour la culture des chondrocytes humains et les CSM-GW, ainsi la différenciation de CSM-GW est faite dans un incubateur en présence de 2 % d'oxygène.

Nous avons donc utilisé les chondrocytes arthrosiques avant le premier passage, une plus haute concentration d'ensemencement en diminuant le temps de culture en monocouche, une plus haute concentration de SVF et une condition de culture en hypoxie. Tous ces facteurs sont favorables pour maintenir le phénotype chondrocytaire de façon optimale.

### **3. L'effet direct de la nicotine sur les chondrocytes humains**

Hukkanen et al. (Hukkanen et al., 2005) ont rapporté que la concentration sanguine de la nicotine obtenue à partir d'un fumeur chronique était dans la gamme de 0,01 à 0,1  $\mu\text{M}$ . Les différentes concentrations (0,1, 0,5, et 5  $\mu\text{M}$ ) de nicotine que nous avons utilisées pour les chondrocytes humains sont donc proches de la moyenne concentration de nicotine du fumeur *in vivo*, ce qui est valide les résultats obtenus.

La nicotine aux concentrations utilisées dans notre étude n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire des chondrocytes humains arthrosiques (Figure 24). Cependant, elle peut induire une augmentation de l'expression d'ARNm de MMP13 (Figure 26). Par contre, il n'y a pas de changements significatifs au niveau de l'expression du secrétome chondrocytaire évaluée par LC-MALDI (Figure 25). Ces données montrent que la nicotine aurait un effet pro-catabolique sur les chondrocytes humains, en stimulant la dégradation de composés matriciels. De plus, l'expression de marqueurs chondrocytaires et de dégradation matricielle est plus élevée chez les fumeurs par rapport à non-fumeurs (Figure 27). En examinant la collection de patients étudiés, cette différence serait probablement liée au sexe car il y avait plus d'hommes que de femmes chez les fumeurs par rapport à non-fumeurs (Tableau 14).

Les effets négatifs de la nicotine sur la formation du cartilage ont été largement rapportés. Jaiswal et al. (Jaiswal et al., 2009) ont conclu que les patients qui fument avaient des conditions préopératoires moins favorables et ont moins d'implantation de chondrocytes autologues que les non-fumeurs. De plus, le tabagisme retarde la chondrogénèse de guérison

des fractures dans un modèle murin (El-Zawawy et al., 2006). Kawakita et al. ont indiqué que la nicotine diminue la synthèse de la MEC et supprime la différenciation hypertrophique des chondrocytes de la plaque de croissance, ce qui entraîne un retard de la croissance du squelette (Kawakita et al., 2008).

Nous avons montré que la nicotine n'avait aucun effet sur la prolifération des chondrocytes arthrosiques humains (Figure 24). Ce résultat est en accord avec ceux de Kawakita et al. (Kawakita et al., 2008). Dans leur étude, aucun effet nicotinique sur la prolifération cellulaire n'a été détecté, évalué par immunohistochimie en utilisant un anticorps contre l'antigène nucléaire de cellules proliférantes. Mais, ce n'est pas en accord avec l'étude de Ying et al. (Ying et al., 2012a), ces auteurs ont montré que la nicotine pourrait favoriser la prolifération des chondrocytes isolées des patients sains et arthrosiques. Cette différence pourrait s'expliquer par des conditions de cultures différentes (utilisation de chondrocytes en P2, composition du milieu de culture différent).

Dans notre étude, au niveau de l'expression de marqueurs chondrocytaires, aucun effet n'est observé sur l'expression de Sox9 et Col2a1 dans les chondrocytes arthrosiques avec toutes les concentrations de nicotine utilisées, par rapport au groupe témoin (Figure 26.A-B). Cependant, il y a une faible augmentation de l'expression d'agrécane à la concentration de 0,1  $\mu$ M et 5  $\mu$ M de nicotine (Figure 26.C). Au niveau de l'expression de marqueurs de dédifférenciation, nous avons trouvé que la nicotine induit l'augmentation de l'expression de MMP13 (Figure 26.E), et l'expression de ColX à 0,1  $\mu$ M de nicotine est augmentée par rapport au témoin (Figure 26.D). Cette partie de résultats indique que la nicotine peut stimuler le catabolisme du cartilage et accélérer la dégradation matricielle.

Ces données suggèrent donc que le tabac a un effet pro-catabolique sur l'articulation. Par contre, Ying et al. ont montré que la nicotine augmente l'expression de Col II de chondrocytes d'origine des patients sains et arthrosiques (Ying et al., 2012a). Gullahorn et al. (Gullahorn et

al., 2005) ont aussi trouvé que la nicotine aux concentrations  $0,15 \times 10^{-7}$  -  $0,15 \times 10^{-6}$  M pourrait stimuler l'activité de synthèse de Col II de chondrocytes provenant de donneurs normaux *in vitro*. Nous pensons que l'effet ou les mécanismes impliqués peuvent dépendre du type cellulaire et des conditions expérimentales diverses qui sont utilisées dans ces différentes études. Autre possibilité, dans les stades précoces de l'arthrose, les chondrocytes présentent une augmentation de l'activité de synthèse, reflétant les tentatives de réparation (Lohmander et al., 1994). Au cours du stade terminal de l'arthrose, les chondrocytes montrent une augmentation de l'expression des gènes et la production de protéines associées à l'hypertrophie (Sandell, 2012).

Concernant l'analyse protéomique, nous n'avons pas trouvé de modulation significative du sécrétome en présence de la nicotine (Figure 25). Et nous n'avons pas observé d'expression de MMP13 et Col II. Si MMP13 n'a pas été facilement identifié en raison de la concentration relative faible dans le sécrétome de chondrocytes, l'absence d'identification Col II peut être plutôt due en raison de la forte homologie de cette protéine avec d'autres collagènes abondantes qui sont synthétisés par le chondrocytes, et par l'identification difficile de ses peptides protéotypiques (Lourido et al., 2016). Cette hypothèse est confirmée par le fait que Col II n'a pas été identifié dans un certain nombre d'études sur sécrétomes, non seulement les chondrocytes articulaires (Calamia et al., 2011), mais aussi à partir de cartilage (Lourido et al., 2014). Cependant, Lourido et al (Lourido et al., 2016) ont trouvé que la nicotine peut induire l'expression de MMP et de marqueurs de la destruction des articulations dans les chondrocytes humains, présentant des effets cataboliques avec des concentrations proches de celles trouvées chez les fumeurs, ce qui montre un rôle négatif du tabagisme dans le développement de l'arthrose.

En absence de nicotine, nous avons observé qu'il y avait une variation inter-individuelle importante de l'expression des marqueurs entre les patients arthrosiques. Nous avons constaté



que l'expression de Sox9, Col2a1, Agrécane, et MMP13 était plus élevée chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (Figure 27), ce qui semble indiquer que les deux voies de synthèse et de dégradation des composants matriciels sont plus activées chez les fumeurs. L'équilibre entre voies de synthèse et de dégradation au niveau de la MEC est important pour maintenir la fonction normale du cartilage. L'anabolisme correspond à la biosynthèse de PGs, d'agrécane en particulier celle des chaînes de procollagène, surtout Col II. Le catabolisme est surtout catalysé par les MMPs, en particulier MMP13. Selon les données sur les patients (Tableau 14), il n'y a pas de différence entre les deux groupes selon l'âge. La seule différence est selon le sexe. Il y a plus d'hommes chez le groupe fumeur par rapport aux non-fumeurs. C'est peut-être une raison pour expliquer que l'expression de marqueurs de la différenciation chondrocytaire chez les fumeurs est plus élevée que chez les non-fumeurs.

#### **4. L'effet de la nicotine sur les CSM-GW**

À ce jour, aucune approche thérapeutique n'empêche la destruction progressive du cartilage articulaire. La restauration du cartilage articulaire chez les patients atteints d'arthrose est donc un défi considérable pour les chercheurs et les cliniciens. La médecine régénérative qui est un concept innovant peut nous permettre de réaliser la réparation et la restauration du cartilage articulaire endommagé (Mamidi et al., 2016) en utilisant les CSM. Les CSM, les précurseurs multipotents des cellules du tissu conjonctif qui peuvent être isolées de nombreux tissus, y compris de la gelée de Wharton (Flynn et al., 2007; Troyer and Weiss, 2008; Weiss et al., 2006; Weiss and Troyer, 2006) sont apparues comme la base d'une thérapie potentielle (Barry and Murphy, 2013). De plus, l'arthrose peut être considérée comme une maladie mésenchymateuse, parce que l'activité, le phénotype ou la mobilisation des CSM sont altérés, ce qui entraîne une absence de réparation et une augmentation des processus dégénératifs.

Cette idée est fondée sur l'hypothèse selon laquelle tous les tissus qui composent l'articulation saine dépendent de la disponibilité et l'activité des CSM (Barry and Murphy, 2013).

L'intérêt principal des CSM réside dans leurs capacités de prolifération et de différenciation chondrogénique. Les conditions doivent être optimisées pour maintenir les chondrocytes dérivés des CSM dans un état stable, hyalin, chondrocytaire, sans hypertrophie. Les patients atteints d'arthrose sont susceptibles d'être âgés, et toute la surface articulaire souvent nécessite un traitement. Les techniques qui font que les CSM se différencient en cellules de la lignée chondrogénique ont conduit à une variété de stratégies expérimentales pour déterminer si les CSM de différentes sources peuvent être utilisés pour la régénération et le maintien de la différenciation du cartilage. Ces stratégies incluent l'utilisation des CSM comme cellules progénitrices pour concevoir des implants cartilagineux qui peuvent être utilisés pour réparer des lésions chondrales et ostéochondrales ou comme des producteurs trophiques de facteurs bioactifs pour initier des activités régénératrices endogènes dans l'articulation arthrosique. La délivrance de CSM peut être obtenue par injection directe intra-articulaire ou par greffage de biomatériaux (Nöth et al., 2008). La distribution locale de cultures *ex vivo* de CSM a produit des résultats prometteurs dans les modèles précliniques d'arthrose (Barry and Murphy, 2013) suggèrent que les CSM transplantées agissent non seulement pour la formation du tissu de réparation, mais exercent également des effets par différents mécanismes, par exemple l'effet paracrine. Dans un article récent, Horie et al. ont montré que les CSM humaines injectées dans le genou lésé chez des rats étaient activées et exprimaient une série de gènes incluant le Ihh, PTHrP et la BMP 2, qui induisent une régulation positive du Col II (Horie et al., 2012). Cependant, l'ingénierie tissulaire du cartilage nécessite trois composantes: les cellules, la matrice et l'environnement mécanique (Chen et al., 2006). Le succès de l'ingénierie tissulaire dépend de la différenciation et du maintien efficaces du type cellulaire ou tissulaire fonctionnel, qui dépend à son tour de

l'environnement local. Pour la sécurité du patient et pour l'efficacité des CSM, avant chaque application clinique, tous les risques d'instabilité phénotypique de différenciation chondrogénique doivent être exclus.

La source tissulaire, l'âge du donneur et le stade de la maladie peuvent influencer directement sur le rendement, le taux de prolifération et la multipotence de CSM. Le nombre de CSM, le potentiel de prolifération et de différenciation semble diminuer avec l'âge (Sethe et al., 2006). C'est une raison pour laquelle qu'on a choisi les CSM-GW d'origine fœtale pour notre étude.

Tout à bord, avant de tester l'action de la nicotine, nous avons bien caractérisé les phénotypes génétique des CSM par cytométrie en flux (Figure 28) et la capacité des différentes voies de différenciation (adipogénèse Figure 29, ostéogénèse Figure 30, chondrogénèse Figure 31) par différentes colorations. Ensuite, nous avons montré que ces cellules étaient capables de se différencier en chondrocytes par l'utilisation de plusieurs marqueurs (Figure 32). Nous avons montré une augmentation significative de l'expression génétique de marqueurs chondrogéniques, tels que Sox9, Col2a1, Agrécane, XT-1, et GlcAT-I par PCR quantitative en temps réel et une augmentation significative de l'expression protéique de Sox9 et Pro-collagène II par western blot.

La nicotine peut s'accumuler dans de nombreux tissus, dont la plupart abrite des populations de CS résidentes. La nicotine a été démontré s'accumuler facilement dans le lait maternel (Chen et al., 2015; Dahlström et al., 2008; Paccola and Miraglia, 2016) et les tissus placentaires (Maritz, 2002; Maritz and Dennis, 1998; Wong et al., 2015, 2016). Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la nicotine traverse facilement la barrière placentaire, et il existe des preuves pour l'accumulation de la nicotine dans le sérum fœtal et le liquide amniotique avec des concentrations légèrement plus élevées que dans le sang maternel (Dempsey and Benowitz, 2001). Donc pour évaluer l'effet de la nicotine sur les CSM-GW,

nous avons choisi des concentrations plus élevées en comparaison avec les concentrations qu'on a utilisées dans l'étude avec des chondrocytes. La nicotine (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) a inhibé la prolifération (Figure 33) et la migration cellulaire de CSM-GW (Figure 35). Par contre, la plus basse concentration (1  $\mu$ M) n'a pas induit l'apoptose et la nécrose cellulaire (Figure 34). De plus, la nicotine a induit une diminution de l'expression de marqueurs chondrogéniques au cours de la prolifération cellulaire (Figure 36), indiquant un effet délétère sur le potentiel de la différenciation chondrogénique. Au cours de la différenciation, la nicotine a aussi un effet négatif sur la différenciation chondrogénique de CSM-GW au niveau génétique et protéique (Figure 37-38). La diminution de l'expression de Sox9, Col2a1, Agrécan, XT-I, et GlcAT-I, l'augmentation de MMP13, et IL-1 $\beta$  indiquent que la nicotine inhibe la différenciation chondrogénique, induit la réaction inflammatoire et stimule la différenciation hypertrophique.

La prolifération (et par association, la viabilité et l'apoptose) et la différenciation sont les caractéristiques déterminantes des CSM et donc critiques pour la fonctionnalité globale des CSM. Donc les études sur les effets de la nicotine sur ces caractères sont d'une importance capitale.

En ce qui concerne la prolifération et la viabilité, Ying et al. ont analysé la prolifération cellulaire des CSM-MO de trois donneurs sains à 1, 4, 7, et 14 jours par le test CCK8. Ils ont trouvé que la prolifération est significativement augmentée à la concentration de  $10^{-6}$  M, et la prolifération inhibée par  $10^{-5}$  M de nicotine (Ying et al., 2012b). L'étude précédente suggère que  $10^{-5}$  M nicotine pourrait diminuer la viabilité de CSM, et cet effet est probablement le résultat des effets cytotoxiques (Ying et al., 2012b). Yu et al. ont montré que  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  M de nicotine induit la mort cellulaire de H9 CSE tandis que  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$  M stimule la prolifération et améliore la survie cellulaire (Yu et al., 2009). Ishizuka et al. ont rapporté que la nicotine à 300 nM induit une augmentation de la synthèse d'ADN et de la prolifération de la lignée iPSC

murine 20D17 (Toshiaki Ishizuka et al., 2012). Cependant, Zeng et al. qui ont trouvé que la nicotine induit des changements morphologiques, comme au niveau des vacuoles cytoplasmiques et endommage la membrane nucléaire. La prolifération cellulaire est diminuée en présence de  $3 \times 10^{-3}$  M,  $6 \times 10^{-3}$  M nicotine sur des CSM d'origine de cordon ombilicaux humain (Zeng et al., 2014). De plus, Landgraf et al. ont signalé que la présence de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  M de nicotine diminue la prolifération de CGR8 murin CSE, mais montrent que la nicotine augmente la viabilité de ces cellules (Landgraf et al., 2010). Par contre, plusieurs chercheurs ont montré également que l'exposition à la nicotine peut conduire à une augmentation de l'apoptose (Zdravkovic et al., 2008; Zhao and Reece, 2005). Dans une étude *in vitro* de Kim et al., les CS dérivées du ligament parodontal (CSDLP) sont exposées à une gamme de concentrations de nicotine, entre 0 et  $10^{-2}$  M, pendant 24 ou 48 heures avant d'être évaluées par analyse MTT pour des changements dans la viabilité cellulaire. Les résultats ont montré que la nicotine provoquait une diminution significative de la viabilité du CSDLP après 24 et 48 heures de culture en concentrations supérieures ou égales à  $10^{-4}$  M. La réduction de la viabilité cellulaire pourrait être expliquée par les augmentations observées de la fragmentation de l'ADN et par l'augmentation des cellules dans la phase subG1 (Kim et al., 2012), phase cellulaire associée à l'apoptose. Kim et al. ont trouvé que les CSDLP traitées avec de la nicotine ( $10^{-6}$ - $10^{-2}$  M) pendant 48h ont présenté une diminution de l'expression de Bcl-2 (Kim et al., 2012), une protéine, anti-apoptotique de la voie mitochondriale et une augmentation de l'expression de clivée caspase-3 (Kim et al., 2012), une enzyme pro-apoptotique activée. Schraufstatter et al (Schraufstatter et al., 2009) ont aussi indiqué que la concentration  $10^{-5}$  M induit l'apoptose de CSM, les concentrations physiologiques ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M) ne gênent pas la survie cellulaire. Notre étude de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux est en accord avec leurs conclusions. Nous avons trouvé à la concentration de  $10^{-6}$  M que la nicotine n'a pas influencé la survie des CSM-GW (Figure 34).

Il existe des rapports controversés concernant les effets de la nicotine sur la migration cellulaire. Certains chercheurs ont indiqué que la nicotine stimule la migration cellulaire (Di Luozzo et al., 2005; Li et al., 2004), d'autres ont montré au contraire que la nicotine est un inhibiteur (Giannopoulou et al., 1999; Seroby et al., 2005). Le tabagisme a des effets négatifs sur la réparation des tissus et la guérison, en altérant la migration des cellules, qui est critique pour le processus de guérison (Wong and Martins-Green, 2004). De plus, la consolidation osseuse peut être retardée par la cigarette (Alemdaroğlu et al., 2009; Krannitz et al., 2009). La cicatrisation osseuse retardée a été détectée dans le groupe de la nicotine par examen histologique (Ma et al., 2011). Notre étude a montré que la nicotine aux concentrations utilisées avait un effet négatif sur la migration de CSM-GW (Figure 35). Ces résultats sont en accord avec ceux de Schraufstatter et al. (Schraufstatter et al., 2009), qui ont montré que la chimiotaxie des CSM vers les facteurs C3a et le bFGF *in vitro* et la migration des CSM dans la moelle osseuse et la rate *in vivo* sont inhibées par la nicotine à des concentrations non toxiques. Ng et al. ont également montré que  $10^{-6}$  M de nicotine est capable d'inhiber la prolifération des CSM humaines ainsi que leur potentiel de migration *in vitro* (Ng et al., 2013). Les mécanismes exacts qui guident la migration des CSM implantées ne sont pas connus, mais il est clair que ces cellules sécrètent un large spectre de molécules bioactives qui ont des activités immunorégulatrices et/ou régénératrices. Il reste à déterminer si la susceptibilité à l'arthrose peut résulter d'une mobilisation ou d'une prolifération réduite de CSM (Nöth et al., 2008).

L'effet de la nicotine sur la différenciation chondrogénique de CSM-GW n'a pas été rapporté à ce jour. Nous avons trouvé que la nicotine peut induire une diminution significative des marqueurs de différenciation (Sox9, Col2a1, et Agrécane) pendant la phase de prolifération. Ce résultat indique que la nicotine peut empêcher le potentiel de différenciation chondrogénique au cours de la prolifération. Concernant la différenciation chondrogénique

des CSM induite par le TGF- $\beta$ , nos résultats montrent que la nicotine altère la différenciation chondrogénique des CSM-GW.

Au contraire, plusieurs travaux ont décrit un effet positif de la nicotine sur la différenciation chondrogénique des CSM. Ying et al. (Ying et al., 2012b) ont trouvé un effet positif de la nicotine en utilisant les CSM-MO cultivés en monocouche pendant 14 jours. La nicotine jusqu'à  $10^{-6}$  M induit une augmentation de l'expression du Col II. Par contre,  $10^{-5}$  M de nicotine inhibe l'expression de collagène. L'expression de l'ARNm de l'agrécan n'a pas été influencée à la concentration de  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M pendant 7 jours par rapport au groupe témoin; Cependant, elle était diminuée après le traitement de  $10^{-5}$  M de nicotine pendant 14 jours. Roux et al. (Roux et al., 2013) ont utilisé les CSM dérivées du tissu adipeux cultivées également en monocouche pendant 14 jours en présence de TGF- $\beta$ 3 et BMP6 avec des doses 0,15, 0,3,  $0,6 \times 10^{-6}$  M de la nicotine. Ils ont indiqué que l'expression d'ARNm d'agrécan est augmentée significativement en présence de la nicotine avec la concentration  $0,6 \times 10^{-6}$  M. En parallèle, les niveaux d'ARNm de Col Ia1 et Col X n'ont pas changé ou ont montré une légère diminution à  $0,15 \times 10^{-6}$  M de nicotine. De plus, cet effet de la nicotine est en contradiction avec le fait que la nicotine est une inductrice bien connue de la voie pro-inflammatoire IL-1 et PGE2, 2 voies de dégradation du cartilage. Nous avons montré dans notre étude que la nicotine stimule l'expression de IL-1 $\beta$  avec un effet dose-dépendant. Il est possible que, *in vitro*, un effet positif de la nicotine ait été découvert en raison de l'activation de la voie chondrogénique de TGF- $\beta$ , comme il est démontré dans d'autres modèles que la nicotine est capable d'induire ces voies (Jensen et al., 2012). Ces différences dans les résultats obtenus peuvent être dues aux systèmes de culture utilisés pour la différenciation. En général, la différenciation chondrogénique nécessite un système de culture 3D, et les CSM peuvent être induites avec succès dans une variété d'environnements de matrices. Ces configurations de culture comprennent la culture en culot (Pellets), la culture de gels d'alginate, qui utilise un

hydrogel inerte pour faciliter un phénotype cellulaire arrondie avantageux pour la chondrogénèse et une matrice dérivée du cartilage, qui cherche à récapituler certaines des interactions cellule-matrice observées dans le cartilage naturel (Estes et al., 2010). Par contre les interactions cellules/matrices propices à la différenciation chondrogénique sont minimales lorsque les CSM sont cultivées en monocouche, d'où sûrement des différences de comportement vis-à-vis de la nicotine.

Ainsi Deng et al. (Deng et al., 2012) ont trouvé que la nicotine avec les concentrations ( $2,5 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M) inhibe le potentiel de différenciation chondrogénique des CSM-MO en utilisant la culture de gels d'alginate pendant 4 semaines, ce qui conduit à un cartilage mal différencié.

En conclusion, nos résultats ont montré que la nicotine aux concentrations utilisées présente un effet délétère sur la chondrogénèse. La nicotine peut inhiber la différenciation chondrogénique, induire l'hypertrophie chondrocytaire et stimuler la réaction inflammatoire.

## **5. L'expression des nAChRs dans les CSM**

De nombreuses études ont montré que des éléments du système multiprotéique cholinergique comprenant l'acétyltransférase, l'acétylcholinestérase et les AChRs étaient exprimés dans un grand nombre de cellules non neuronales, y compris les chondrocytes et les CSM (M. Carballosa et al., 2016). Dans notre étude, nous avons démontré, pour la première fois, l'expression de AChRs, en particulier de la sous unité  $\alpha 7$  nAChR dans les CSM-GW aux niveaux transcriptionnel et traductionnel par RT-PCR, western blot (Figure 39) et immunofluorescence (Figure 40).

Récemment, Zabltoni et al. ont trouvé que l'expression des sous-unités a était dépendante du sexe et de l'état ostéoporotique du donneur (Zabltoni et al., 2015). Par exemple, les hCSM chez l'homme sain expriment les  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  et  $\alpha 9$  nAChR, alors que les hCSM dérivés de



femmes saines expriment  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  et  $\alpha 10$  (Zablotni et al., 2015). Les hCSM dérivées de patients ostéoporotiques, d'autre part, expriment les mêmes unités que les femmes en bonne santé avec l'expression supplémentaire de  $\alpha 3$  (Zablotni et al., 2015). De plus, l'expression de nAChRs a été étudiée sur les hCSM différenciées en lignée ostéogénique, chondrogénique et adipogénique. Fait intéressant, les variations de certaines sous-unités ont été observées entre les différents groupes différenciés. La sous-unité  $\alpha 7$  est restée pratiquement inchangée dans tous les groupes, mais pas sur la sous-unité  $\alpha 3$ . Dans les hCSM mâles prédifférenciées,  $\alpha 3$  est exprimé chez les 3/4 patients; cependant, après la différenciation, l'expression de  $\alpha 3$  est augmentée dans les ostéoblastes (4/4), maintenue dans les chondrocytes (3/4), et abolie dans les adipocytes (0/4) (Zablotni et al., 2015). Ces différences de l'expression suggèrent que les nAChRs pourraient être impliqués dans les processus de différenciation de hCSM. Bien que les résultats de Zablotni confirment l'expression d'une sous-unité  $\alpha$  dans les hCSM, une analyse par western blot est nécessaire pour confirmer la traduction réelle de ces gènes en protéines qui peuvent alors être assemblées en nAChRs fonctionnels.

Les CSDLP sont un sous-type de hCSM. Les sous-unités nAChRs et les nAChRs fonctionnels ont été identifiées sur les CSDLP. Kim et al. étaient les premiers à confirmer l'expression des sous-unités  $\alpha 7$  et  $\beta 4$  nAChR et  $\alpha 7$  nAChR fonctionnels dans les CSDLP par RT-PCR et les études antagonistes de nAChR (Kim et al., 2012). Dans une autre étude, Zhou et al. ont confirmé la présence de  $\alpha 7$  nAChR fonctionnels sur CSDLP par RT-PCR, western blot, et des études en utilisant l'antagoniste spécifique  $\alpha$ -BTX (Zhou et al., 2013); Cependant, ils convient de noter que seule la sous-unité  $\alpha 7$  nAChR a été examinée dans ces études. Jusqu'à présent, seules les protéines des sous-unités nAChR  $\alpha 7$  et  $\beta 4$  ont été confirmées dans les CSDLP (Kim et al., 2012; Zhou et al., 2013).

Cette suggestion est encore renforcée par l'expression répandue et maintenue de la sous-

unité  $\alpha 7$  dans tous les groupes et états différenciés. Nous avons focalisé notre étude sur  $\alpha 7$  nAChR, et nous avons montré l'expression de l' $\alpha 7$  nAChR au niveau génétique et protéique des CSM-GW.

## 6. Fonctionnalité de nAChRs

L'activation des nAChRs par liaison à la nicotine a été impliquée dans de nombreuses modifications cellulaires. En ce qui concerne leur fonction, les récepteurs interviennent probablement de façon importante dans la signalisation cholinergique sur la survie/apoptose, la prolifération, la migration et le potentiel de différenciation des CSM. La nicotine, un agoniste des nAChRs, peut jouer un rôle important dans le processus de la prolifération et la différenciation chondrogénique.

Les nAChRs sont typiquement des canaux transmembranaires pour les ions potassium et sodium. Un nAChR consistant en un homopentamère de  $\alpha 7$  permet le passage aux ions calcium (Kalamida et al., 2007). Les nAChRs composés de sous-unité  $\alpha 4$  sont beaucoup moins perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  que l' $\alpha 7$  nAChR, qui est considéré comme le nAChR le plus perméable à  $\text{Ca}^{2+}$  (Lax et al., 2002). La fonctionnalité de ces récepteurs peut être déterminée par les mesures de la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$ , qui devrait augmenter par l'activation de  $\alpha 7$  nAChR. Schraufstatter et al (Schraufstatter et al., 2009) ont trouvé que la nicotine induit l'influx de calcium transitoire et une augmentation du calcium intracellulaire.

Nous avons trouvé que  $\alpha 7$  nAChR est fonctionnellement actif après stimulation par la nicotine (Figure 41) en mesurant l'influx de calcium, et cet influx est inhibé partiellement par addition de  $\alpha$ -BTX. Il a été rapporté que la nicotine (à  $10^{-5}$  M) provoquait des flux transitoires de calcium atteignant un maximum en 30-45 s (Hoogduijn et al., 2009). Dans notre étude,  $10^{-6}$  M de nicotine induit l'influx calcique après 25-30 s, cependant, les cellules avec prétraitement de  $\alpha$ -BTX présentent un influx plus faible. De plus, l'expression de l'ARNm codant pour  $\alpha 7$

nAChR est augmentée par la stimulation de nicotine (Figure 42), et cet effet est dose-dépendant et temps-dépendant. Nous pouvons conclure que l' $\alpha 7$  nAChR est exprimé dans les CSM-GW, et est fonctionnellement actif par stimulation par la nicotine.

Dans une étude *in vitro*, Hoogduijn et al. ont étudié la fonctionnalité des nAChRs en mesurant les changements de  $Ca^{2+}$  en utilisant la sonde fluorescente spécifique du calcium, Fluo-3-AM. Les augmentations de  $Ca^{2+}$  ont été observées dans la moitié (22/50) des hCSM, suggérant la présence de  $\alpha 7$  nAChR (Hoogduijn et al., 2009). La présence de  $\alpha 7$  nAChR fonctionnel dans hCSM a également été confirmée dans les études *in vitro* menées par Schraufstatter et al (Schraufstatter et al., 2009). Les hCSM exposées à la nicotine présentaient une augmentation significative de  $Ca^{2+}$  par rapport aux groupes sans nicotine et en présence d'agent chélatant le calcium, ce qui confirme la présence de  $\alpha 7$  nAChR fonctionnel dans les hCSM (Schraufstatter et al., 2009).

Des études supplémentaires par Hoogduijn et al. ont été menées afin de déterminer si l'activation des récepteurs à la nicotine affecte la production d'AMPC ou la phosphorylation de la protéine kinase signal-réglée extracellulaires (ERK) (Hoogduijn et al., 2009). Ils ont trouvé que l'exposition à la nicotine augmente la phosphorylation de ERK dans hCSM. Lors de la phosphorylation, ERK est activée et capable de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire (Michailovici et al., 2014). Les processus de prolifération, migration et différenciation sont essentiels pour l'efficacité de régénération à base des CS (Frescaline et al., 2012). Par la médiation des effets qui interfèrent ces processus, les nAChRs sont sans doute capables d'influer sur la survie, la différenciation et la régénération potentielle des CS.

Kawakita et al. (Kawakita et al., 2008) ont trouvé que la synthèse de la matrice est diminuée par la nicotine et que la nicotine inhibe la différenciation hypertrophique via  $\alpha 7$  nAChR, ce qui entraîne un retard de la croissance du squelette. L'étude de Arredondo et al. a démontré que la signalisation ACh par  $\alpha 7$  nAChR contrôle les stades tardifs du

développement des kératinocytes dans l'épiderme en régulant l'expression de la progression du cycle cellulaire, de l'apoptose et des gènes de différenciation terminale et que ces effets sont médiés, au moins en partie, par des altérations transmembranaires de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arredondo et al., 2002). A partir de ces résultats, nous avons supposé que l'effet négatif de la nicotine sur CSM-GW est probablement lié à l'activation de  $\alpha 7$  nAChR. Nous pensons que l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, après la liaison de la nicotine à son récepteur et l'activation subséquente de la tension dépendant de  $\text{Ca}^{2+}$ , peuvent moduler, au moins partiellement, les effets de la nicotine sur la fonction de CSM-GW.

Plusieurs hypothèses concernant l'activation des voies messagers secondaires sont probablement concernées. Premièrement, des études précédentes ont montré que les concentrations de calcium intracellulaire modulent la synthèse de PGs dans une variété de cellules (Barré et al., 2006; Bellin et al., 1983; Fagnen et al., 1999; Lenz et al., 1982; Vandewalle et al., 1994; Vijayagopal and Subramaniam, 2001). Il a été suggéré que le calcium peut moduler l'activité des glycosyltransférases (GT) de la voie de synthèse de la chaîne GAG. Les signaux intracellulaires médiés par la mitogène et le stress activé par la protéine kinase (MAPK/SAPK), une voie calcium-dépendante, ont été associés à l'arthrose (Saklatvala, 2007). Des études ont également montré que l'inhibition de la chondrogénèse induite par TGF- $\beta 1$  et l'expression génique dans des cellules mésenchymateuses progénitrices résulte de l'inhibition de p38 ou ERK-1 (Tuli et al., 2003). Selon les travaux de notre laboratoire, Venkatesan et al. ont montré que l'activation de la p38 sur le modèle d'arthrose à la papaïne était importante pour l'expression de GT induite pendant la réparation du cartilage, en particulier celle du gène XT-I (Venkatesan et al., 2009). Des résultats similaires ont été observés pour le gène de la protéine de l'Agrécane. Un lien entre ERK et la régulation GT a déjà été suggéré par la démonstration que l'inhibition de ERK 1/2 avec PD98059 inhibe l'activité du promoteur GlcAT-I (Barré et al., 2006).

De plus, les travaux de Hui WANG (Université de Wuhan, Chine) (Résultats pas encore publiés) suggèrent que l'effet de la nicotine sur la chondrogénèse chez le Rat s'effectue par la voie de la calcineurine. La calcineurine, une sérine-thréonine phosphatase, est une enzyme dépendante du calcium et de la calmoduline impliquée dans l'induction du facteur de transcription NFAT (facteur nucléaire pour les lymphocytes T activés) pour Nuclear factor of activated T-cells. Les protéines NFAT sont régulées par une voie de signalisation intracellulaire dépendant du calcium. Une augmentation du calcium intracellulaire activera la calcineurine, capable de déphosphoryler les régions riches en sérines de NFAT et permettant ainsi sa translocation nucléaire et son activation des gènes cibles. Les auteurs ont trouvé que NFATc2 agit sur la répression transcriptionnelle dépendant de l'histone désacétylase (HDAC) de l'expression de Sox9 pendant la différenciation chondrogénique (Figure 47).

En conclusion, ces données suggèrent que les effets nicotiniques observés sont principalement régis par le  $\alpha 7$  nAChR homopentamérique. Les autres sous-unités de nAChRs identifiées, tels que  $\alpha 3$  et  $\alpha 5$ , sont incapables de former des récepteurs homopentamériques (Improgo et al., 2010) ou hétéropentamériques. En outre, étant donné qu'aucune des protéines de sous-unité  $\beta$  ont été identifiées pour former les complexes avec sous-unités  $\alpha$  identifiées, il est très peu probable que les  $\alpha 3$  et  $\alpha 5$  soient impliquées dans la formation de nAChRs fonctionnels dans les hCSM.

L'affinité pour les ligands de nAChR et le passage d'ions dépendent de la composition en sous-unités spécifiques de chaque récepteur. Cette spécificité est également observée pour la liaison des antagonistes aux récepteurs, qui peuvent se lier compétitivement aux nAChRs provoquant la désensibilisation et inhibant l'activation. La  $\alpha$ -BTX est une toxine qui se lie spécifiquement à  $\alpha 7$  nAChR (Wang et al., 2010), tandis que la dihydro- $\beta$ -érythroïdine (DH $\beta$ E) se lie spécifiquement à  $\alpha 4$  nAChR (T. Ishizuka et al., 2012). D'autre part, la mécamylamine (MECA) est un antagoniste non spécifique et donc elle se lie à tous les

nAChRs, quelle que soit la composition de la sous-unité (Kim et al., 2012).

Dans notre étude, un prétraitement à l' $\alpha$ -BTX peut renverser partiellement l'effet délétère de nicotine sur la prolifération et la migration cellulaire (Figure 44). Ces résultats révèlent une implication du système cholinergique non neuronal dans la régulation de la prolifération et la migration de CSM. L'effet délétère de la nicotine sur la différenciation chondrogénique des CSM-GW *in vitro* a été atténué partiellement en présence d' $\alpha$ -BTX si l'on considère l'expression de Sox9, Col2a1, et Agrécan par PCR quantitative en temps réel (Figure 45) et l'expression protéique de protéoglycane et collagènes par histologie (Figure 46), suggérant un rôle de l' $\alpha 7$  nAChR dans la médiation de ces effets de la nicotine.

Malheureusement, les effets secondaires toxiques de l' $\alpha$ -BTX ont été montrés au niveau des expressions de marqueurs chondrogéniques (Figure 45-46). L'expression génétique de marqueurs chondrogénique est diminuée dans le group avec  $\alpha$ -BTX seule, et l'histologie a aussi montré une diminution de PG et collagènes totaux en comparaison avec le group témoin, ils ne doivent pas être négligés.

Comme nous avons montré ici, une réversion partielle des effets induits par la nicotine lorsque les CSM ont été prétraitées avec des antagonistes spécifiques du récepteur, suggère qu'il peut y avoir d'autres nAChRs fonctionnels présents sur la surface des CSM qui jouent également un rôle d'intermédiaire dans l'effet nicotinique ou que l'effet nicotinique est médié par une voie supplémentaire n'impliquant pas les nAChRs. Plus récemment, le travail de Tie et al. a montré que l'exposition prénatale à la nicotine chez le rat augmente la susceptibilité de la progéniture adulte à l'arthrose, le mécanisme potentiel implique IGF-1 programmation à faible fonction dans le cartilage articulaire causée directement par l'action de la nicotine sur  $\alpha 4\beta 2$  nAChR (Tie et al., 2016a). Ils ont trouvé que l'exposition prénatale à nicotine a induit une diminution de l'expression de Sox9, Col2a1, Agrécan, et IGF-1. De plus,  $\alpha 4\beta 2$  nAChR-inhibé peut réverser cette diminution d'expression des marqueurs. Ishizuka et. al. ont montré

que les effets de l'activation des nAChRs sont le résultat de l'augmentation du calcium intracellulaire médiée par les sous-unités  $\alpha 4$  et  $\alpha 7$ . Lorsque des antagonistes de l'une ou l'autre de ces sous-unités spécifiques ont été appliqués (DH $\beta$ E pour  $\alpha 4$  et  $\alpha$ -BTX pour  $\alpha 7$ ), les changements observés résultant de l'exposition à la nicotine ont diminué. Il est intéressant de noter que ces effets n'ont pas été observés en l'absence de calcium extracellulaire, ce qui suggère que les effets étaient médiés par des récepteurs calcium-dépendants à la surface des CSM (Toshiaki Ishizuka et al., 2012). Zhao et Reece ont montré que les embryons murins traités avec 3-6  $\mu$ M de nicotine étaient plus petits et présentaient des défauts graves à la naissance, cependant, ces effets n'ont pas été observés chez les groupes recevant un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$ , les résultats impliquent la présence et l'importance de nAChRs  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant dans le développement embryologique (Zhao and Reece, 2005).

## 7. Perspectives

Au niveau de la première partie de l'étude sur le chondrocyte humain, le nombre de prélèvements est limité. Selon l'étude épidémiologique, la prévalence d'arthrose chez les fumeurs est plus forte que chez les non-fumeurs, parce que la tolérance de douleur individuelle est faible chez les fumeurs. De plus, l'âge du patient influe également sur la capacité d'expansion en culture monocouche, et la capacité de redifférenciation de chondrocytes. Nous n'avons pas trouvé cette différence dans notre étude à cause de nombre insuffisant de patients. Il faudrait donc augmenter le nombre de patients dans une future étude avant de tirer une conclusion plus définitive.

De même, l'étude du secrétome chondrocytaire n'a été faite que sur 3 prélèvements. D'autres échantillons doivent être analysés. De plus, une méthode de culture *ex vivo*, des explants cartilagineux pourrait être une approche complémentaire.

Concernant la deuxième partie sur les CSM-GW, l'effet de la nicotine sur la prolifération

des CS semble lié au cycle cellulaire. En effet, Ishizuka et al. ont montré que l'exposition de 300 nM nicotine conduit à augmentation du nombre de cellules trouvées en phases S et G2 et une diminution de cellules en phase G1 (Toshiaki Ishizuka et al., 2012). Une analyse du cycle cellulaire pourrait être effectuée par cytométrie en flux. L'analyse apoptotique cellulaire en présence de nicotine est nécessaire pour montrer qu'il y a un effet toxique avec les plus hautes concentrations de nicotine. Est-ce que l'effet délétère de la nicotine sur les fonctions de CSM-GW est lié à l'apoptose ou à la nécrose de la cellule?

Le mécanisme ou la signalisation entre l'activation de l' $\alpha 7$  nAChR et diminution de l'expression de marqueur chondrogénique méritent d'être précisés. Plusieurs hypothèses concernant l'activation des voies messagers secondaires sont probablement concernées. Est-ce que cet influx calcique peut stimuler la voie de la calcineurine ? Est-ce que cet effet est induit par les voies p38 et ERK1/2 ?

De plus, Zhou et al. ont montré que la nicotine altère la différenciation ostéogénique des CSDLP de manière dose-dépendante. La dégradation de la différenciation ostéogénique des CSDLP est médiée par la voie  $\alpha 7$  nAChR activée et la voie Wnt/b-caténine (Zhou et al., 2013). La voie Wnt/b-caténine a été impliquée dans l'embryogenèse de l'articulation et dans l'homéostasie squelettique chez l'adulte. De plus, Wnt 7a inhibe la chondrogénèse et induit la dédifférenciation des chondrocytes articulaires en stimulant l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine (Corr, 2008). Est-ce que cette hypothèse peut être mise en avant dans la différenciation chondrogénique des CSM-GW ?

Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider les liens potentiels entre la nicotine et les voies de signalisation afin de comprendre comment la nicotine altère la chondrogénèse.



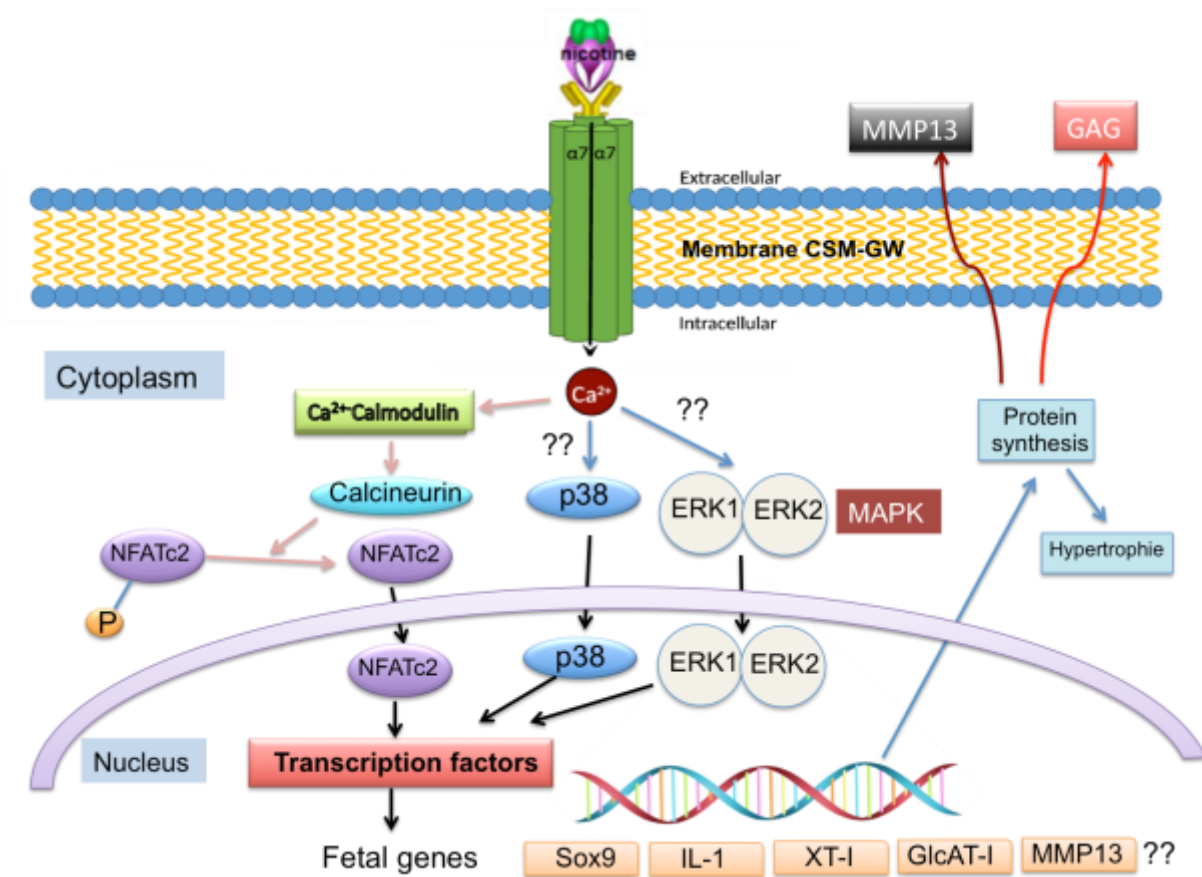


Figure 47 Hypothèse concernant les voies de signalisation induites après stimulation de nicotine via l' $\alpha 7$  nAChR. (1), La voie de la calcineurine. La calcineurine, une sérine-thréonine phosphatase, est une enzyme dépendante du calcium et de la calmoduline impliquée dans l'induction du facteur de transcription NFAT (facteur nucléaire pour les lymphocytes T activés) (Résultats de Pr Hui WANG de l'Université de Wuhan, pas encore publiés). (2), La relation entre les voies de p38/ERK et les facteurs de transcription.

## Conclusions

(1) La nicotine aux concentrations utilisées ( $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ , et  $5 \times 10^{-6}$  M) n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire, mais induit une augmentation de l'expression d'ARNm de MMP13 sur les chondrocytes humains arthrosiques. Cet effet est dose-dépendant. Cependant, l'expression de ARNm d'agrécan a été augmentée faiblement en présence de  $0.1 \times 10^{-6}$  et  $5 \times 10^{-6}$  M. Le marqueur hypertrophique chondrocytaire, Col X a été augmenté par  $0.1 \times 10^{-6}$  M nicotine. Par contre, il n'avait pas de changements significatifs au niveau du secrétome chondrocytaire par LC-MALDI. **Ces données montrent que la nicotine a un effet pro-catabolique sur les chondrocytes humains, en stimulant la dégradation matricielle.**

(2) Chez les patients fumeurs, l'expression de marqueurs chondrocytaires (Sox9, Col2a1, et Agrécan) et de dégradation matricielle (MMP13) est plus élevée par rapport aux non fumeurs, ce qui suggère qu'in vivo l'activité à la fois des voies de synthèse et de dégradation des composants matriciels semblent sensibles à la prise de tabac.

(3) La nicotine aux doses utilisées ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ , et  $10^{-4}$  M) inhibe la prolifération et la migration cellulaire de CSM-GW, et cet effet est dose-dépendant. Une concentration de  $10^{-6}$  M n'a pas d'effet significatif sur la viabilité de CSM-GW. **La nicotine a un effet délétère sur la différenciation chondrogénique de CSM-GW. Elle stimule la réaction inflammatoire Il1 dépendante et la différenciation hypertrophique.**

(4) L'effet délétère de la nicotine sur les CSM-GW serait probablement médiée par le  $\alpha 7$  nAChR qui est exprimé dans ces cellules.  $\alpha$ -BTX, inhibiteur spécifique de  $\alpha 7$  nAChR, peut réverser cet effet partiellement.

## Références

- Akmal, M., Kesani, A., Anand, B., Singh, A., Wiseman, M., Goodship, A., 2004. Effect of nicotine on spinal disc cells: a cellular mechanism for disc degeneration. *Spine* 29, 568–575.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rogers, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89, 73–120. doi:10.1152/physrev.00015.2008
- Alcaín, F.J., Burón, M.I., 1994. Ascorbate on cell growth and differentiation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 393–398.
- Alemdaroğlu, K.B., Tiftikçi, U., İltar, S., Aydoğan, N.H., Kara, T., Atlihan, D., Ateşalp, A.S., 2009. Factors affecting the fracture healing in treatment of tibial shaft fractures with circular external fixator. *Injury* 40, 1151–1156. doi:10.1016/j.injury.2008.12.011
- Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., Lotz, M., 2004. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 50, 1522–1532. doi:10.1002/art.20269
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T.D., Greenwald, R., Hochberg, M., 1986. 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.* 29, 1039–1049.
- Amin, S., Niu, J., Guermazi, A., Grigoryan, M., Hunter, D.J., Clancy, M., LaValley, M.P., Genant, H.K., Felson, D.T., 2007. Cigarette smoking and the risk for cartilage loss and knee pain in men with knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 18–22. doi:10.1136/ard.2006.056697
- Anderson, J.J., Felson, D.T., 1988. 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, 179–189.
- Andersson, H., Ejlertsson, G., Leden, I., 1998. Widespread musculoskeletal chronic pain associated with smoking. An epidemiological study in a general rural population. *Scand. J. Rehabil. Med.* 30, 185–191.
- Arden, N., Nevitt, M.C., 2006. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20, 3–25. doi:10.1016/j.berh.2005.09.007
- Arredondo, J., Nguyen, V.T., Chernyavsky, A.I., Bercovich, D., Orr-Urtreger, A., Kummer, W., Lips, K., Vetter, D.E., Grando, S.A., 2002. Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J. Cell Biol.* 159, 325–336.

doi:10.1083/jcb.200206096

Arthur, A., Zannettino, A., Gronthos, S., 2009. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J. Cell. Physiol.* 218, 237–245. doi:10.1002/jcp.21592

Ashraf, S., Cha, B.-H., Kim, J.-S., Ahn, J., Han, I., Park, H., Lee, S.-H., 2016. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 24, 196–205. doi:10.1016/j.joca.2015.07.008

Aspden, R.M., Scheven, B.A., Hutchison, J.D., 2001. Osteoarthritis as a systemic disorder including stromal cell differentiation and lipid metabolism. *Lancet Lond. Engl.* 357, 1118–1120. doi:10.1016/S0140-6736(00)04264-1

Bae, D., Mondragon-Teran, P., Hernandez, D., Ruban, L., Mason, C., Bhattacharya, S.S., Veraitch, F.S., 2012. Hypoxia enhances the generation of retinal progenitor cells from human induced pluripotent and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 21, 1344–1355. doi:10.1089/scd.2011.0225

Baglioni, S., Francalanci, M., Squecco, R., Lombardi, A., Cantini, G., Angeli, R., Gelmini, S., Guasti, D., Benvenuti, S., Annunziato, F., Bani, D., Liotta, F., Francini, F., Perigli, G., Serio, M., Luconi, M., 2009. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3494–3505. doi:10.1096/fj.08-126946

Baksh, D., Yao, R., Tuan, R.S., 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 1384–1392. doi:10.1634/stemcells.2006-0709

Barré, L., Venkatesan, N., Magdalou, J., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M., 2006. Evidence of calcium-dependent pathway in the regulation of human beta1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan synthesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1692–1694. doi:10.1096/fj.05-5073fje

Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., Murphy, J.M., 2001. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell Res.* 268, 189–200. doi:10.1006/excr.2001.5278

Barry, F., Murphy, M., 2013. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 584–594. doi:10.1038/nrrheum.2013.109

Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., Till, J.E., 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452–454.

Bellin, M.E., Lenz, R.W., Steadman, L.E., Ax, R.L., 1983. Proteoglycan production by bovine

granulosa cells in vitro occurs in response to fsh. *Mol. Cell. Endocrinol.* 29, 51–65.

Benameur, L., Charif, N., Li, Y., Stoltz, J.-F., de Isla, N., 2015. Toward an understanding of mechanism of aging-induced oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* 25, 41–46. doi:10.3233/BME-141247

Benowitz, N.L., Hukkanen, J., Jacob, P., 2009. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.* 29–60. doi:10.1007/978-3-540-69248-5\_2

Benowitz, N.L., Jacob, P., Jones, R.T., Rosenberg, J., 1982. Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 368–372.

Berger, M.J., Adams, S.D., Tigges, B.M., Sprague, S.L., Wang, X.-J., Collins, D.P., McKenna, D.H., 2006. Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells. *Cytotherapy* 8, 480–487. doi:10.1080/14653240600941549

Bian, L., Zhai, D.Y., Tous, E., Rai, R., Mauck, R.L., Burdick, J.A., 2011. Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- $\beta$ 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo. *Biomaterials* 32, 6425–6434. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.033

Bijlsma, J.W., Berenbaum, F., Lfeber, F.P., 2011. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *The Lancet* 377, 2115–2126. doi:10.1016/S0140-6736(11)60243-2

Branch, M.J., Hashmani, K., Dhillon, P., Jones, D.R.E., Dua, H.S., Hopkinson, A., 2012. Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 5109–5116. doi:10.1167/iovs.11-8673

Brandt, K.D., Radin, E.L., Dieppe, P.A., van de Putte, L., 2006. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1261–1264. doi:10.1136/ard.2006.058347

Brittberg, M., 2008. Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up. *Injury* 39 Suppl 1, S40-49. doi:10.1016/j.injury.2008.01.040

Buckwalter, J.A., Mankin, H.J., 1998. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.* 47, 477–486.

Buckwalter, J.A., Mankin, H.J., Grodzinsky, A.J., 2005. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* 54, 465–480.

Calamia, V., Rocha, B., Mateos, J., Fernández-Puente, P., Ruiz-Romero, C., Blanco, F.J., 2011. Metabolic labeling of chondrocytes for the quantitative analysis of the interleukin-1-beta-mediated modulation of their intracellular and extracellular proteomes. *J. Proteome Res.* 10, 3701–3711. doi:10.1021/pr200331k

Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., Fisk, N.M., 2001.

Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396–2402.

Caplan, A.I., 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213, 341–347. doi:10.1002/jcp.21200

Chan, A.L.F., Chien, Y.W., Jin Lin, S., 2008. Transdermal delivery of treatment for Alzheimer's disease: development, clinical performance and future prospects. *Drugs Aging* 25, 761–775.

Chang, F., Ishii, T., Yanai, T., Mishima, H., Akaogi, H., Ogawa, T., Ochiai, N., 2008. Repair of large full-thickness articular cartilage defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 26, 18–26. doi:10.1002/jor.20470

Chen, C.-M., Chou, H.-C., Huang, L.-T., 2015. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation induces kidney injury and fibrosis in rat offspring. *Pediatr. Res.* 77, 56–63. doi:10.1038/pr.2014.148

Chen, F.H., Rousche, K.T., Tuan, R.S., 2006. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2, 373–382. doi:10.1038/ncprheum0216

Chen, F.H., Tuan, R.S., 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 10, 223. doi:10.1186/ar2514

Christensen, R., Bartels, E.M., Astrup, A., Bliddal, H., 2007. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 433–439. doi:10.1136/ard.2006.065904

Clark, J.M., 1990. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J. Anat.* 171, 117–130.

Conaghan, P.G., Vanharanta, H., Dieppe, P.A., 2005. Is progressive osteoarthritis an atheromatous vascular disease? *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1539–1541. doi:10.1136/ard.2005.039263

Corr, M., 2008. Wnt- $\beta$ -catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4, 550–556. doi:10.1038/ncprheum0904

Dahlström, A., Ebersjö, C., Lundell, B., 2008. Nicotine in breast milk influences heart rate variability in the infant. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 97, 1075–1079. doi:10.1111/j.1651-2227.2008.00785.x

Dahlström, A., Lundell, B., Curvall, M., Thapper, L., 1990. Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr. Scand.* 79, 142–147.

Darling, E.M., Athanasiou, K.A., 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 23, 425–432. doi:10.1016/j.orthres.2004.08.008

De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., Luyten, F.P., 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44, 1928–1942. doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P

Dempsey, D., Jacob, P., Benowitz, N.L., 2002. Accelerated metabolism of nicotine and cotinine in pregnant smokers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 594–598.

Dempsey, D.A., Benowitz, N.L., 2001. Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* 24, 277–322.

Deng, Y., Li, T.-Q., Yan, Y.-E., Magdalou, J., Wang, H., Chen, L.-B., 2012. Effect of nicotine on chondrogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in alginate bead culture. *Biomed. Mater. Eng.* 22, 81–87. doi:10.3233/BME-2012-0692

Desando, G., Cavallo, C., Sartoni, F., Martini, L., Parrilli, A., Veronesi, F., Fini, M., Giardino, R., Facchini, A., Grigolo, B., 2013. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res. Ther.* 15, R22. doi:10.1186/ar4156

Di Luozzo, G., Pradhan, S., Dhadwal, A.K., Chen, A., Ueno, H., Sumpio, B.E., 2005. Nicotine induces mitogen-activated protein kinase dependent vascular smooth muscle cell migration. *Atherosclerosis* 178, 271–277. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.09.017

Dieppe, P.A., Lohmander, L.S., 2005. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet Lond. Engl.* 365, 965–973. doi:10.1016/S0140-6736(05)71086-2

Ding, C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Abram, F., Raynauld, J.-P., Cicuttini, F., Jones, G., 2008. Two-year prospective longitudinal study exploring the factors associated with change in femoral cartilage volume in a cohort largely without knee radiographic osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 16, 443–449. doi:10.1016/j.joca.2007.08.009

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. doi:10.1080/14653240600855905

Dragoo, J.L., Samimi, B., Zhu, M., Hame, S.L., Thomas, B.J., Lieberman, J.R., Hedrick, M.H., Benhaim, P., 2003. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85, 740–747.

Du, X., Yuan, Q., Qu, Y., Zhou, Y., Bei, J., 2016. Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from Menstrual Blood by Adherence. *Stem Cells Int.* 2016, 3573846. doi:10.1155/2016/3573846

Ejaz, S., Lim, C.W., 2006. Impaired wound healing by exposure of different mainstream whole smoke solutions of commercial cigarettes. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 290–300. doi:10.1016/j.etap.2005.09.007

El-Zawawy, H.B., Gill, C.S., Wright, R.W., Sandell, L.J., 2006. Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 24, 2150–2158. doi:10.1002/jor.20263

Erices, A., Conget, P., Minguell, J.J., 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109, 235–242.

Estes, B.T., Diekman, B.O., Gimble, J.M., Guilak, F., 2010. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat. Protoc.* 5, 1294–1311. doi:10.1038/nprot.2010.81

Estes, B.T., Wu, A.W., Guilak, F., 2006. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum.* 54, 1222–1232. doi:10.1002/art.21779

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285, 2486–2497.

Eyre, D., 2002. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 4, 30–35. doi:10.1186/ar380  
Ezashi, T., Das, P., Roberts, R.M., 2005. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4783–4788. doi:10.1073/pnas.0501283102

Fafián-Labora, J., Fernández-Pernas, P., Fuentes, I., Toro, J.D., Oreiro, N., Sangiao-Alvarellos, S., Mateos, J., Arufe, M.C., 2015. Influence of age on rat bone-marrow mesenchymal stem cells potential. *Sci. Rep.* 5, 16765. doi:10.1038/srep16765

Fagnen, G., Phamantu, N.T., Bocquet, J., Bonnamy, P.J., 1999. Inhibition of transmembrane calcium influx induces decrease in proteoglycan synthesis in immature rat Sertoli cells. *J. Cell. Biochem.* 76, 322–331.

Felson, D.T., 2004. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol. Clin. North Am.* 42, 1–9, v. doi:10.1016/S0033-8389(03)00161-1

Felson, D.T., Anderson, J.J., Naimark, A., Hannan, M.T., Kannel, W.B., Meenan, R.F., 1989. Does smoking protect against osteoarthritis? *Arthritis Rheum.* 32, 166–172.

Felson, D.T., Lawrence, R.C., Dieppe, P.A., Hirsch, R., Helmick, C.G., Jordan, J.M., Kington, R.S., Lane, N.E., Nevitt, M.C., Zhang, Y., Sowers, M., McAlindon, T., Spector, T.D., Poole, A.R., Yanovski, S.Z., Ateshian, G., Sharma, L., Buckwalter, J.A., Brandt, K.D., Fries, J.F., 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* 133, 635–646.

Felson, D.T., Zhang, Y., 2014. Smoking and Osteoarthritis: A Review of the Evidence and Its Implications. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* doi:10.1016/j.joca.2014.11.022



Felson, D.T., Zhang, Y., Anthony, J.M., Naimark, A., Anderson, J.J., 1992. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. *The Framingham Study. Ann. Intern. Med.* 116, 535–539.

Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Naimark, A., Weissman, B., Aliabadi, P., Levy, D., 1997. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum.* 40, 728–733. doi:10.1002/1529-0131(199704)40:4<728::AID-ART19>3.0.CO;2-D

Filip, A., Pinzano, A., Bianchi, A., Fève, B., Jalkanen, S., Gillet, P., Mainard, D., Lacolley, P., Magdalou, J., Mercier, N., 2016. Expression of the semicarbazide-sensitive amine oxidase in articular cartilage: its role in terminal differentiation of chondrocytes in rat and human. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 24, 1223–1234. doi:10.1016/j.joca.2016.01.340

Flynn, A., Barry, F., O'Brien, T., 2007. UC blood-derived mesenchymal stromal cells: an overview. *Cytotherapy* 9, 717–726. doi:10.1080/14653240701584578

Frausin, S., Viventi, S., Verga Falzacappa, L., Quattromani, M.J., Leanza, G., Tommasini, A., Valencic, E., 2015. Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochem.* 117, 329–338. doi:10.1016/j.acthis.2015.02.005

Frescaline, G., Boudierlique, T., Huynh, M.B., Papy-Garcia, D., Courty, J., Albanese, P., 2012. Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* 8, 180–192. doi:10.1016/j.scr.2011.09.005

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403.

Fukumoto, T., Sperling, J.W., Sanyal, A., Fitzsimmons, J.S., Reinholz, G.G., Conover, C.A., O'Driscoll, S.W., 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 55–64.

Gan, Y., Dai, K., Zhang, P., Tang, T., Zhu, Z., Lu, J., 2008. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* 29, 3973–3982. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.06.026

Gang, E.J., Hong, S.H., Jeong, J.A., Hwang, S.H., Kim, S.W., Yang, I.H., Ahn, C., Han, H., Kim, H., 2004. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 102–108. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.111

Gelber, A.C., Hochberg, M.C., Mead, L.A., Wang, N.Y., Wigley, F.M., Klag, M.J., 1999. Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis. *Am. J.*

Med. 107, 542–548.

Giannopoulou, C., Geinoz, A., Cimasoni, G., 1999. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J. Clin. Periodontol.* 26, 49–55.

Goldring, M.B., Culley, Kirsty Leesa, Wondimu Elisabeth, Otero Miguel, 2017. Cartilage and Chondrocytes, in: Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. p. pp.34-59.

Goldring, S.R., Goldring, M.B., 2016. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 632–644. doi:10.1038/nrrheum.2016.148

Grayson, W.L., Zhao, F., Bunnell, B., Ma, T., 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 948–953. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.054

Greene, M.A., Loeser, R.F., 2015. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1966–1971. doi:10.1016/j.joca.2015.01.008

Grogan, S.P., Barbero, A., Diaz-Romero, J., Cleton-Jansen, A.-M., Soeder, S., Whiteside, R., Hogendoorn, P.C.W., Farhadi, J., Aigner, T., Martin, I., Mainil-Varlet, P., 2007. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthritis Rheum.* 56, 586–595. doi:10.1002/art.22408

Gudas, R., Kalesinskas, R.J., Kimtys, V., Stankevicius, E., Toliushis, V., Bernotavicius, G., Smailys, A., 2005. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.* 21, 1066–1075. doi:10.1016/j.arthro.2005.06.018

Guilak, F., Estes, B.T., Diekman, B.O., Moutos, F.T., Gimble, J.M., 2010. 2010 Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. *Clin. Orthop.* 468, 2530–2540. doi:10.1007/s11999-010-1410-9

Gullahorn, L., Lippiello, L., Karpman, R., 2005. Smoking and osteoarthritis: differential effect of nicotine on human chondrocyte glycosaminoglycan and collagen synthesis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 13, 942–943. doi:10.1016/j.joca.2005.03.001

Gullihorn, L., Karpman, R., Lippiello, L., 2005. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J. Orthop. Trauma* 19, 17–22.

Hangody, L., Kárpáti, Z., 1994. [New possibilities in the management of severe circumscribed cartilage damage in the knee]. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 37, 237–243.

Hardingham, T.E., Fosang, A.J., Dudhia, J., 1994. The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. J. Forum Eur. Clin. Chem. Soc.* 32, 249–257.

Harrison, M.H., Schajowicz, F., Trueta, J., 1953. Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. *J. Bone Joint Surg. Br.* 35-B, 598-626.

Hart, D.J., Spector, T.D., 1993. The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study. *J. Rheumatol.* 20, 331-335.

Hasegawa, A., Otsuki, S., Pauli, C., Miyaki, S., Patil, S., Steklov, N., Kinoshita, M., Koziol, J., D'Lima, D.D., Lotz, M.K., 2012. Anterior cruciate ligament changes in the human knee joint in aging and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 696-704. doi:10.1002/art.33417

Hatlapatka, T., Moretti, P., Lavrentieva, A., Hass, R., Marquardt, N., Jacobs, R., Kasper, C., 2011. Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions. *Tissue Eng. Part C Methods* 17, 485-493. doi:10.1089/ten.TEC.2010.0406

Hedlund, H., Mengarelli-Widholm, S., Heinegård, D., Reinholt, F.P., Svensson, O., 1994. Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 14, 227-232.

Hellingman, C.A., Davidson, E.N.B., Koevoet, W., Vitters, E.L., van den Berg, W.B., van Osch, G.J.V.M., van der Kraan, P.M., 2011. Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng. Part A* 17, 1157-1167. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0043

Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F., Richter, W., 2007. 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.* 211, 682-691. doi:10.1002/jcp.20977

Henningfield, J.E., Keenan, R.M., 1993. Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J. Consult. Clin. Psychol.* 61, 743-750.

Herning, R.I., Jones, R.T., Benowitz, N.L., Mines, A.H., 1983. How a cigarette is smoked determines blood nicotine levels. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33, 84-90.

Hida, N., Nishiyama, N., Miyoshi, S., Kira, S., Segawa, K., Uyama, T., Mori, T., Miyado, K., Ikegami, Y., Cui, C., Kiyono, T., Kyo, S., Shimizu, T., Okano, T., Sakamoto, M., Ogawa, S., Umezawa, A., 2008. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1695-1704. doi:10.1634/stemcells.2007-0826

Hiligsmann, M., Cooper, C., Arden, N., Boers, M., Branco, J.C., Luisa Brandi, M., Bruyère, O., Guillemin, F., Hochberg, M.C., Hunter, D.J., Kanis, J.A., Kvien, T.K., Laslop, A., Pelletier, J.-P., Pinto, D., Reiter-Niesert, S., Rizzoli, R., Rovati, L.C., Severens, J.L.H., Silverman, S., Tsouderos, Y., Tugwell, P., Reginster, J.-Y., 2013. Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin. Arthritis Rheum.*

43, 303–313. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.07.003

Hill, P., Haley, N.J., Wynder, E.L., 1983. Cigarette smoking: carboxyhemoglobin, plasma nicotine, cotinine and thiocyanate vs self-reported smoking data and cardiovascular disease. *J. Chronic Dis.* 36, 439–449.

Hochberg, M.C., 2005. Risk factors for the development and progression of hip osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 32, 1135–1136.

Hoffmann, D., Hoffmann, I., El-Bayoumy, K., 2001. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 767–790.

Hoogduijn, M.J., Cheng, A., Genever, P.G., 2009. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 18, 103–112.  
doi:10.1089/scd.2008.0032

Horie, M., Choi, H., Lee, R.H., Reger, R.L., Ylostalo, J., Muneta, T., Sekiya, I., Prockop, D.J., 2012. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 1197–1207.  
doi:10.1016/j.joca.2012.06.002

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., International Society for Cellular Therapy, 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395. doi:10.1080/14653240500319234

Huang, A.H.-C., Chen, Y.-K., Chan, A.W.-S., Shieh, T.-Y., Lin, L.-M., 2009. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J. Endod.* 35, 673–681.  
doi:10.1016/j.joen.2009.01.019

Hukkanen, J., Jacob, P., Benowitz, N.L., 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol. Rev.* 57, 79–115. doi:10.1124/pr.57.1.3

Hung, S.-P., Ho, J.H., Shih, Y.-R.V., Lo, T., Lee, O.K., 2012. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 30, 260–266. doi:10.1002/jor.21517

Improgo, M.R.D., Scofield, M.D., Tapper, A.R., Gardner, P.D., 2010. The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: dual role in nicotine addiction and lung cancer. *Prog. Neurobiol.* 92, 212–226. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.05.003

In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W.A., Claas, F.H.J., Willemze, R., Fibbe, W.E., Kanhai, H.H.H., 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548–1549.  
doi:10.1182/blood-2003-04-1291

Ishizuka, T., Goshima, H., Ozawa, A., Watanabe, Y., 2012. Effect of nicotine on the

proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells. *Curr. Med. Chem.* 19, 5164–5169.

Ishizuka, T., Ozawa, A., Goshima, H., Watanabe, Y., 2012. Involvement of nicotinic acetylcholine receptor in the proliferation of mouse induced pluripotent stem cells. *Life Sci.* 90, 637–648. doi:10.1016/j.lfs.2012.03.014

Jaiswal, P.K., Macmull, S., Bentley, G., Carrington, R.W.J., Skinner, J.A., Briggs, T.W.R., 2009. Does smoking influence outcome after autologous chondrocyte implantation?: A case-controlled study. *J. Bone Joint Surg. Br.* 91, 1575–1578. doi:10.1302/0301-620X.91B12.22879

Jankowski, R.J., Deasy, B.M., Huard, J., 2002. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.* 9, 642–647. doi:10.1038/sj.gt.3301719

Järvholm, B., Lewold, S., Malchau, H., Vingård, E., 2005. Age, bodyweight, smoking habits and the risk of severe osteoarthritis in the hip and knee in men. *Eur. J. Epidemiol.* 20, 537–542.

Jazedje, T., Secco, M., Vieira, N.M., Zucconi, E., Gollop, T.R., Vainzof, M., Zatz, M., 2009. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction in vitro. *J. Transl. Med.* 7, 6. doi:10.1186/1479-5876-7-6

Jensen, K., Nizamutdinov, D., Guerrier, M., Afroze, S., Dostal, D., Glaser, S., 2012. General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 4778–4787. doi:10.1096/fj.12-206458

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M., 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49. doi:10.1038/nature00870

Jordan, J.M., Helmick, C.G., Renner, J.B., Luta, G., Dragomir, A.D., Woodard, J., Fang, F., Schwartz, T.A., Abbate, L.M., Callahan, L.F., Kalsbeek, W.D., Hochberg, M.C., 2007. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* 34, 172–180.

Jordan, J.M., Linder, G.F., Renner, J.B., Fryer, J.G., 1995. The impact of arthritis in rural populations. *Arthritis Care Res. Off. J. Arthritis Health Prof. Assoc.* 8, 242–250.

Jouzeau, J.-Y., Moulin, D., Koufany, M., Sebillaud, S., Bianchi, A., Netter, P., 2008. [Pathophysiological relevance of peroxisome proliferators activated receptors (PPAR) to joint diseases - the pro and con of agonists]. *J. Soc. Biol.* 202, 289–312. doi:10.1051/jbio:2008034

Kakudo, N., Morimoto, N., Ogawa, T., Taketani, S., Kusumoto, K., 2015. Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1 $\alpha$  Activation. *PloS One* 10, e0139890. doi:10.1371/journal.pone.0139890

Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M., Tzartos, S.J., 2007. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J.* 274, 3799–3845. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x

Kawakita, A., Sato, K., Makino, H., Ikegami, H., Takayama, S., Toyama, Y., Umezawa, A., 2008. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *PloS One* 3, e3945. doi:10.1371/journal.pone.0003945

Kerkhof, H.J.M., Lories, R.J., Meulenbelt, I., Jonsdottir, I., Valdes, A.M., Arp, P., Ingvarsson, T., Jhamai, M., Jonsson, H., Stolk, L., Thorleifsson, G., Zhai, G., Zhang, F., Zhu, Y., van der Breggen, R., Carr, A., Doherty, M., Doherty, S., Felson, D.T., Gonzalez, A., Halldorsson, B.V., Hart, D.J., Hauksson, V.B., Hofman, A., Ioannidis, J.P.A., Kloppenburg, M., Lane, N.E., Loughlin, J., Luyten, F.P., Nevitt, M.C., Parimi, N., Pols, H.A.P., Rivadeneira, F., Slagboom, E.P., Styrkárssdóttir, U., Tsezou, A., van de Putte, T., Zmuda, J., Spector, T.D., Stefansson, K., Uitterlinden, A.G., van Meurs, J.B.J., 2010. A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22. *Arthritis Rheum.* 62, 499–510. doi:10.1002/art.27184

Khair, M., Bourhim, M., Barré, L., Li, D., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M., 2013. Regulation of xylosyltransferase I gene expression by interleukin 1 $\beta$  in human primary chondrocyte cells: mechanism and impact on proteoglycan synthesis. *J. Biol. Chem.* 288, 1774–1784. doi:10.1074/jbc.M112.419887

Kim, D.-W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.-D., Borlongan, C.V., 2013. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11692–11712. doi:10.3390/ijms140611692

Kim, S.Y., Kang, K.L., Lee, J.-C., Heo, J.S., 2012. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  and  $\beta 4$  subunits contribute nicotine-induced apoptosis in periodontal ligament stem cells. *Mol. Cells* 33, 343–350. doi:10.1007/s10059-012-2172-x

Knudson, C.B., Knudson, W., 2001. Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 69–78. doi:10.1006/scdb.2000.0243

Knutsen, G., Drogset, J.O., Engebretsen, L., Grøntvedt, T., Ludvigsen, T.C., Løken, S., Solheim, E., Strand, T., Johansen, O., 2016. A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. *J. Bone Joint Surg. Am.* 98, 1332–1339. doi:10.2106/JBJS.15.01208

Krannitz, K.W., Fong, H.W., Fallat, L.M., Kish, J., 2009. The effect of cigarette smoking on radiographic bone healing after elective foot surgery. *J. Foot Ankle Surg. Off. Publ. Am. Coll. Foot Ankle Surg.* 48, 525–527. doi:10.1053/j.jfas.2009.04.008

Kronenberg, H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336. doi:10.1038/nature01657

- Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., Kurosaka, M., 2007. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 226–231. doi:10.1016/j.joca.2006.08.008
- Landgraf, D., Barth, M., Layer, P.G., Sperling, L.E., 2010. Acetylcholine as a possible signaling molecule in embryonic stem cells: studies on survival, proliferation and death. *Chem. Biol. Interact.* 187, 115–119. doi:10.1016/j.cbi.2010.03.007
- Lavernia, C.J., Sierra, R.J., Gomez-Marin, O., 1999. Smoking and joint replacement: resource consumption and short-term outcome. *Clin. Orthop.* 172–180.
- Lax, P., Fucile, S., Eusebi, F., 2002. Ca(2+) permeability of human heteromeric nAChRs expressed by transfection in human cells. *Cell Calcium* 32, 53–58.
- Le Houezec, J., 2003. Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 7, 811–819.
- Lenz, R.W., Ax, R.L., First, N.L., 1982. Proteoglycan production by bovine granulosa cells in vitro is regulated by calmodulin and calcium. *Endocrinology* 110, 1052–1054. doi:10.1210/endo-110-3-1052
- Li, S., Zhao, T., Xin, H., Ye, L.-H., Zhang, X., Tanaka, H., Nakamura, A., Kohama, K., 2004. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit mediates migration of vascular smooth muscle cells toward nicotine. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 334–338.
- Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stoltz, J.-F., de Isla, N., 2014. Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed. Mater. Eng.* 24, 47–52. doi:10.3233/BME-140973
- Lievense, A.M., Bierma-Zeinstra, S.M.A., Verhagen, A.P., van Baar, M.E., Verhaar, J. a. N., Koes, B.W., 2002. Influence of obesity on the development of osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 41, 1155–1162.
- Lin, W., Hirata, N., Sekino, Y., Kanda, Y., 2012. Role of  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in normal and cancer stem cells. *Curr. Drug Targets* 13, 656–665.
- Lindell, G., Lunell, E., Graffner, H., 1996. Transdermally administered nicotine accumulates in gastric juice. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 51, 315–318.
- Loeser, R.F., 2010. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin. Geriatr. Med.* 26, 371–386. doi:10.1016/j.cger.2010.03.002
- Loeser, R.F., Collins, J.A., Diekman, B.O., 2016. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 412–420. doi:10.1038/nrrheum.2016.65
- Lohmander, L.S., Saxne, T., Heinegård, D.K., 1994. Release of cartilage oligomeric matrix

protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 8–13.

Lories, R.J., Luyten, F.P., 2011. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 43–49. doi:10.1038/nrrheum.2010.197

Losina, E., Weinstein, A.M., Reichmann, W.M., Burbine, S.A., Solomon, D.H., Daigle, M.E., Rome, B.N., Chen, S.P., Hunter, D.J., Suter, L.G., Jordan, J.M., Katz, J.N., 2013. Lifetime risk and age at diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US. *Arthritis Care Res.* 65, 703–711. doi:10.1002/acr.21898

Lotz, M., Loeser, R.F., 2012. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* 51, 241–248. doi:10.1016/j.bone.2012.03.023

Loughlin, J., 2001. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 111–116.

Loughlin, J., Dowling, B., Mustafa, Z., Chapman, K., 2002. Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 1519–1527. doi:10.1002/art.10260

Lourido, L., Calamia, V., Fernández-Puente, P., Mateos, J., Oreiro, N., Blanco, F.J., Ruiz-Romero, C., 2016. Secretome analysis of human articular chondrocytes unravels catabolic effects of nicotine on the joint. *Proteomics Clin. Appl.* 10, 671–680. doi:10.1002/prca.201400186

Lourido, L., Calamia, V., Mateos, J., Fernández-Puente, P., Fernández-Tajes, J., Blanco, F.J., Ruiz-Romero, C., 2014. Quantitative proteomic profiling of human articular cartilage degradation in osteoarthritis. *J. Proteome Res.* 13, 6096–6106. doi:10.1021/pr501024p

Luo, H., Li, J., Cao, H., Tan, Y., Magdalou, J., Chen, L., Wang, H., 2015. Prenatal caffeine exposure induces a poor quality of articular cartilage in male adult offspring rats via cholesterol accumulation in cartilage. *Sci. Rep.* 5, 17746. doi:10.1038/srep17746

Lützner, J., Kasten, P., Günther, K.-P., Kirschner, S., 2009. Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 309–316. doi:10.1038/nrrheum.2009.88

M. Carballosa, C., M. Greenberg, J., S. Cheung, H., 1 Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, University of Miami; Coral Gables, FL, USA, 2016. Expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in stem cells. *AIMS Bioeng.* 3, 245–263. doi:10.3934/bioeng.2016.3.245

Ma, L., Sham, M.H., Zheng, L.W., Cheung, L.K., 2011. Influence of low-dose nicotine on bone healing. *J. Trauma* 70, E117–121. doi:10.1097/TA.0b013e3181e80dab

Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., Pittenger, M.F., 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 4, 415–428.



Magdalou, J., Ouzzine, M., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., 2006. [Chondrocyte glycosyltransferases: new pharmacological targets for degenerative diseases of articular cartilage?]. *Bull. Académie Natl. Médecine* 190, 1385-1397-1398, 1475-1477.

Majore, I., Moretti, P., Hass, R., Kasper, C., 2009. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun. Signal. CCS* 7, 6. doi:10.1186/1478-811X-7-6

Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., Hass, R., Kasper, C., 2011. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 7, 17-31. doi:10.1007/s12015-010-9165-y

Makris, E.A., Gomoll, A.H., Malizos, K.N., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2015. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 21-34. doi:10.1038/nrrheum.2014.157

Mamidi, M.K., Das, A.K., Zakaria, Z., Bhonde, R., 2016. Mesenchymal stromal cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 24, 1307-1316. doi:10.1016/j.joca.2016.03.003

Marcacci, M., Kon, E., Moukhachev, V., Lavroukov, A., Kutepov, S., Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., 2007. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 13, 947-955. doi:10.1089/ten.2006.0271

Margossian, T., Reppel, L., Makdissy, N., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., Huselstein, C., 2012. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Biomed. Mater. Eng.* 22, 243-254. doi:10.3233/BME-2012-0714

María Lucía Gutiérrez, Johana Guevara, Luis Alejandro Barrera, 2012. Semi-automatic grading system in histologic and immunohistochemistry analysis to evaluate in vitro chondrogenesis. *Univ. Sci.* 167-178.

Maritz, G.S., 2002. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation of rats induce microscopic emphysema in the offspring. *Exp. Lung Res.* 28, 391-403. doi:10.1080/01902140290092010

Maritz, G.S., Dennis, H., 1998. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation interferes with alveolar development in the neonatal lung. *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 255-261.

Martel-Pelletier, J., Barr, A.J., Cicuttini, F.M., Conaghan, P.G., Cooper, C., Goldring, M.B., Goldring, S.R., Jones, G., Teichtahl, A.J., Pelletier, J.-P., 2016. Osteoarthritis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16072. doi:10.1038/nrdp.2016.72

Mauck, R.L., Yuan, X., Tuan, R.S., 2006. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 179-189. doi:10.1016/j.joca.2005.09.002

- Maumus, M., Jorgensen, C., Noël, D., 2013. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes. *Biochimie, Special section : The Mesenchymal Stem Cell secretome in Regenerative Medicine* 95, 2229–2234. doi:10.1016/j.biochi.2013.04.017
- McAlindon, T.E., Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Aliabadi, P., Weissman, B., Rush, D., Wilson, P.W., Jacques, P., 1996a. 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.* 125, 353–359.
- McAlindon, T.E., Jacques, P., Zhang, Y., Hannan, M.T., Aliabadi, P., Weissman, B., Rush, D., Levy, D., Felson, D.T., 1996b. Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum.* 39, 648–656.
- McAlindon, T.E., Snow, S., Cooper, C., Dieppe, P.A., 1992. Radiographic patterns of osteoarthritis of the knee joint in the community: the importance of the patellofemoral joint. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 844–849.
- Meirelles, L. da S., Fontes, A.M., Covas, D.T., Caplan, A.I., 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 419–427. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002
- Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K.W., Thébaud, B., Riordan, N.H., 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med.* 5, 57. doi:10.1186/1479-5876-5-57
- Michailovici, I., Harrington, H.A., Azogui, H.H., Yahalom-Ronen, Y., Plotnikov, A., Ching, S., Stumpf, M.P.H., Klein, O.D., Seger, R., Tzahor, E., 2014. Nuclear to cytoplasmic shuttling of ERK promotes differentiation of muscle stem/progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* 141, 2611–2620. doi:10.1242/dev.107078
- Minas, T., Gomoll, A.H., Solhpour, S., Rosenberger, R., Probst, C., Bryant, T., 2010. Autologous chondrocyte implantation for joint preservation in patients with early osteoarthritis. *Clin. Orthop.* 468, 147–157. doi:10.1007/s11999-009-0998-0
- Miranda, H., Viikari-Juntura, E., Martikainen, R., Riihimäki, H., 2002. A prospective study on knee pain and its risk factors. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 10, 623–630.
- Mitalipov, S., Wolf, D., 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 114, 185–199. doi:10.1007/10\_2008\_45
- Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R.J., Kreuz, P.C., Mandelbaum, B.R., 2009. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am. J. Sports Med.* 37, 2053–2063. doi:10.1177/0363546508328414
- Mobasheri, A., 2011. Applications of proteomics to osteoarthritis, a musculoskeletal disease characterized by aging. *Front. Physiol.* 2, 108. doi:10.3389/fphys.2011.00108

Mobasheri, A., Matta, C., Zákány, R., Musumeci, G., 2015. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas* 80, 237–244. doi:10.1016/j.maturitas.2014.12.003

Mollon, B., Kandel, R., Chahal, J., Theodoropoulos, J., 2013. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 21, 1824–1833. doi:10.1016/j.joca.2013.08.024

Moretti, P., Hatlapatka, T., Marten, D., Lavrentieva, A., Majore, I., Hass, R., Kasper, C., 2010. Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 123, 29–54. doi:10.1007/10\_2009\_15

Murphy, C.L., Polak, J.M., 2004. Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *J. Cell. Physiol.* 199, 451–459. doi:10.1002/jcp.10481

Musina, R.A., Belyavski, A.V., Tarusova, O.V., Solovyova, E.V., Sukhikh, G.T., 2008. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bull. Exp. Biol. Med.* 145, 539–543.

Musumeci, G., Loreto, C., Carnazza, M.L., Martinez, G., 2011. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* 19, 307–313. doi:10.1007/s00167-010-1215-0

Nauta, A.J., Fibbe, W.E., 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499–3506. doi:10.1182/blood-2007-02-069716

Nawaz, S.Z., Bentley, G., Briggs, T.W.R., Carrington, R.W.J., Skinner, J.A., Gallagher, K.R., Dhinsa, B.S., 2014. Autologous chondrocyte implantation in the knee: mid-term to long-term results. *J. Bone Joint Surg. Am.* 96, 824–830. doi:10.2106/JBJS.L.01695

Nemecz, Á., Prevost, M.S., Menny, A., Corringer, P.-J., 2016. Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* 90, 452–470. doi:10.1016/j.neuron.2016.03.032

Ng, T.K., Carballosa, C.M., Pelaez, D., Wong, H.K., Choy, K.W., Pang, C.P., Cheung, H.S., 2013. Nicotine alters MicroRNA expression and hinders human adult stem cell regenerative potential. *Stem Cells Dev.* 22, 781–790. doi:10.1089/scd.2012.0434

Ni, Q., Tan, Y., Zhang, X., Luo, H., Deng, Y., Magdalou, J., Chen, L., Wang, H., 2015. Prenatal ethanol exposure increases osteoarthritis susceptibility in female rat offspring by programming a low-functioning IGF-1 signaling pathway. *Sci. Rep.* 5, 14711. doi:10.1038/srep14711

Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1, 1559–1582. doi:10.1038/nprot.2006.236

Nöth, U., Steinert, A.F., Tuan, R.S., 2008. Technology insight: adult mesenchymal stem

cells for osteoarthritis therapy. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4, 371–380.  
doi:10.1038/ncprheum0816

Oda, H., Matsuzaki, H., Tokuhashi, Y., Wakabayashi, K., Uematsu, Y., Iwahashi, M., 2004. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* 9, 135–141.  
doi:10.1007/s00776-003-0759-y

O'Driscoll, S.W., Saris, D.B., Ito, Y., Fitzimmons, J.S., 2001. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 19, 95–103.  
doi:10.1016/S0736-0266(00)00014-0

Olsen, J., 1992. Cigarette smoking in pregnancy and fetal growth. Does the type of tobacco play a role? *Int. J. Epidemiol.* 21, 279–284.

Oshina, H., Sotome, S., Yoshii, T., Torigoe, I., Sugata, Y., Maehara, H., Marukawa, E., Omura, K., Shinomiya, K., 2007. Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Bone* 41, 575–583. doi:10.1016/j.bone.2007.06.022

Paccola, C.C., Miraglia, S.M., 2016. Prenatal and lactation nicotine exposure affects Sertoli cell and gonadotropin levels in rats. *Reprod. Camb. Engl.* 151, 117–133.  
doi:10.1530/REP-15-0135

Palotie, A., Väisänen, P., Ott, J., Ryhänen, L., Elima, K., Vikkula, M., Cheah, K., Vuorio, E., Peltonen, L., 1989. Predisposition to familial osteoarthrosis linked to type II collagen gene. *Lancet Lond. Engl.* 1, 924–927.

Park, Y.J., Lee, T., Ha, J., Jung, I.M., Chung, J.K., Kim, S.J., 2008. Effect of nicotine on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) migration and angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* 49, 32–36. doi:10.1016/j.vph.2008.05.001

Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G.P., Bilic, G., Bühring, H.-J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido, T., Portmann-Lanz, C.B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., Takahashi, T.A., Redl, H., Sakuragawa, N., Wolbank, S., Zeisberger, S., Zisch, A., Strom, S.C., 2008. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 300–311. doi:10.1634/stemcells.2007-0594

Patki, S., Kadam, S., Chandra, V., Bhonde, R., 2010. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum. Cell* 23, 35–40. doi:10.1111/j.1749-0774.2010.00083.x

Pauli, C., Grogan, S.P., Patil, S., Otsuki, S., Hasegawa, A., Koziol, J., Lotz, M.K., D'Lima, D.D., 2011. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1132–1141. doi:10.1016/j.joca.2011.05.008

Payne, K.A., Didiano, D.M., Chu, C.R., 2010. Donor sex and age influence the chondrogenic

potential of human femoral bone marrow stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 705–713. doi:10.1016/j.joca.2010.01.011

Phinney, D.G., Prockop, D.J., 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2896–2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637

Pitsillides, A.A., Beier, F., 2011. Cartilage biology in osteoarthritis—lessons from developmental biology. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 654–663. doi:10.1038/nrrheum.2011.129

Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., Lavery, S., 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop.* S26-33.

Poole, A.R., Rosenberg, L.C., Reiner, A., Ionescu, M., Bogoch, E., Roughley, P.J., 1996. Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 14, 681–689. doi:10.1002/jor.1100140502

Porter, S.E., Hanley, E.N., 2001. The musculoskeletal effects of smoking. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 9, 9–17.

Prieto-Alhambra, D., Judge, A., Javaid, M.K., Cooper, C., Diez-Perez, A., Arden, N.K., 2014. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1659–1664. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203355

Prydz, K., Dalen, K.T., 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Sci.* 113 Pt 2, 193–205.

Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S.M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., Marcacci, M., 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 344, 385–386. doi:10.1056/NEJM200102013440516

Reppel, L., Schiavi, J., Charif, N., Leger, L., Yu, H., Pinzano, A., Henrionnet, C., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., Huselstein, C., 2015. Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton's jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 260. doi:10.1186/s13287-015-0263-2

Richette, P., Corvol, M., Bardin, T., 2003. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 70, 257–262.

Riffault, M., Moulin, D., Grossin, L., Mainard, D., Magdalou, J., Vincourt, J.-B., 2015. Label-free relative quantification applied to LC-MALDI acquisition for rapid analysis of chondrocyte secretion modulation. *J. Proteomics* 114, 263–273. doi:10.1016/j.jprot.2014.10.026

- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., Dani, C., 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125–128. doi:10.1016/j.biochi.2004.11.007
- Roughley, P.J., Lee, E.R., 1994. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc. Res. Tech.* 28, 385–397. doi:10.1002/jemt.1070280505
- Roux, C., Pisani, D.F., Yahia, H.B., Djedaini, M., Beranger, G.E., Chambard, J.-C., Ambrosetti, D., Michiels, J.-F., Breuil, V., Ailhaud, G., Euller-Ziegler, L., Amri, E.-Z., 2013. Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: A powerful pharmacological tool. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 786–791. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.012
- Ruiz, J.P., Pelaez, D., Dias, J., Ziebarth, N.M., Cheung, H.S., 2012. The effect of nicotine on the mechanical properties of mesenchymal stem cells. *Cell Health Cytoskelet.* 4, 29–35. doi:10.2147/CHC.S24381
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., Mahon, B.P., 2007. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 353–363. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x
- Ryan, J.M., Barry, F.P., Murphy, J.M., Mahon, B.P., 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflamm. Lond. Engl.* 2, 8. doi:10.1186/1476-9255-2-8
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T., 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52, 2521–2529. doi:10.1002/art.21212
- Saklatvala, J., 2007. Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-kappaB pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis. *Curr. Drug Targets* 8, 305–313.
- Salazar, V.S., Gamer, L.W., Rosen, V., 2016. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 203–221. doi:10.1038/nrendo.2016.12
- Samanta, A., Jones, A., Regan, M., Wilson, S., Doherty, M., 1993. Is osteoarthritis in women affected by hormonal changes or smoking? *Br. J. Rheumatol.* 32, 366–370.
- Sandberg, M., Vuorio, E., 1987. Localization of types I, II, and III collagen mRNAs in developing human skeletal tissues by in situ hybridization. *J. Cell Biol.* 104, 1077–1084.
- Sandell, L.J., 2012. Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 77–89. doi:10.1038/nrrheum.2011.199
- Sandmark, H., Hogstedt, C., Lewold, S., Vingård, E., 1999. Osteoarthrosis of the knee in men and women in association with overweight, smoking, and hormone therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 58, 151–155.
- Scharstuhl, A., Schewe, B., Benz, K., Gaissmaier, C., Bühring, H.-J., Stoop, R., 2007. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 3244–3251.

doi:10.1634/stemcells.2007-0300

Schelbergen, R.F., van Dalen, S., ter Huurne, M., Roth, J., Vogl, T., Noël, D., Jorgensen, C., van den Berg, W.B., van de Loo, F.A., Blom, A.B., van Lent, P.L.E.M., 2014. Treatment efficacy of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis is driven by high synovial activation and reflected by S100A8/A9 serum levels. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 22, 1158–1166. doi:10.1016/j.joca.2014.05.022

Schouten, J.S., van den Ouweland, F.A., Valkenburg, H.A., 1992. A 12 year follow up study in the general population on prognostic factors of cartilage loss in osteoarthritis of the knee. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 932–937.

Schraufstatter, I.U., DiScipio, R.G., Khaldoyanidi, S.K., 2009. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells. *J. Stem Cells* 4, 203–215. doi:jsc.2010.4.4.203

Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Reger, R.L., Prockop, D.J., 2005. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* 320, 269–276. doi:10.1007/s00441-004-1075-3

Seroby, N., Schraufstatter, I.U., Strongin, A., Khaldoyanidi, S.K., 2005. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated stimulation of endothelial cells results in the arrest of haematopoietic progenitor cells on endothelium. *Br. J. Haematol.* 129, 257–265. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05446.x

Sethe, S., Scutt, A., Stolzing, A., 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5, 91–116. doi:10.1016/j.arr.2005.10.001

Sharma, L., Kapoor, D., Issa, S., 2006. Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18, 147–156. doi:10.1097/01.bor.0000209426.84775.f8

Shen, J.-X., Qin, D., Wang, H., Wu, C., Shi, F.-D., Wu, J., 2013. Roles of nicotinic acetylcholine receptors in stem cell survival/apoptosis, proliferation and differentiation. *Curr. Mol. Med.* 13, 1455–1464.

Shen, Z., Gantcheva, S., Månsson, B., Heinegård, D., Sommarin, Y., 1998. Chondroadherin expression changes in skeletal development. *Biochem. J.* 330 ( Pt 1), 549–557.

Silverwood, V., Blagojevic-Bucknall, M., Jinks, C., Jordan, J.L., Protheroe, J., Jordan, K.P., 2014. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* doi:10.1016/j.joca.2014.11.019

Sloan, A., Hussain, I., Maqsood, M., Eremin, O., El-Sheemy, M., 2010. The effects of smoking on fracture healing. *Surg. J. R. Coll. Surg. Edinb. Irel.* 8, 111–116. doi:10.1016/j.surge.2009.10.014

Sophia Fox, A.J., Bedi, A., Rodeo, S.A., 2009. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1, 461–468.

doi:10.1177/1941738109350438

Sopori, M., 2002. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 372–377. doi:10.1038/nri803

Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Salagianni, M., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., 2006. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 462–471. doi:10.1634/stemcells.2004-0331

Sowers, M.R., McConnell, D., Jannausch, M., Buyuktur, A.G., Hochberg, M., Jamadar, D.A., 2006. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 2481–2487. doi:10.1002/art.22005

Spahn, G., Hofmann, G.O., Klinger, H.M., 2013. The effects of arthroscopic joint debridement in the knee osteoarthritis: results of a meta-analysis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* 21, 1553–1561. doi:10.1007/s00167-012-2169-1

Spector, T.D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J., Hart, D., 1996. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 312, 940–943.

Spector, T.D., MacGregor, A.J., 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 12 Suppl A, S39-44.

Srikanth, V.K., Fryer, J.L., Zhai, G., Winzenberg, T.M., Hosmer, D., Jones, G., 2005. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 769–781. doi:10.1016/j.joca.2005.04.014

Stanovici, J., Le Nail, L.-R., Brennan, M.A., Vidal, L., Trichet, V., Rosset, P., Layrolle, P., 2016. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Curr. Res. Transl. Med.* 64, 83–90. doi:10.1016/j.retram.2016.04.006

Steadman, J.R., Briggs, K.K., Rodrigo, J.J., Kocher, M.S., Gill, T.J., Rodkey, W.G., 2003a. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.* 19, 477–484. doi:10.1053/jars.2003.50112

Steadman, J.R., Miller, B.S., Karas, S.G., Schlegel, T.F., Briggs, K.K., Hawkins, R.J., 2003b. The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. *J. Knee Surg.* 16, 83–86.

Swan, G.E., Benowitz, N.L., Lessov, C.N., Jacob, P., Tyndale, R.F., Wilhelmsen, K., 2005. Nicotine metabolism: the impact of CYP2A6 on estimates of additive genetic influence. *Pharmacogenet. Genomics* 15, 115–125.

Takeuchi, H., Yanagida, T., Inden, M., Takata, K., Kitamura, Y., Yamakawa, K., Sawada, H., Izumi, Y., Yamamoto, N., Kihara, T., Uemura, K., Inoue, H., Taniguchi, T., Akaike, A., Takahashi, R., Shimohama, S., 2009. Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J. Neurosci. Res.*



87, 576–585. doi:10.1002/jnr.21869

Tang, X.-P., Zhang, M., Yang, X., Chen, L.-M., Zeng, Y., 2006. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes in vivo and in vitro. *World J. Gastroenterol.* 12, 4014–4019.

Tepper, S., Hochberg, M.C., 1993. Factors associated with hip osteoarthritis: data from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-I). *Am. J. Epidemiol.* 137, 1081–1088.

Tie, K., Tan, Y., Deng, Y., Li, J., Ni, Q., Magdalou, J., Chen, L., Wang, H., 2016a. Prenatal nicotine exposure induces poor articular cartilage quality in female adult offspring fed a high-fat diet and the intrauterine programming mechanisms. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 60, 11–20. doi:10.1016/j.reprotox.2015.12.010

Tie, K., Zhang, X., Tan, Y., Deng, Y., Li, J., Ni, Q., Wang, H., Chen, L., 2016b. Intrauterine low-functional programming of IGF1 by prenatal nicotine exposure mediates the susceptibility to osteoarthritis in female adult rat offspring. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30, 785–797. doi:10.1096/fj.15-274399

Troyer, D.L., Weiss, M.L., 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 591–599. doi:10.1634/stemcells.2007-0439

Tsuchiya, H., Kitoh, H., Sugiura, F., Ishiguro, N., 2003. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 338–343.

Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E., Takagishi, K., Kato, Y., 2001. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 413–419. doi:10.1006/bbrc.2001.5777

Tuan, R.S., Boland, G., Tuli, R., 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 5, 32–45.

Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Huang, X., Manner, P.A., Hozack, W.J., Danielson, K.G., Hall, D.J., Tuan, R.S., 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* 278, 41227–41236. doi:10.1074/jbc.M305312200

Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C.M., Hu, W.-S., 2005. Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 12–27. doi:10.1263/jbb.100.12

Valdes, A.M., Spector, T.D., 2011. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 23–32. doi:10.1038/nrrheum.2010.191

van Saase, J.L., Vandenbroucke, J.P., van Romunde, L.K., Valkenburg, H.A., 1988. Osteoarthritis and obesity in the general population. A relationship calling for an

explanation. *J. Rheumatol.* 15, 1152–1158.

Vandewalle, B., Revillion, F., Hornez, L., Lefebvre, J., 1994. Calcium regulation of heparan sulfate proteoglycans in breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120, 389–392.

Vasiliadis, H.S., Wasiak, J., 2010. Autologous chondrocyte implantation for full thickness articular cartilage defects of the knee. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003323. doi:10.1002/14651858.CD003323.pub3

Venkatesan, N., Barré, L., Benani, A., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M., 2004. Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: a strategy to promote cartilage repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 18087–18092. doi:10.1073/pnas.0404504102

Venkatesan, N., Barré, L., Magdalou, J., Mainard, D., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M., 2009. Modulation of xylosyltransferase I expression provides a mechanism regulating glycosaminoglycan chain synthesis during cartilage destruction and repair. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 813–822. doi:10.1096/fj.08-118166

Versier, G., Barbier, O., 2014. Techniques de reconstruction cartilagineuse. *Tech. Chir. - Orthopédie-Traumatol.* doi:10.1016/S0246-0467(14)62955-X

Vijayagopal, P., Subramaniam, P., 2001. Effect of calcium channel blockers on proteoglycan synthesis by vascular smooth muscle cells and low density lipoprotein--proteoglycan interaction. *Atherosclerosis* 157, 353–360.

Villaron, E.M., Almeida, J., López-Holgado, N., Alcoceba, M., Sánchez-Abarca, L.I., Sanchez-Guijo, F.M., Alberca, M., Pérez-Simon, J.A., San Miguel, J.F., Del Cañizo, M.C., 2004. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 89, 1421–1427.

Vincourt, J.-B., Etienne, S., Grossin, L., Cottet, J., Bantsimba-Malanda, C., Netter, P., Mainard, D., Libante, V., Gillet, P., Magdalou, J., 2012. Matrilin-3 switches from anti- to pro-anabolic upon integration to the extracellular matrix. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 31, 290–298. doi:10.1016/j.matbio.2012.03.004

Wang, D.W., Fermor, B., Gimble, J.M., Awad, H.A., Guilak, F., 2005. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.* 204, 184–191. doi:10.1002/jcp.20324

Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K., Weiss, M.L., Detamore, M.S., 2009. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* 15, 2259–2266. doi:10.1089/ten.tea.2008.0393

Wang, X.-J., Liu, Y.-F., Wang, Q.-Y., Tsuruoka, M., Ohta, K., Wu, S.-X., Yakushiji, M., Inoue, T., 2010. Functional expression of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues. *Cell Tissue Res.* 340, 347–355. doi:10.1007/s00441-010-0949-9

Watanabe, H., Yamada, Y., Kimata, K., 1998. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J. Biochem. (Tokyo)* 124, 687–693.

Weiss, M.L., Medicetty, S., Bledsoe, A.R., Rachakatla, R.S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M.S., Velagaleti, G., Troyer, D., 2006. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 781–792. doi:10.1634/stemcells.2005-0330

Weiss, M.L., Troyer, D.L., 2006. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2, 155–162. doi:10.1007/s12015-006-0022-y

Wilder, F.V., Hall, B.J., Barrett, J.P., 2003. Smoking and osteoarthritis: is there an association? The Clearwater Osteoarthritis Study. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 11, 29–35.

Wipfli, H., Samet, J.M., 2009. Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. *Clin. Pharmacol. Ther.* 86, 263–271. doi:10.1038/clpt.2009.93

Witkowska-Zimny, M., Wrobel, E., 2011. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 16, 493–514. doi:10.2478/s11658-011-0019-7

Wong, L.S., Martins-Green, M., 2004. Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 12, 471–484. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12403.x

Wong, M.K., Holloway, A.C., Hardy, D.B., 2016. Nicotine Directly Induces Endoplasmic Reticulum Stress Response in Rat Placental Trophoblast Giant Cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 151, 23–34. doi:10.1093/toxsci/kfw019

Wong, M.K., Nicholson, C.J., Holloway, A.C., Hardy, D.B., 2015. Maternal nicotine exposure leads to impaired disulfide bond formation and augmented endoplasmic reticulum stress in the rat placenta. *PloS One* 10, e0122295. doi:10.1371/journal.pone.0122295

Woolf, A.D., Pfleger, B., 2003. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull. World Health Organ.* 81, 646–656.

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A., 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528–1534.

Wu, W.K.K., Cho, C.H., 2004. The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 348–358.

Yamamoto, Y., Fujita, M., Tanaka, Y., Kojima, I., Kanatani, Y., Ishihara, M., Tachibana, S., 2013. Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells. *BioResearch Open Access* 2, 199–205.

doi:10.1089/biores.2013.0004

Ying, X., Cheng, S., Shen, Y., Cheng, X., An Rompis, F., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., Kou, D., Peng, L., Tian, X.Q., Lu, C.Z., 2012a. Nicotine promotes proliferation and collagen synthesis of chondrocytes isolated from normal human and osteoarthritis patients. *Mol. Cell. Biochem.* 359, 263–269. doi:10.1007/s11010-011-1020-1

Ying, X., Zhang, W., Cheng, S., Nie, P., Cheng, X., Shen, Y., Wang, W., Xue, E., Chen, Q., Kou, D., Peng, L., Zhang, Y., Lu, C., 2012b. Nicotine-induced chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in vitro. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* 20, 2329–2336. doi:10.1007/s00167-012-1890-0

Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Johnstone, B., 1998. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80, 1745–1757.

Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2009. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237–241. doi:10.1016/j.stem.2009.08.001

Yu, J., Huang, N.F., Wilson, K.D., Velotta, J.B., Huang, M., Li, Z., Lee, A., Robbins, R.C., Cooke, J.P., Wu, J.C., 2009. nAChRs mediate human embryonic stem cell-derived endothelial cells: proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *PloS One* 4, e7040. doi:10.1371/journal.pone.0007040

Zablotni, A., Dakischew, O., Trinkaus, K., Hartmann, S., Szalay, G., Heiss, C., Lips, K.S., 2015. Regulation of acetylcholine receptors during differentiation of bone mesenchymal stem cells harvested from human reaming debris. *Int. Immunopharmacol.* 29, 119–126. doi:10.1016/j.intimp.2015.07.021

Zamli, Z., Sharif, M., 2011. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *Int. J. Rheum. Dis.* 14, 159–166. doi:10.1111/j.1756-185X.2011.01618.x

Zdravkovic, T., Genbacev, O., LaRocque, N., McMaster, M., Fisher, S., 2008. Human embryonic stem cells as a model system for studying the effects of smoke exposure on the embryo. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 26, 86–93. doi:10.1016/j.reprotox.2008.07.004

Zeng, H.-L., Qin, Y.-L., Chen, H.-Z., Bu, Q.-Q., Li, Y., Zhong, Q., Han, X.-A., Chen, J., Yu, P.-X., Liu, G.-X., 2014. Effects of nicotine on proliferation and survival in human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 28, 181–189. doi:10.1002/jbt.21551

Zhang, Y., Jordan, J.M., 2010. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin. Geriatr. Med.* 26, 355–369. doi:10.1016/j.cger.2010.03.001

Zhang, Y., McNeill, E., Tian, H., Soker, S., Andersson, K.-E., Yoo, J.J., Atala, A., 2008. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J. Urol.* 180, 2226–2233. doi:10.1016/j.juro.2008.07.023

Zhang, Y., Xu, L., Nevitt, M.C., Niu, J., Goggins, J.P., Aliabadi, P., Yu, W., Lui, L.-Y., Felson,

D.T., 2003. Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in Beijing compared with white subjects in the United States: the Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 48, 1034–1040. doi:10.1002/art.10928

Zhao, Z., Reece, E.A., 2005. Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 74, 383–391. doi:10.1002/bdrb.20052

Zheng, X., Xia, C., Chen, Z., Huang, J., Gao, F., Li, G., Zhang, B., 2012. Requirement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for the effect of nicotine on interleukin-1 $\beta$ -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 606–612. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.045

Zhou, G., Liu, W., Cui, L., Wang, X., Liu, T., Cao, Y., 2006. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng.* 12, 3209–3221. doi:10.1089/ten.2006.12.3209

Zhou, Z., Li, B., Dong, Z., Liu, F., Zhang, Y., Yu, Y., Shang, F., Wu, L., Wang, X., Jin, Y., 2013. Nicotine deteriorates the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor regulating wnt pathway. *PloS One* 8, e83102. doi:10.1371/journal.pone.0083102

Zhuo, Q., Yang, W., Chen, J., Wang, Y., 2012. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 729–737. doi:10.1038/nrrheum.2012.135

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228. doi:10.1089/107632701300062859

Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., Maini, R.N., 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2, 477–488. doi:10.1186/ar130

# Annexe 1

## **Article dans des revues internationaux avec comité de lecture:**

(1). Effect of nicotine on the proliferation and chondrogenic differentiation of the human Wharton's jelly mesenchymal stem cells.

Xu Yang, Yongjian Qi, Léonore Avercenc-Léger, Jean-Baptiste Vincourt, Sébastien Hupont, Céline Huselstein, Hui Wang, Liaobin Chen, Jacques Magdalou.

Biomed Mater Eng. 2017;28(s1):S217-S228. doi: 10.3233/BME-171644.

## **Travaux en collaboration:**

(2). The cytotoxic effects of Levofloxacin on rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro.

Xu Yang, Yu Deng, Lin Jin, Tian Xia, Ni Yu, Jingfeng Li, Rihan Shu, Xi Wang, Shaobo Zhu.

Toxicology *in vitro*. Under review

(3). Three-dimensional printing akermanite porous scaffolds for load-bearing bone defect repair: An investigation of osteogenic capability and mechanical evolution.

An Liu, Miao Sun, Xianyan Yang, Chiyuan Ma, Yanming Liu, Xu Yang, Shigui Yan and Zhongru Gou.

J Biomater Appl. 2016 Nov; 31(5):650-660. Epub 2016 Sep 1.

## **Travaux cliniques:**

(4). Investigation of perioperative hidden blood loss of unstable intertrochanteric fracture in the elderly treated with different intramedullary fixations.

Xu Yang, Wu Qiang, Xin Wang.

Injury, under review

(5). A retrospective study of antibiotic prophylaxis value in routine knee arthroscopy.

Xu Yang, Yongjian Qi, Zhengqi Pan<sup>1</sup>, Hua Wang, Liaobin Chen.

Der Orthopäde, under review

(6) Study of gender difference on perioperative hidden blood loss of intertrochanteric fracture.

Qiang Wu, Xin Wang, Xu Yang, Liaobin Chen.

Chin J Orthop, 2017,37(01):31-35 DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2352.2017.01.005

### **Communications orales dans un congrès international et national:**

(1). Effect of nicotine on the proliferation and chondrogenic differentiation of the human

Wharton's jelly mesenchymal stem cells.

Xu Yang, Jean-Baptiste Vincourt, Hui Wang, Liaobin Chen, Jacques Magdalou.

Congrès de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, SOFCOT,

Paris, Novembre, 2016

(3). La consommation tabagique comme facteur de risque environnemental de l'arthrose : rôle de la nicotine dans la différenciation des chondrocytes humains arthrosiques.

Xu Yang, Jacques MAGDALOU.

Journée scientifique de l'école doctoral BioSE, Vandœuvre-lès-Nancy, 4 décembre, 2014.

### **Communications par affiche/Poster:**

(1). Effect of nicotine on human chondrocyte and on the proliferation and differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells.

Xu Yang, Léonore Avercenc-Léger, Jean-Baptiste Vincourt, Sébastien Hupont, Céline Huselstein, Hui Wang, Liaobin Chen, Jacques Magdalou.

6th International Symposium Europe China: Molecular, Cellular and Tissue Engineering," and Clinical Applications, Vandœuvre-lès-Nancy, July 11-13, 2016

(2). Evaluation of a Modified Enlacement Technique for Tension Band Stabilization of Comminuted Fractures of the Patella.

Xu Yang, Qiang Wu, Liaobin Chen, Henry Coudane, Xin Wang.

Congrès de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, SOFCOT,  
Paris, Novembre, 2016

(3). Investigation of perioperative hidden blood loss of unstable intertrochanteric fracture in old patients treated with different intramedullary fixations.

Xu Yang, Qiang Wu, Liaobin Chen, Henry Coudane, Xin Wang.

Congrès de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, SOFCOT,  
Paris, Novembre, 2016

(4). Investigation of perioperative hidden blood loss of unstable intertrochanteric fracture in old patients.

Xu Yang, Qiang Wu, Xin Wang.

Chinese Orthopaedic Association 11th International Congress, Beijing, China, Novembre,  
2016



## Annexe 2

Article publié à Bio-Medical Materials and Engineering

### **Effect of nicotine on the proliferation and chondrogenic differentiation of the human Wharton's jelly mesenchymal stem cells**

Xu YANG<sup>a,b,1</sup>, Yongjian QI<sup>b,1</sup>, Léonore AVERCENC-LEGER<sup>a</sup>, Sébastien HUPONT<sup>c</sup>, Céline HUSELSTEIN<sup>a</sup>, Hui WANG<sup>d,e</sup>, Liaobin CHEN<sup>b</sup>, Jacques MAGDALOU<sup>a,\*</sup>

a UMR 7365 CNRS-UL, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

b Department of Orthopaedic Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

c Bio-ingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique FR3209 CNRS, Campus Biologie Santé, Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

d Department of Pharmacology, Basic Medical School of Wuhan University, Wuhan 430071, China

e Hubei Provincial Key Laboratory of Developmentally Originated Disease, Wuhan 430071, China

<sup>1</sup>Xu YANG and Yongjian Qi contributed equally to the article and they are common first authors.

#### ABSTRACT

**BACKGROUND:** Osteoarthritis (OA) is a chronic joint disease characterized by a progressive and irreversible degeneration of articular cartilage. Among the environmental risk factors of OA, tobacco consumption features prominently, although, there is a great controversy regarding the role of tobacco smoking in OA development. Among the numerous chemicals present in cigarette smoke, nicotine is one of the most physiologically active molecules.

**OBJECTIVE:** The aim of the study was (i) to measure the impact of nicotine on the proliferation and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from the human Wharton's jelly (hWJ-MSCs) into chondrocytes, (ii) to investigate whether the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) was expressed in hWJ-MSCs and could play a role in the

process. The project benefits from the availability of an umbilical cord bank from which hWJ-MSCs were originated.

**METHODS:** The hWJ-MSCs were cultured and used up to passage 5. The proliferation of hWJ-MSCs with 5  $\mu$ M nicotine was measured by the MTT assay on the 1st, 2nd, 3rd, and 6th day. Flow cytometry analysis was used to detect cell apoptosis/necrosis by Annexin V/PI double-staining. The chondrogenic differentiation grade of hWJ-MSCs was assessed by the Sirius red and Alcian blue staining. The expression of marker genes was followed by quantitative real-time PCR. The expression of nAChRs was followed by RT-PCR. The functional activity of  $\alpha 7$  nAChR was evaluated by calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) influx mediated by nicotine using the Fluo-4 NW Calcium assay.

**RESULTS:** The proliferation of hWJ-MSCs was significantly impaired by nicotine (5  $\mu$ M) from the 3<sup>rd</sup> day, but nicotine did not significantly induce modifications on the viability of hWJ-MSCs. Alcian blue staining indicated that the amount of proteoglycan was more abundant in control group than in the nicotine group, but no difference was observed on the total collagens amount using Sirius red staining. The mRNA expression of Sox9, type II collagen (Col2a1), aggrecan in control group was higher than in the nicotine group. We found that hWJ-MSCs expressed  $\alpha 7$  nAChR. The receptor agonist nicotine caused calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) influx into hWJ-MSCs suggesting that the calcium ion channel  $\alpha 7$  homopolymer could mediate this response.

**CONCLUSIONS:** At the concentration used, nicotine had an adverse effect on the proliferation and chondrogenic differentiation of hWJ-MSCs which was probably impaired through  $\alpha 7$  nAChR mediation.

**KEYWORDS:** Nicotine, Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells, Chondrogenic differentiation, Nicotinic acetylcholine receptor, Osteoarthritis

## Résumé

Parmi les facteurs de risque environnementaux de l'arthrose, la consommation de tabac occupe une place importante, mais reste encore controversée. Parmi les 4000 composés présents dans la cigarette, la nicotine est l'une des molécules les plus actives physiologiquement. Au cours de ce travail, nous avons étudié l'impact de la nicotine sur les chondrocytes humains et la prolifération et la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton (CSM-GW). Nous avons trouvé que la nicotine aux concentrations utilisées n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire, mais induit une augmentation de l'expression de la métalloprotéinase matricielle (MMP13) dans les chondrocytes humains. Ces données suggèrent que la nicotine a un effet pro-catabolique sur les chondrocytes humains, en stimulant la dégradation des composants matriciels. Chez des patients arthrosiques fumeurs, les voies de synthèse et de dégradation des composants matriciels sont plus activées dans les chondrocytes par rapport aux non fumeurs. De plus, la nicotine inhibe la prolifération et la migration cellulaire de CSM-GW, et présente un effet délétère sur la chondrogénèse de CSM-GW. Elle stimule la réaction inflammatoire et la différenciation hypertrophique. Nous avons montré, pour la première fois, l'expression du nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), en particulier de la sous unité  $\alpha 7$  dans les CSM-GW aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. L'effet délétère de la nicotine sur les CSM-GW serait probablement médiée par la sous unité  $\alpha 7$  nAChR. De façon intéressante, l' $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX), inhibiteur spécifique de  $\alpha 7$  nAChR, peut réverser cet effet partiellement. En conclusion, nous suggérons que la nicotine pourrait altérer l'ontogénèse du cartilage, et induire potentiellement l'augmentation de la prévalence de l'arthrose chez l'adulte.

Mots clés : Nicotine, Chondrocytes, Cellules souches mésenchymateuses, Différenciation chondrogénique, Récepteurs nicotiniques, Arthrose

## Abstract

Among the environmental risk factors for osteoarthritis (OA), tobacco consumption features prominently but is still controversial today. Among the 4,000 compounds present in cigarette smoke, nicotine is one of the most physiologically active molecules. The aim of the study is to measure the impact of nicotine on human chondrocytes and on the proliferation and chondrogenic differentiation of Wharton's Jelly stem cells (WJ-MSC). We found that nicotine at the concentrations used had no effect on the proliferation of primary human OA chondrocytes, but induced an increase in the expression of matrix metalloproteases (MMP13). It unravels the catabolic effects of nicotine in the joint by stimulating matrix degradation. This result suggests a pro-catabolic effect of nicotine in the joint by stimulating matrix degradation. In smokers, the synthesis as well as the degradation pathways in chondrocytes are stimulated, when compared to no smokers. In addition, the cell proliferation and migration of WJ-MSC were significantly impaired by nicotine, and it also had an adverse effect on the chondrogenesis of WJ-MSC by stimulating the inflammatory response and hypertrophic differentiation. We have shown, for the first time, the expression of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), in particular that of the  $\alpha 7$  subunit in the WJ-MSC at the transcriptional and translational levels. The adverse effect of nicotine on WJ-MSC was probably mediated by  $\alpha 7$  nAChR. Interestingly,  $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX), a specific inhibitor of  $\alpha 7$  nAChR, could partially reverse this effect. In conclusion the results show that nicotine has an adverse effect on the ontogenesis of cartilage, and potentially induces an increase in the prevalence of osteoarthritis in adults.

Keywords: Nicotine, Chondrocytes, Mesenchymal stem cells, Chondrogenic differentiation, Nicotinic receptors, Osteoarthritis