



HAL
open science

Rôle de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le remodelage pathologique de la jonction ostéocondrale au cours de l'arthrose

Sandy van Eegher

► **To cite this version:**

Sandy van Eegher. Rôle de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le remodelage pathologique de la jonction ostéocondrale au cours de l'arthrose. *Phytopathologie et phytopharmacie*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066499 . tel-02366970

HAL Id: tel-02366970

<https://theses.hal.science/tel-02366970>

Submitted on 17 Nov 2019

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.

THESE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

Sandy VAN EEGHER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Rôle de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le remodelage pathologique de la jonction ostéocondrale au cours de l'arthrose

Soutenue le 15 novembre 2017 devant le jury composé de :

Dr. Mustapha ROUIS	Président du jury
Dr. Xavier HOUARD	Directeur de thèse
Dr. Laurence LEGEAI-MALLET	Rapporteur
Pr. David MAGNE	Rapporteur
Dr. Hervé KEMPF	Examineur
Dr. Frédéric DE CEUNINCK	Examineur
Pr. Francis BERENBAUM	Examineur

RESUME : Rôle de de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose

L'arthrose (OA) est la pathologie articulaire la plus fréquente, qui touche l'ensemble des tissus de l'articulation. Le remodelage pathologique de ces tissus va être à l'origine de douleurs, de raideurs, de déformations et de perte de fonction de l'articulation. Au cours de cette pathologie, la disparition du cartilage résulte de la protéolyse de sa matrice extracellulaire mais aussi d'une réactivation du processus d'ossification endochondrale. En effet, une différenciation hypertrophique des chondrocytes, une minéralisation du cartilage, une angiogenèse ostéochondrale et un remodelage de l'os sous-chondral sont observés dans l'articulation OA. Nous avons confirmé le lien entre le nombre de chondrocytes hypertrophiques détectés par immunomarquage de l'ostéocalcine (OC), la vascularisation de la jonction ostéochondrale (CD34) et la progression de l'arthrose dans des cartilages arthrosiques humains (n=33).

L'angiogenèse ostéochondrale pourrait jouer un rôle essentiel dans l'OA mais les mécanismes moléculaires qui la gouvernent restent inconnus. Nous supposons que la différenciation hypertrophique des chondrocytes jouerait un rôle clé dans l'angiogenèse ostéochondrale à travers un déséquilibre entre la production de facteurs angiogéniques et angiostatiques. Le potentiel angiogénique des chondrocytes hypertrophiques a été étudié dans un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes articulaires murins en culture primaire. Ce modèle permet l'obtention de chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques. L'expression et la synthèse de facteurs angiogéniques (VEGF, bFGF, CXCL-12...) augmentent avec la différenciation hypertrophique tandis que celles de facteurs angiostatiques (TSP-1, TSP-2, ChM-I...) diminuent entre les stades de différenciation pré-hypertrophique et hypertrophique. Le potentiel angiogénique des chondrocytes hypertrophiques apparaît donc supérieur à celui des chondrocytes pré-hypertrophiques. En condition inflammatoire (IL-1 β), nous avons montré une amplification du phénotype hypertrophique, suggérant un rôle du contexte inflammatoire de l'articulation OA dans la différenciation chondrocytaire. Ainsi, la différenciation hypertrophique des chondrocytes pourrait participer aux mécanismes physiopathologiques de l'OA en favorisant la vascularisation et la dégradation du cartilage articulaire. Deux types d'approche ont été réalisés afin d'identifier des acteurs moléculaires impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale : une approche ciblée et une approche à grande échelle sans a priori (étude microarray).

- **Approche ciblée** : compte tenu de la diminution de la synthèse de TSP-1 au cours de l'hypertrophie des chondrocytes, son rôle dans le processus de différenciation hypertrophique a été étudié dans notre modèle *in vitro* grâce à des chondrocytes déficients pour la TSP-1 (TSP-1^{-/-}). Son rôle dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéochondrale a ensuite été évalué dans un modèle murin d'arthrose mécanique par déstabilisation du ménisque médial (DMM).

- **Approche sans a priori** : une étude microarray a été réalisée à partir du modèle *in vitro* de différenciation hypertrophique. L'IL-34 et ses récepteurs sont ressortis de l'analyse transcriptomique comme étant fortement dérégulés au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Ainsi, cette étude a suggéré pour la première fois l'implication de l'IL-34 dans la physiopathologie de l'OA. La réalisation de ce travail a donc permis l'acquisition de données microarray du transcriptome et du miRnome d'un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocyte murin, permettant d'identifier de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans le processus arthrosique.

Mots clés : Arthrose – Chondrocytes – Différenciation hypertrophique – Remodelage – Angiogenèse

*« Si un de tes rêves devait se briser en mille morceaux,
n'aie pas peur de reprendre un de ces morceaux et de recommencer »*

Mencius (~380-289 av. J.-C.)

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Pr. Bruno Fève de m'avoir accueillie au sein du centre de recherche Saint-Antoine, dans l'unité UMR_S938 à Paris.

Je remercie chaleureusement le Pr. Francis Berenbaum d'avoir toujours fait preuve d'optimisme et d'enthousiasme sur la progression du projet au cours de ces trois années. Vos paroles encourageantes ont toujours été très agréables à recevoir et m'ont souvent redonné l'énergie et la confiance pour poursuivre à fond ce que j'entreprenais. J'ai beaucoup appris de vos conseils et de votre vision de la Science. Merci pour tout.

Un grand merci au Dr. Xavier Houard, qui m'a initiée à la recherche dans le domaine des pathologies ostéo-articulaires. Je te remercie pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées dès le début de ce projet et au cours de ces trois années que je n'ai pas vu passer.

Je remercie le Dr. Mustapha Rouis d'avoir accepté avec gentillesse de présider le jury réuni pour ma soutenance de thèse.

Je remercie le Dr. Laurence Legeai-Mallet et le Pr. David Magne d'avoir accepté avec spontanéité la fonction de rapporteur pour mon manuscrit de thèse. Je les remercie sincèrement de l'intérêt qu'ils portent à nos travaux et au temps consacré à la lecture attentive de mon travail.

Je remercie également le Dr. Hervé Kempf et le Dr. Frédéric De Ceuninck d'avoir accepté la fonction d'examineur et d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit.

Merci à tous nos collaborateurs de l'Institut de Recherches Servier : Philippe Pastoureau, Frédéric De Ceuninck, Gaëlle Rolland-Valognes, Iuliana Botez, Sophie Courtade-Gaiani, Laura Grégoire, Damien Valour Soladis, Chantal Bourrier, Catherine Delamoueyre Spire et leurs équipes, qui nous ont permis de développer ce projet de manière inattendue, grâce à des opportunités et des paris qui ont conduit à de beaux résultats. Merci pour ce travail d'équipe. J'ai appris énormément de notre collaboration et j'insiste sur le plaisir que j'ai eu de développer ce projet à vos côtés.

Merci à toute mon équipe, Claire Attali, Jérémie Sellam, Audrey Pigenet, Danièle Citadelle, Laure Sudre, Kristell Wanherdrick, Maria-Luisa Perez-Lozano, Natalia Zapata, Marion Millerand, Alice Courties, Ariane Do, Indira Toillon et Anna Pons, pour leur gentillesse et les bons moments partagés ensemble.

Merci aux étudiantes, Cindy, Julie, Anouchka et Cécilia, qui sont malheureusement restées peu de temps dans l'équipe mais avec qui j'ai beaucoup aimé discuter au cours de ces longues heures de culture cellulaire, plaisanter et transmettre tout de même des connaissances. Vous avez apporté de la bonne humeur ainsi qu'une ambiance agréable au labo.

Je remercie sincèrement Tatiana Ledent ainsi que tout le personnel de la PHEA du centre de recherche Saint-Antoine pour leur aide et leur gentillesse durant les expériences *in vivo*.

Un grand merci au Pr. Marie-Hélène Lafage-Proust et à Damien Cleret, nos collègues de Saint-Etienne, avec qui nous avons partagé de très bons moments en conférences et au cours de nos réunions pour discuter de nos derniers résultats sur l'angiogenèse. Damien, je te souhaite une très belle continuation dans ta nouvelle carrière professionnelle.

Je remercie sincèrement le Dr. Geoffroy Nourissat pour ces nombreuses heures passées ensemble en salle de chirurgie pour réaliser les opérations de DMM. Merci pour ta gentillesse, ta patience et ton calme malgré mon stress parfois important. Imperturbable chirurgien !

Je remercie le Dr. Paul-François Ehkirch qui m'a donné l'opportunité de découvrir l'univers du bloc opératoire et la réalisation de la pose d'une prothèse de genou. Si je n'avais pas déjà fait 9 ans d'études, j'aurais pu envisager de m'intéresser à la chirurgie. Merci pour cette expérience qui m'a permis de mieux comprendre la pathologie humaine et de mieux appréhender le contexte clinique dans lequel nous récupérons les prélèvements.

Un grand merci à Yves Lebouc et à son équipe pour leur gentillesse et tous les bons moments partagés au cours des repas et apéros du 5^{ème} étage : Laurent, Clémence, Maud, Patricia et Sarah, à qui je souhaite de belles réussites pour cette 4^{ème} année de thèse et encore plus pour la suite. Merci Sarah pour ton agréable présence dans le bureau ! Tu vas désormais être la seule ancienne parmi ces jeunes doctorantes.

Merci à Lea, Pauline, Marion et Anastasia, avec qui j'ai passé des moments inoubliables et partagé une amitié qui dépasse et dépassera le cadre du labo. Merci pour votre bienveillance, votre bonne humeur et votre force de caractère. Conservez-les pour aller au bout de tous vos rêves. Conseil de la « vieille » ; dans les moments de blues, quelques minutes de procrastination sur « Ciel mon doctorat ! » peut remonter le moral !

Merci à ma petite Eva, avec qui j'ai partagé de nombreuses discussions passionnantes et qui m'a beaucoup encouragée tout au long de l'écriture de ce manuscrit. Tu vas bientôt à ton tour

concrétiser tes projets avec mérite et ténacité pour enfin avancer vers de nouveaux horizons bien plus ensoleillés. Un nouveau départ, pour une nouvelle vie. Il paraît que le meilleur moyen de prédire l'avenir, c'est de l'inventer...

Un immense merci à ma famille, qui m'a toujours soutenue, encouragée dans tous mes projets, en croyant continuellement en moi. Mes parents Véro et Bernard, ma sœur Jenny, Rémy, mamie Dédée, papy Claude, tata Lydie, Laurent, Raphaël, Delphine, Léon, Apolline, Aurèle, Jojo, Caro, Mila et Anna. Vous allez enfin pouvoir assister à la concrétisation de toutes ces années de travail. Je suis heureuse de partager ce moment à vos côtés car c'est grâce à vous que j'ai réussi à réaliser ce travail, que j'ai développé le goût de l'effort et acquis la patience et la persévérance.

Enfin, merci infiniment à mon chéri Benjamin, qui partage ma vie, mon bonheur, mes ambitions, mes forces, mais aussi mes doutes et mes faiblesses. Tu m'as toujours soutenue, encouragée et aidée au quotidien pour garder le sourire, la confiance et la ténacité. Nous pourrons très bientôt profiter de nos loisirs et de vacances bien méritées. Je suis impatiente de découvrir de nouvelles aventures avec toi sur ce beau chemin que nous construisons ensemble...

Abréviations

18S : 18S ribosomal RNA

Acan : aggrécane

ACP : analyse en composante principale

Actb : actine beta

ADAMTS : a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats

ADN : acide désoxyribonucléique

adTSP-1 : adénovirus codant la TSP-1

ANGPTL-4 : angiopoïétine like 4

ARNm : acide ribonucléique messenger

Bax : BCL2 associated X, apoptosis regulator

Bcl-2 : BCL2, apoptosis regulator

bFGF : basic fibroblast growth factor

BML : bone marrow lesion

BMP : bone morphogenetic protein

BSA : bovine serum albumin

BSP : bone sialoprotein

BV/TV : volume minéral osseux

CA : chondrocytes articulaires

CCL : C-C motif chemokine ligand

CH : chondrocytes hypertrophiques

ChM-I : chondromoduline I

Col10a1 : collagène de type X a1

Col2a1 : collagène de type II a1

COMP : cartilage oligomeric matrix protein

CPH : chondrocytes pré-hypertrophiques

CRT : calréticuline

CS : chondroïtine sulfates

CSF-1 : colony stimulating factor 1

CSF-1R : colony stimulating factor 1 receptor

Ct : cycle threshold

CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand

DAB : 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate

DAMP: danger associated molecular pattern

DMEM-HamF12 : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - Ham's F-12 Nutrient Mixture

DMM : déstabilisation du ménisque médial

DMP : dental mineral protein

DMSO : diméthylsulfoxyde

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate

DO : densité optique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EGF : epidermal growth factor

EGF : epidermal growth factor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

EOPS : exempt d'agents pathogènes spécifiques

EPAS1 : endothelial PAS domain-containing protein 1

ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinase 1/2

FAK : focal adhesion kinase

FasL : Fas ligand

FC : fold change

FLT3 : fms related tyrosine kinase 3

FN : fibronectine

FRET : fluorescence resonance energy transfer

GAG : glycosaminoglycane

Gapdh : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GCP : granulocyte chemotactic protein

GDF : growth differentiation factor

GH : growth hormone

Glu : L-glutamine

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

Gusb : glucuronidase, beta

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HGF : hepatocyte growth factor

HIF : hypoxia-inducible factor

Hmbs : hydroxymethylbilane synthase

HMGB-1 : high-mobility group box 1 protein

Hprt : hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

HRP : peroxydase de raifort

HS : héparane sulfates

HSPG : heparan sulfate proteoglycan

HUVEC : human umbilical vein endothelial cells

IFN : interferon

IGF : insulin growth factor

Ihh : indian hedgehog

IL : interleukine

IMC : indice de masse corporelle

IPA : Ingenuity® Pathway Analysis

IRM : imagerie par résonance magnétique

iTRAQ : isobaric tags for relative and absolute quantitation

ITS : insuline-transferrine-sélénium

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KO : knock-out

LDH : lactate déshydrogénase

IgG : immunoglobuline

LIF : leukemia inhibitory factor

LRP1 : low density lipoprotein receptor-related protein 1

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

MEC : matrice extracellulaire

MIG : monokine induced by gamma interferon

miR : micro-ARN

MK : midkine

MMA : méthylmetacrylate

MMP : métalloprotéase matricielle

MMTL : ligament ménisco-tibial médial

mOC : ostéocalcine

MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium

nano-CT : nano-computed tomography

Ncam1 : neural cell adhesion molecule 1

NGF : nerve growth factor

NK : natural killer

NO : nitric oxide

NRP-1 : neuropilin 1

OA : ostéoarthrite – arthrose

OARSI : Osteoarthritis Research Society International

OC : ostéocalcine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPG : ostéoprotégérine

Osx : ostéix

PAL : phosphatase alcaline

PBS : phosphate buffered saline

PDGF : platelet-derived growth factor

PDGFR : platelet-derived growth factor receptor

PEDF : pigment epithelium-derived factor

PFA: paraformaldéhyde

PGE₂ : prostaglandine E₂

PGK : phosphoglycerate kinase

PHEA : plateforme d'hébergement et d'expérimentation animale

PI3-kinase : phosphoinositide 3-kinase

pNPP : para-nitrophenylphosphate

Ppia : peptidylprolyl isomerase A

PR : polyarthrite rhumatoïde

PS : pénicilline-streptomycine

PTG : pose de prothèse totale de genou

PTHrP : Parathyroid hormone related protein

PTN : pléiotrophine

PTPase : protein tyrosine phosphatase

PTPRZ1 : protein tyrosine phosphatase, receptor type Z1

PTP-ζ : protein tyrosine phosphatase zeta

RAGE : receptor for advanced glycation end products

RANK : receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RIN : RNA Integrity Number (RIN)

RIPA : radioimmunoprecipitation assay

ROS : reactive oxygen species

Rpl30 : ribosomal protein L30

RTK : receptor tyrosine kinase

RT-PCR : reverse transcription – polymerase chain reaction

Runx2 : runt-related transcription factor 2

SCF : stem cell factor

SDF-1 : stromal cell-derived factor 1

SDS : sodium dodecyl sulfate

sFlt-1 : soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1

shRNA : small hairpin RNA

SLPI : secretory leukocyte proteinase inhibitor

SMm : score de Mankin modifié

Sox9 : SRY (sex determining region Y)-box 9

Sphk1 : sphingosine kinase 1

STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3

SVF : sérum de veau fétal

T3 : hormone tri-iodothyronine

Tb. N : nombre de travées osseuses

Tb. Sp : espacement entre les travées osseuses

Tb. Th : épaisseur des travées osseuses

Tbp : TATA box binding protein

TFBS : transcription factor-binding sites

TGF- β : transforming growth factor β

TGF β R : transforming growth factor beta receptor

TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinases

TLR : toll-like receptor

TNAP : tissue non-specific alkaline phosphatase

Tnc : té nascine C

Tnfsf11 : tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase

TSP : thrombospondine

TSR : thrombospondin repeat

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : VEGF receptor

VLDL : very low density lipoprotein

VSMC : vascular smooth muscle cells

WT : wild type

Table des matières

Données bibliographiques.....	33
1. L'articulation synoviale.....	35
1.1 Définitions des différents types d'articulations	35
1.1.1 Les synarthroses ou articulations immobiles	35
1.1.2 Les amphiarthroses ou articulations semi-mobiles	36
1.1.3 Les diarthroses ou articulations mobiles	36
1.2 Anatomie de l'articulation synoviale du genou	41
1.3 Origine cellulaire et développement embryonnaire du cartilage et de l'os	42
1.3.1 Différenciation des cellules souches mésenchymateuses.....	42
1.3.2 Processus d'ossification endochondrale.....	45
1.3.3 Plaque de croissance.....	47
1.3.4 Mécanismes de différenciation hypertrophique des chondrocytes de la plaque de croissance.....	48
1.4 Le cartilage articulaire	52
1.4.1 Organisation des chondrocytes articulaires.....	53
1.4.2 Composition de la matrice cartilagineuse	57
1.4.3 Propriétés avasculaires du cartilage non calcifié.....	60
1.4.4 Homéostasie du cartilage articulaire	62
1.5 Le tissu osseux.....	65
1.5.1 Structure et fonctions de l'os sous-chondral	65
1.6 La membrane synoviale.....	71
1.7 Les autres tissus de l'articulation synoviale	73
1.7.1 Les tendons et ligaments	73
1.7.2 Ménisques.....	74
1.7.3 Les tissus adipeux intra-articulaires	74
2. L'arthrose et sa physiopathologie.....	75
2.1 Epidémiologie de l'arthrose.....	75
2.2 Définitions de l'arthrose	76
2.3 Thérapeutiques.....	78
2.4 Phénotypes d'arthrose : Identification des facteurs de risque	78
2.4.1 Vieillesse.....	79
2.4.2 Traumatismes	79

2.4.3	Sexe - Facteurs hormonaux	80
2.4.4	Génétique – Ethnie	80
2.4.5	Eléments nutritionnels.....	81
2.4.6	Surcharge pondérale et obésité.....	81
2.4.7	Syndrome métabolique.....	81
2.5	Physiopathologie de l’arthrose	82
2.5.1	Atteintes du cartilage arthrosique.....	83
2.5.2	Atteintes de l’os sous-chondral arthrosique	94
2.5.3	Atteintes de la membrane synoviale.....	98
2.5.4	Atteintes des tissus adipeux intra-articulaires	101
2.5.5	Atteintes des structures péri-articulaires : ménisques, ligaments, tendons et muscles.....	102
3.	L’unité fonctionnelle cartilage articulaire – os sous-chondral.....	104
3.1	Mise en évidence des communications entre le cartilage et l’os sous-chondral.....	104
3.1.1	Interactions mécaniques entre le cartilage et l’os sous-chondral	104
3.1.2	Interactions biochimiques entre le cartilage et l’os sous-chondral.....	105
3.2	Structures impliquées dans la communication biochimique entre l’os sous-chondral et le cartilage articulaire	107
3.2.1	Les micro-fissures	107
3.2.2	Les contacts directs	108
3.2.3	Les chenaux vasculaires	109
3.3	L’angiogenèse ostéochondrale au cours de l’arthrose.....	110
3.3.1	Implication de l’angiogenèse ostéochondrale dans la progression de l’arthrose humaine.....	110
3.3.2	Etude de l’implication de l’angiogenèse ostéochondrale dans des modèles animaux d’arthrose.....	117
3.3.3	Stratégies thérapeutiques ciblant l’angiogenèse dans des modèles animaux d’arthrose	118
3.3.4	Mécanismes inducteurs de l’angiogenèse ostéochondrale au cours de l’arthrose humaine	122
	Objectifs.....	125
	Matériels & Méthodes.....	129
1.	Expériences <i>ex vivo</i>	131
1.1	Collection des prélèvements de tissus humains arthrosiques	131

1.1.1	Inclusion des patients	131
1.1.2	Dissection des tissus et préparation des coupes histologiques.....	131
1.2	Marquages des coupes histologiques de cartilages arthrosiques.....	132
1.2.1	Histologie	132
1.2.2	Immunohistochimie.....	133
2.	Expériences <i>in vitro</i>	136
2.1	Cultures primaires de cellules murines.....	136
2.1.1	Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes murins.....	136
2.1.2	Mise en culture d'ostéoblastes murins	137
2.2	Arrêt des cultures de chondrocytes et d'ostéoblastes murins	137
2.3	Traitements des cultures primaires de chondrocytes et d'ostéoblastes murins : ABT-510, IL-1 β et IL-34	138
2.4	Evaluation de la viabilité cellulaire des chondrocytes murins	138
2.4.1	Test MTT.....	138
2.4.2	Test LDH.....	139
2.5	Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains.....	139
2.5.1	Mise en culture des chondrocytes issus de cartilages arthrosiques.....	139
2.5.2	Protocole de différenciation hypertrophique.....	140
2.5.3	Arrêt des cultures de chondrocytes humains.....	140
2.6	Analyses moléculaires	142
2.6.1	Chondrocytes et ostéoblastes murins	142
2.6.2	Microarray du modèle de différenciation hypertrophiques des chondrocytes murins.....	144
2.6.3	Chondrocytes humains	147
2.7	Analyses biochimiques	148
2.7.1	Préparation des lysats cellulaires.....	148
2.7.2	Dosages protéiques.....	148
2.7.3	Western Blot.....	148
2.7.4	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	149
2.8	Détection de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) par cytochimie.....	150
2.8.1	Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline	150
2.9	Colorations des calcifications des matrices extracellulaires.....	150
2.9.1	Rouge alizarine.....	150
2.9.2	Von Kossa	150

3. Expériences <i>in vivo</i>	151
3.1 Souris TSP-1 ^{-/-}	151
3.1.1 Etablissement de la lignée TSP-1 ^{-/-}	151
3.1.2 Conditions d'élevage	151
3.1.3 Génotypage des souris	152
3.2 Modèle de déstabilisation du ménisque médial (DMM)	153
3.2.1 Chirurgie, protocoles d'anesthésie et d'analgésie	153
3.2.2 Sacrifices des animaux et perfusions intracardiaques de sulfate de baryum....	155
3.2.3 Analyses nano-CT et quantifications	155
4. Analyses statistiques	156
4.1 Tests statistiques	156
4.2 Analyses statistiques du microarray	157
Résultats	159
1. Etude du remodelage de la jonction ostéocondrale chez les patients arthrosiques	161
1.1 Evaluation histologique de la sévérité de l'arthrose	161
1.2 Evaluation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes.....	163
1.3 Evaluation de la vascularisation ostéocondrale	165
1.4 Discussion.....	167
2. Développement de modèles <i>in vitro</i> de différenciation hypertrophique de chondrocytes	169
2.1 Développement d'un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes murins en culture primaire.....	172
2.1.1 Optimisation du protocole expérimental	172
2.1.2 Evaluation de la minéralisation de la matrice extracellulaire.....	177
2.1.3 Caractérisation des profils d'expression génique des chondrocytes murins	178
2.2 Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains.....	182
2.2.1 Profil d'expression génique des chondrocytes humains	182
2.2.2 Evaluation de la minéralisation des matrices extracellulaires des culots.....	186
2.3 Discussion des modèles	187
2.3.1 Modèle murin	187
2.3.2 Modèle humain.....	190
3. Mise en évidence de cibles impliquées dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes et le remodelage pathologique de la jonction ostéocondrale	191

3.1	Approche ciblée	191
3.1.1	Etude de l'expression de molécules angiogéniques et angiostatiques dans les modèles de différenciation hypertrophique de chondrocytes	191
3.1.2	Effet d'un stress inflammatoire sur les chondrocytes murins articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.....	199
3.1.4	Etude du rôle de la TSP-1 dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes murins	217
3.1.5	Rôle de la TSP-1 dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéocondrale dans un modèle murin d'arthrose mécanique	228
3.1.6	Implication de la TSP-1 au cours de la pathologie humaine.....	231
3.1.7	Discussion	235
3.2	Recherche de cibles par une approche sans a priori	240
3.2.1	Etude microarray du modèle de différenciation hypertrophique des chondrocytes murins.....	240
3.2.2	L'interleukine-34 (IL-34) : données bibliographiques.....	263
3.2.3	Etude de la régulation et du rôle de l'IL-34 dans nos modèles <i>in vitro</i>	278
3.2.4	Présence des récepteurs de l'IL-34 dans les tissus arthrosiques humains.....	295
3.2.5	Conclusions et discussion.....	298
4.	Conclusion générale et perspectives	307
	Références bibliographiques.....	309

Table des figures

Figure 1: Articulations du crâne et des membres supérieurs et inférieurs chez l'adulte.	35
Figure 2: Synarthroses ou articulations immobiles.	35
Figure 3: Amphiarthroses ou articulations semi-mobiles.	36
Figure 4: Anatomie d'une diarthrose.	36
Figure 5: Articulation sphéroïde.	37
Figure 6: Mouvements des membres supérieurs.	37
Figure 7: Articulation condylienne.	38
Figure 8: Articulation en selle.	38
Figure 9: Articulation trochléenne.	39
Figure 10: Articulation trochoïde.	39
Figure 11: Articulation plane.	40
Figure 12: Anatomie de l'articulation synoviale du genou.	41
Figure 13: Voies de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.	42
Figure 14: Origine cellulaire des ostéoblastes et des ostéoclastes, impliqués dans le remodelage osseux.	43
Figure 15: Principaux facteurs de transcription et molécules impliqués dans la régulation de la différenciation chondrogénique et ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses.	43
Figure 16: Principales étapes du processus d'ossification endochondrale embryonnaire chez l'Homme.	46
Figure 17: Organisation et morphologie des chondrocytes de la plaque de croissance.	47
Figure 18: Organisation histologique des plaques de croissance humaine et murine.	48
Figure 19: Principaux marqueurs moléculaires impliqués dans la différenciation des chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale.	49
Figure 20: Aspects macroscopique et histologique du cartilage articulaire humain.	53
Figure 21: Structures d'un chondrocyte et de sa matrice environnante en microscopie électronique.	53
Figure 22: Organisation histologique du cartilage articulaire.	56
Figure 23: Organisations schématisques des chondrocytes et de la disposition des fibres de collagènes suivant la profondeur du cartilage.	56
Figure 24: Organisation cellulaire et macromoléculaire du cartilage articulaire mature.	59
Figure 25: Composition macromoléculaire de la matrice péri-cellulaire, territoriale et inter-territoriale.	59

Figure 26: Homéostasie du cartilage articulaire assurée par un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme au sein de la matrice extracellulaire cartilagineuse.....	63
Figure 27: Implication du stress mécanique dans la nutrition du cartilage articulaire.....	64
Figure 28: Structure et composition d'un os long.....	66
Figure 29: Types cellulaires impliqués au cours de la formation osseuse.....	68
Figure 30: Types cellulaires impliqués au cours de la résorption osseuse.....	69
Figure 31: Structure et fonction des ostéoclastes au cours de la résorption osseuse.....	70
Figure 32: Coupe histologique de membrane synoviale.....	73
Figure 33: Comparaison de la structure anatomique d'une articulation saine et d'une articulation arthrosique.....	76
Figure 34: Examen radiologique mettant en évidence une arthrose du genou.....	77
Figure 35: Atteintes des tissus de l'articulation arthrosique.....	82
Figure 36: Aspect de la surface articulaire des condyles fémoraux d'un genou sain et d'un genou à un stade sévère d'arthrose.....	83
Figure 37: Coupes histologiques de cartilage articulaire sain et arthrosique.....	84
Figure 38: Mécanisme de l'effet protecteur de la chondromoduline I sur l'homéostasie du cartilage articulaire.....	92
Figure 39: Evolution d'une gonarthrose visualisée par radiographie.....	96
Figure 40: Coupe sagittale d'un genou arthrosique en IRM.....	99
Figure 41: Histologie de la membrane synoviale arthrosique.....	100
Figure 42: Rôle de la membrane synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose.....	101
Figure 43: Les micro-fissures à la jonction ostéochondrale.....	108
Figure 44: Un chenal vasculaire à la jonction ostéochondrale.....	110
Figure 45: Coupes histologiques de cartilages sains et arthrosiques à la jonction ostéochondrale.....	111
Figure 46: Corrélation entre la vascularisation ostéochondrale et la sévérité de l'arthrose..	112
Figure 47: Lien entre la vascularisation ostéochondrale et la dégradation du cartilage sus-jacent.....	113
Figure 48: Potentiel rôle physiopathologique du VEGF au cours de l'arthrose.....	114
Figure 49: Rôles de l'angiogenèse et de l'innervation à la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose.....	116
Figure 50: Communications moléculaires et cellulaires à la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose.....	123

Figure 51: Prélèvements d'un genou humain arthrosique issus d'un patient opéré pour une pose de prothèse totale (PTG).	132
Figure 52: Protocoles de mise en culture de chondrocytes articulaires humains et de leur différenciation hypertrophique.	141
Figure 53: Principe de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce à ADN.	146
Figure 54: Profil électrophorétique des amplicons de PCR du géotypage des souris TSP-1.	153
Figure 55: Description du modèle murin d'arthrose par déstabilisation du ménisque médial (DMM).	154
Figure 56: Délimitation de la zone d'intérêt pour les mesures des paramètres morphologiques osseux et vasculaires de l'épiphyse tibiale interne.	156
Figure 57: Photographies représentatives de l'aspect du cartilage articulaire selon le score de Mankin modifié (SMm).	162
Figure 58: Corrélation entre le nombre de chenaux vasculaires à la jonction ostéochondrale et la sévérité de l'arthrose chez des patients ayant subi une arthroplastie totale de genou.	163
Figure 59: Evaluation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes à des stades évolutifs d'arthrose.	164
Figure 60: Corrélation entre la densité de chondrocytes hypertrophiques et la sévérité de l'arthrose sur les coupes de cartilages OA.	165
Figure 61: Evaluation de la vascularisation ostéochondrale à des stades évolutifs d'arthrose.	166
Figure 62: Corrélation entre le nombre de chenaux vasculaires à la jonction ostéochondrale et la densité de chondrocytes hypertrophiques sur des coupes histologiques de cartilages OA.	167
Figure 63: Comparaison des niveaux de calcifications des cultures par des doses croissantes de phosphate inorganique et de β -glycérophosphate.	173
Figure 64: Cinétiques de mortalité des chondrocytes et de leurs calcifications en présence de 10mM de phosphate inorganique ou de β -glycérophosphate pendant 48 jours.	175
Figure 65: Synthèse de TSP-1 dans les chondrocytes en cours de différenciation hypertrophique en présence de phosphate inorganique et de β -glycérophosphate.	176
Figure 66: Schéma récapitulatif du protocole expérimental final (milieux de culture utilisés et durées d'incubation) du modèle de différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires murins.	177

Figure 67: Evaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et du potentiel de minéralisation des matrices extracellulaires des chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.	178
Figure 68: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs chondrocytaires dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.	180
Figure 69: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs de la différenciation hypertrophique dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.	181
Figure 70: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs chondrocytaires dans les chondrocytes humains cultivés en milieu de différenciation chondrogénique et hypertrophique.	184
Figure 71: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs de l'hypertrophie dans les chondrocytes humains cultivés en milieu de différenciation chondrogénique et hypertrophique.	185
Figure 72: Evaluation du potentiel de minéralisation de la matrice extracellulaire d'un culot de chondrocytes humains cultivés en milieu chondrogénique puis en milieu de différenciation hypertrophique.	187
Figure 73: Expression génique de facteurs pro-angiogéniques par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.	192
Figure 74: Synthèse de facteurs pro-angiogéniques par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.	194
Figure 75: Expression génique de facteurs anti-angiogéniques par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.	196
Figure 76: Synthèse de facteurs anti-angiogéniques (PEDF et TSP-1) par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.	197
Figure 77: Expression de la TSP-1 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes humains.	198
Figure 78: Effet d'un stress inflammatoire sur l'expression génique de marqueurs chondrocytaires par les chondrocytes murins.	200
Figure 79: Effet d'un stress inflammatoire sur l'expression génique de marqueurs de différenciation hypertrophique par les chondrocytes murins.	201
Figure 80: Effet d'un stress inflammatoire sur l'expression génique de facteurs de l'angiogenèse par les chondrocytes murins.	203

Figure 81: Effet d'un stress inflammatoire sur la synthèse de TSP-1 par les chondrocytes pré-hypertrophiques murins.....	204
Figure 82: Structure des domaines fonctionnels de la TSP-1.	207
Figure 83: Synthèse des récepteurs de la TSP-1, des voies de signalisation et des types cellulaires influencés par la TSP-1.....	208
Figure 84: Rôle de la TSP-1 dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale.....	212
Figure 85: Génération de peptides mimétiques de la TSP-1 par les laboratoires Abbott.....	215
Figure 86: Evaluation du potentiel de minéralisation des matrices extracellulaires des chondrocytes déficients pour la TSP-1.....	218
Figure 87: Comparaison de l'expression génique de marqueurs chondrocytaires et de marqueurs de l'hypertrophie par les chondrocytes murins WT et TSP-1 ^{-/-}	220
Figure 88: Comparaison de l'expression génique de Thbs2 et des récepteurs de TSP-1 (Cd36 et Cd47) par les chondrocytes murins WT et TSP-1 ^{-/-}	221
Figure 89: Comparaison du potentiel angiogénique des chondrocytes murins TSP-1 ^{-/-} par rapport aux chondrocytes WT.....	223
Figure 90: Evaluation de l'expression de marqueurs de différenciation et de facteurs de l'angiogenèse par les chondrocytes murins pré-hypertrophiques en réponse à l'ABT-510, en condition inflammatoire.	225
Figure 91: Evaluation de l'expression de gènes cibles par les chondrocytes murins pré-hypertrophiques KO TSP-1 en réponse à l'ABT-510, en condition inflammatoire.....	226
Figure 92: Evaluation du score OARSI, de la présence d'ostéophytes et de la vascularisation ostéochondrale chez les souris WT et TSP-1 ^{-/-} 8 semaines post-DMM.....	229
Figure 93: Evaluation de paramètres morphologiques de l'os trabéculaire de l'épiphyse tibiale interne chez les souris WT et TSP-1 ^{-/-} 8 semaines post-DMM.....	230
Figure 94: Evaluation de la présence de la TSP-1 dans la matrice extracellulaire du cartilage articulaire à des stades évolutifs d'arthrose.....	232
Figure 95: Corrélation entre la présence de TSP-1 dans le cartilage articulaire et la sévérité de l'arthrose chez des patients ayant subi une arthroplastie totale de genou.....	233
Figure 96: Corrélation entre le nombre de chenaux vasculaires à la jonction ostéochondrale et la présence de TSP-1 sur des coupes histologiques de cartilages OA.....	234
Figure 97: Corrélation entre la densité de chondrocytes hypertrophiques et la présence de TSP-1 sur des coupes histologiques de cartilages OA.	234
Figure 98: Evaluation de la minéralisation matricielle et de la viabilité des chondrocytes au cours de la différenciation hypertrophique.....	241

Figure 99: Critères du contrôle qualité des ARN totaux extraits.	243
Figure 100: Sélection des gènes de référence dans notre modèle.	245
Figure 101: Analyse statistique sur le logiciel qBase+ du nombre de gènes de référence nécessaires à la normalisation des données.	246
Figure 102: Expression des marqueurs chondrocytaires (Col2a1, Sox9, Acan, ChM-I) et des marqueurs de la différenciation pré-hypertrophique (Pedf, Angptl4, Ihh, TNAP) et hypertrophique (Runx2, Osx, mOC) par les chondrocytes du modèle.	247
Figure 103: Analyse en composantes principales (ACP) sur les valeurs $-dCt$ calculées pour les 11 gènes d'intérêt.	249
Figure 104: Contributions des échantillons à la variabilité des données.	250
Figure 105: Calculs d'un score de variabilité sur les groupes de phénotypes extrêmes : chondrocytes articulaires vs hypertrophiques.	251
Figure 106: Analyses en Composantes Principales des données du microarray.	252
Figure 107: Vulcano Plot des données globales du microarray, comparant deux à deux les conditions du modèle.	254
Figure 108: Signature moléculaire des échantillons de chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques du microarray (n=8 dans chaque groupe).	256
Figure 109: Signature moléculaire des échantillons de micro-ARN des chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques du microarray (n=8 dans chaque groupe).	257
Figure 110: Fonctions sur-représentées parmi les gènes différentiellement exprimé entre les chondrocytes articulaires et hypertrophiques de notre modèle.	259
Figure 111: Fonctions ou pathologies d'intérêt représentées dans notre modèle chez les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques comparés aux articulaires, selon les mots clés « bone », « arth- », « osteo- », « connective tissue », « inflamm- ».	260
Figure 112: Réseau fonctionnel de l'IL-34 dans notre modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes.	262
Figure 113: Représentation schématique de la structure de l'IL-34 humaine.	263
Figure 114: Schéma synthétique des voies de différenciation des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses.	264
Figure 115: Récepteurs et co-récepteur de l'IL-34.	265
Figure 116: Structure du CSF-1, de l'IL-34 et des complexes ligand-récepteur CSF-1R. ...	266
Figure 117: Rôles du récepteur CSF-1R décrits au cours du développement et dans la physiologie de l'organisme adulte.	267

Figure 118: Structures des récepteurs protéine-tyrosine phosphatase ζ membranaires (isoformes courte et longue) et du récepteur soluble (phosphacan).....	269
Figure 119: Structure du syndecan-1, un protéoglycane composé de chaînes chondroïtine sulfates et héparane sulfates.....	271
Figure 120: Schémas représentant l'implication éventuelle du syndecan-1 dans la biodisponibilité et l'activité de l'IL-34.....	272
Figure 121: Régulation des voies de signalisation intracellulaires en aval des complexes IL-34/CSF-1R, IL-34/ PTP ζ et IL-34/syndecan-1.....	273
Figure 122: Rôle du CSF-1 et de RANKL dans la différenciation des ostéoclastes à partir de cellules souches hématopoïétiques multipotentes.....	275
Figure 123: Rôle de l'IL-34 dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	277
Figure 124: Expression des gènes codant l'IL-34 et ses récepteurs PTP- ζ et CSF-1R dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.....	279
Figure 125: Synthèse d'IL-34 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes murins.....	280
Figure 126: Expression du gène codant l'IL-34 au cours du processus de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains.....	281
Figure 127: Synthèse d'IL-34 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes humains.....	282
Figure 128: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expressions des gènes codant la monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), la matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) et la matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) dans les chondrocytes articulaires.....	284
Figure 129: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des chondrocytes articulaires.....	285
Figure 130: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expression de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes pré-hypertrophiques.....	286
Figure 131: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des chondrocytes pré-hypertrophiques.....	287
Figure 132: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expression de gènes cibles dans les chondrocytes hypertrophiques.....	288
Figure 133: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des chondrocytes hypertrophiques.....	290
Figure 134: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expression de gènes cibles dans les ostéoblastes.....	292

Figure 135: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des ostéoblastes.....	293
Figure 136: Expression de CSF-1R détectée par immunohistochimie sur des coupes d'articulations arthrosiques.	296
Figure 137: Expression de PTP- ζ détectée par immunohistochimie sur des coupes d'articulations arthrosiques.	297
Figure 138: Rôle de l'interleukine-34 dans l'articulation arthrosique.	301

Table des tableaux

Tableau 1: Classification radiologique de la gonarthrose par le score de Kellgren et Lawrence.	77
Tableau 2: Synthèse des études publiées sur les effets des traitements ciblant l'angiogenèse dans des modèles animaux de pathologies ostéo-articulaires.	119
Tableau 3: Tableau original de la classification histologique du cartilage articulaire.....	133
Tableau 4: Conditions expérimentales des immunohistochimies (CD34, CSF-1R, OC, PTP- ζ et TSP-1).	134
Tableau 5: Correspondance des valeurs du score de l'immunomarquage de l'ostéocalcine.	135
Tableau 6: Correspondance des valeurs du score de l'immunomarquage de la TSP-1.	135
Tableau 7: Conditions expérimentales des expériences de stimulations cellulaires par l'ABT-510, IL-1 β et l'IL-34.	138
Tableau 8: Protocole d'amplification par qPCR (LightCycler Real Time PCR LC480).....	142
Tableau 9: Séquences des amorces murines (sens et anti-sens) utilisées au cours des qPCR.	143
Tableau 10: Séquences des amorces murines utilisées au cours des PCR en temps réel à haut débit par Fluidigm®.	145
Tableau 11: Séquences des amorces humaines (sens et anti-sens) utilisées au cours des qPCR.	147
Tableau 12: Conditions expérimentales des Western Blot (Actine- β , PEDF et TSP-1).....	149
Tableau 13: Protocole d'amplification par PCR classique du génotypage des souris TSP-1.	152
Tableau 14: Score semi-quantitatif OARSI.	155
Tableau 15: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).	180
Tableau 16: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).	182

Tableau 17: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).	184
Tableau 18: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).	186
Tableau 19: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).	193
Tableau 20: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).	196
Tableau 21: Valeurs des RIN des chondrocytes articulaires DMEM, des chondrocytes pré-hypertrophiques HYP et des chondrocytes hypertrophiques VITA, calculées par le bioanalyzer Agilent 2100.	244
Tableau 22: Description des deux approches utilisées pour l'analyse fonctionnelle du microarray sur IPA.	258
Tableau 23: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).	280

Données bibliographiques

1. L'articulation synoviale

1.1 Définitions des différents types d'articulations

Une articulation est définie comme une jonction permettant de relier deux os. Le squelette humain adulte est constitué de 206 os reliés par trois types d'articulations (Figure 1), décrites ci-dessous: des synarthroses, amphiarthroses et diarthroses.

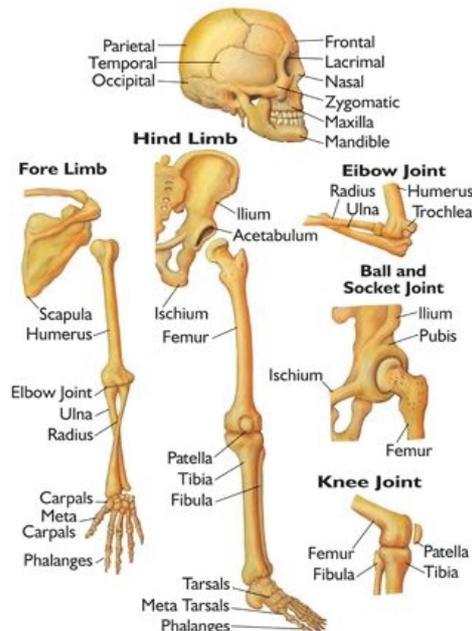


Figure 1: Articulations du crâne et des membres supérieurs et inférieurs chez l'adulte.
Source : www.oilsandplants.com/skeletalsystem.htm

1.1.1 Les synarthroses ou articulations immobiles

Les synarthroses sont des articulations immobiles, reliant des os par un tissu fibreux (Figure 2). Parmi elles, nous retrouvons les sutures crâniennes, les syndesmoses, qui unissent deux os par une membrane interosseuse (ex : entre le radius et l'ulna) et les gomphoses, qui unissent la dent à l'os alvéolaire.

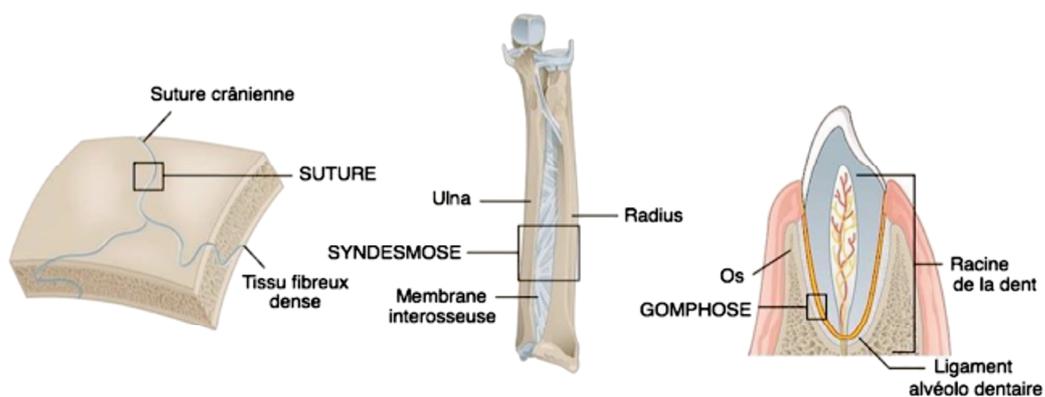


Figure 2: Synarthroses ou articulations immobiles.
Source : www.wikiwand.com/fr/Articulation_fibreuse

1.1.2 Les amphiarthroses ou articulations semi-mobiles

Les amphiarthroses sont des articulations semi-mobiles, telles que les synchondroses, qui unissent les os entre eux par un cartilage hyalin (ex : articulation costo-sternale) et les symphyses, par du fibrocartilage (ex : disque intervertébral, symphyse pubienne) (Figure 3).

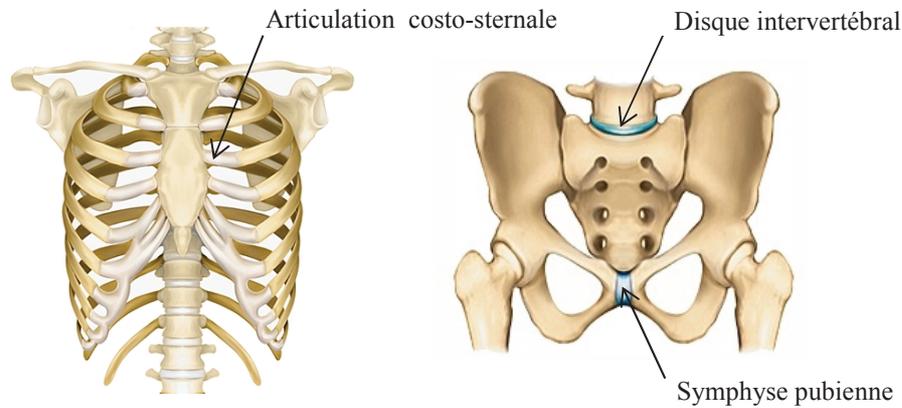


Figure 3: Amphiarthroses ou articulations semi-mobiles.

Source : www.larousse.fr/encyclopedie/medical

1.1.3 Les diarthroses ou articulations mobiles

Les diarthroses, également appelées articulations synoviales, sont des articulations mobiles, qui constituent la majorité des articulations des membres et permettent une amplitude de mouvement généralement importante. Les articulations synoviales sont caractérisées par l'existence d'une cavité articulaire et d'une membrane synoviale (Figure 4). Ces diarthroses sont recouvertes de cartilage articulaire, qui est un tissu souple, extensible et compressible. Il existe 6 types d'articulations synoviales, classées selon la morphologie des surfaces articulaires et de leurs possibilités de mouvements.

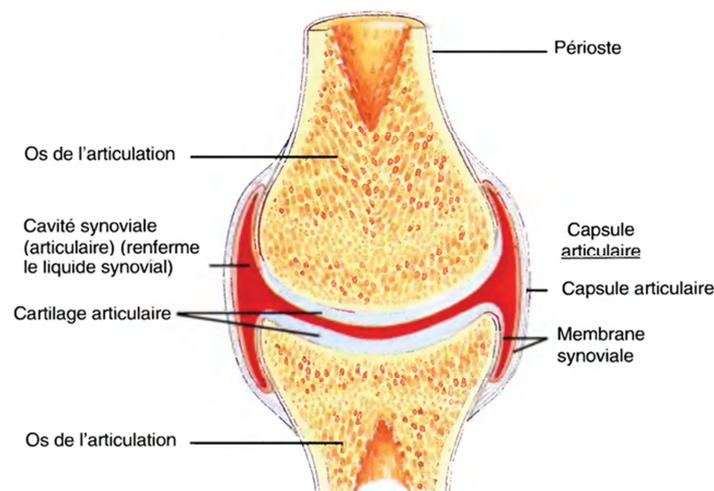


Figure 4: Anatomie d'une diarthrose.

Source : amar-constantine.e-monsite.com/pages/anatomie-physiologie/arthrologie.html

1.1.3.1 Enarthrose ou articulation sphéroïde

L'articulation sphéroïde met en contact deux surfaces articulaires dont l'une est convexe et l'autre concave (Figure 5). Les articulations scapulo-humérale de l'épaule et coxo-fémorale de la hanche sont des articulations sphéroïdes. Elles ont une grande mobilité, permettant des mouvements dans les trois plans de l'espace (Abduction/Adduction, Flexion/Extension, Rotation externe/interne).

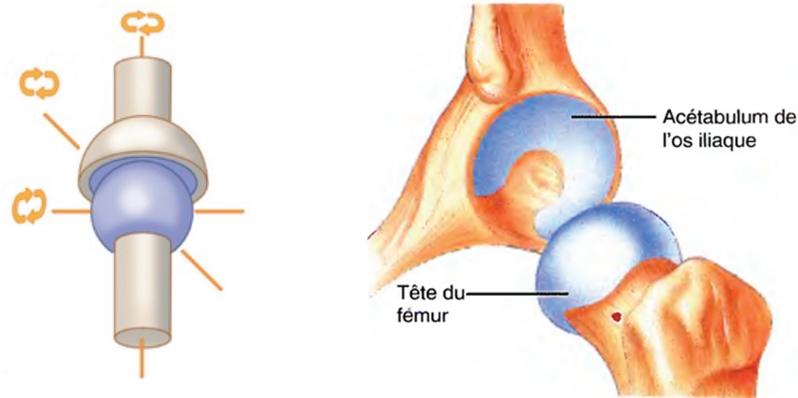


Figure 5: Articulation sphéroïde.

Exemple de l'articulation coxo-fémorale

Sources des illustrations des figures 5 à 11 : www.blog-elsevier-masson.fr/2016/10/paces-ue-5-organisation-appareils-systemes-systeme-articulaire/ et amar-constantine.e-monsite.com/pages/anatomie-physiologie/arthrologie.html

La somme des mouvements autour des trois axes permet la circumduction (Figure 6).

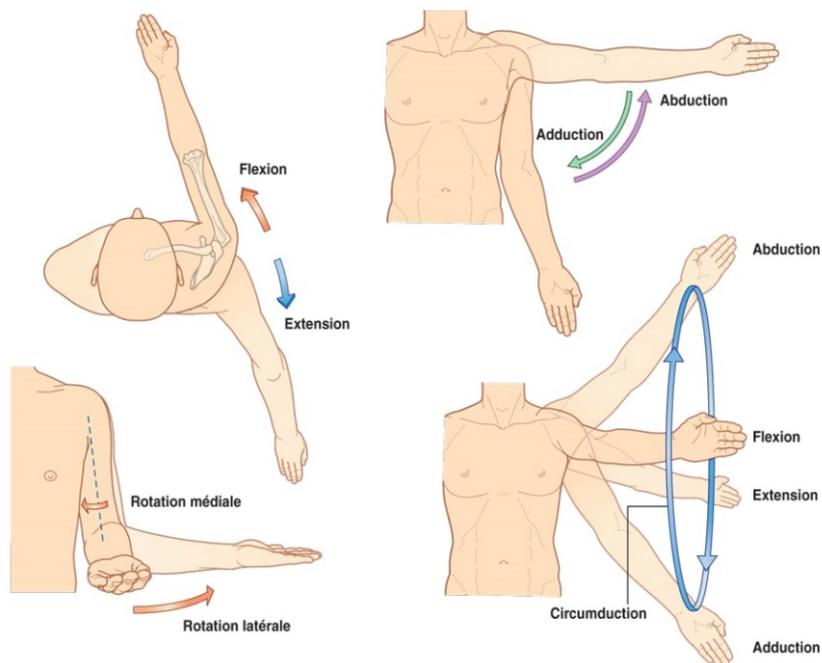


Figure 6: Mouvements des membres supérieurs.

1.1.3.2 Articulation condylienne ou ellipsoïde

L'articulation condylienne unit deux surfaces ellipsoïdales, dont l'une est convexe et l'autre concave (Figure 7). L'articulation radio-carpienne du poignet en est un exemple. Elle permet des mouvements dans deux plans de l'espace (Abduction/Adduction, Flexion/Extension).

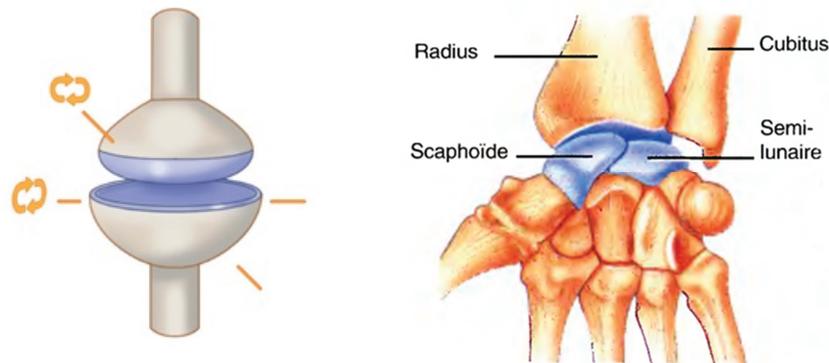


Figure 7: Articulation condylienne.
Exemple de l'articulation radio-carpienne

1.1.3.3 Articulation en selle ou par emboîtement réciproque

Dans une articulation en selle, chaque surface articulaire comporte une surface concave et une convexe, comme dans l'articulation carpo-métacarpienne du pouce (Figure 8). Elle permet des mouvements dans deux plans de l'espace (Abduction/Adduction, Flexion/Extension).

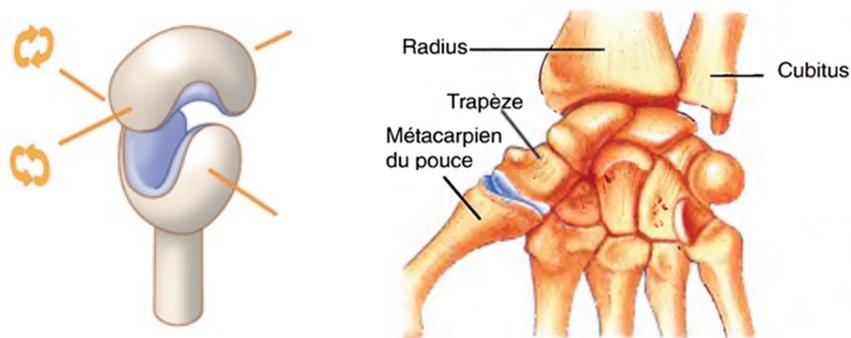


Figure 8: Articulation en selle.
Exemple de l'articulation carpo-métacarpienne

1.1.3.4 Articulation trochléenne ou à charnière

L'articulation trochléenne est constituée d'une surface articulaire concave avec un relief en forme de crête et d'une surface articulaire convexe en forme de poulie dans laquelle glisse la crête. L'articulation huméro-ulnaire du coude en est un exemple (Figure 9). Ce type d'articulation présente une mobilité réduite dans un plan de l'espace (Flexion/Extension).

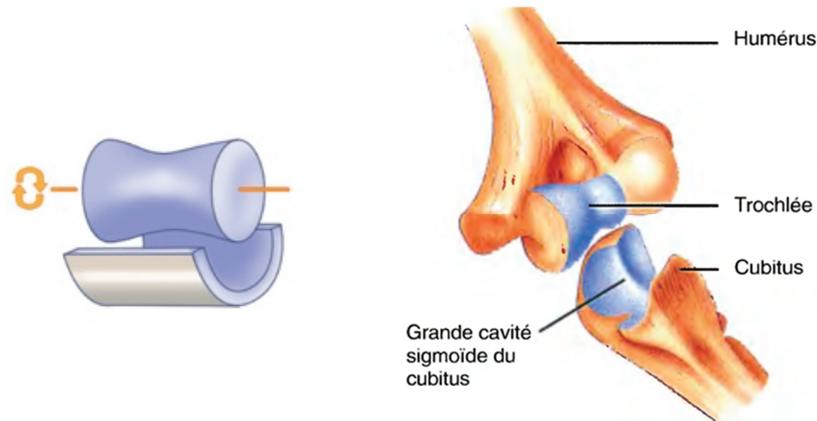


Figure 9: Articulation trochléenne.
Exemple de l'articulation huméro-ulnaire

1.1.3.5 Articulation trochoïde ou à pivot

L'articulation trochoïde unit deux surfaces cylindriques, un cylindre plein et le second concave, permettant de tourner sur un seul axe (Rotation externe/interne) (Figure 10). L'articulation radio-ulnaire proximale du coude est une articulation trochoïde.

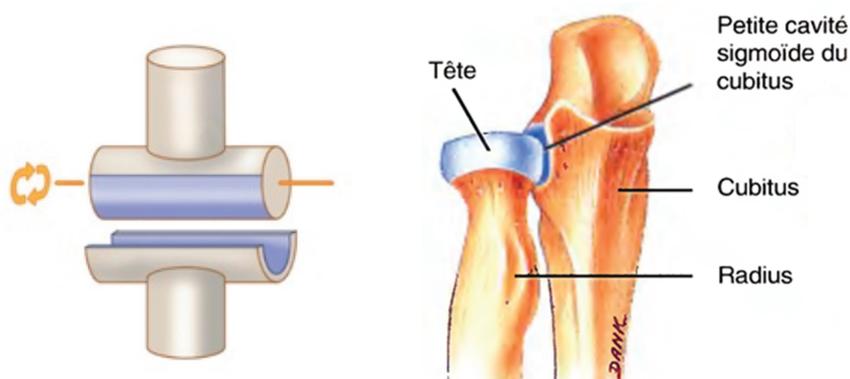


Figure 10: Articulation trochoïde.
Exemple de l'articulation radio-ulnaire proximale

1.1.3.6 Articulation plane ou arthrodie

Les articulations planes comportent des surfaces articulaires planes qui ne permettent que des mouvements de glissements limités (Figure 11), comme observé dans les articulations reliant les os du carpe ou du tarse, ainsi que dans l'articulation sterno-claviculaire.

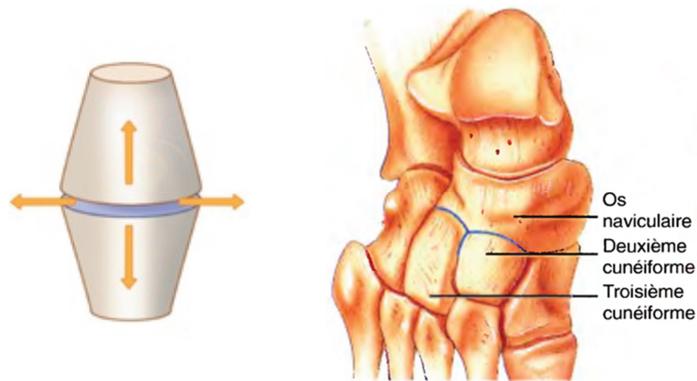


Figure 11: Articulation plane.
Exemple de l'articulation cunéo-naviculaire

1.2 Anatomie de l'articulation synoviale du genou

Le genou est une articulation synoviale composée de deux sous-types d'articulations ; une articulation bi-condylienne entre le fémur et le tibia et une articulation trochléaire entre le fémur et la rotule.

Chaque extrémité osseuse est recouverte de cartilage articulaire hyalin, un tissu conjonctif élastique, qui assure le glissement d'une pièce osseuse sur l'autre (Figure 12). L'articulation est recouverte d'une capsule articulaire, qui comprend une capsule fibreuse externe, résistante et flexible, fixée aux épiphyses osseuses du fémur et du tibia, et une couche interne formée par la membrane synoviale qui tapisse l'intérieur de la capsule fibreuse. La membrane synoviale sécrète le liquide synovial qui lubrifie les surfaces articulaires et permet ainsi de faciliter les glissements au cours d'un mouvement en réduisant les frictions (Chevalier, X. & Richette, P. 2005). L'articulation du genou est renforcée par de nombreux ligaments latéraux et centraux, tels que les ligaments croisés. Deux ménisques fibrocartilagineux, un médial et un latéral, augmentent la stabilité de l'articulation en renforçant la congruence des surfaces articulaires et en amortissant la contrainte mécanique subie par celle-ci.

Ainsi, la capsule articulaire, renforcée de ligaments, tendons et muscles délimite avec les surfaces cartilagineuses la cavité articulaire.

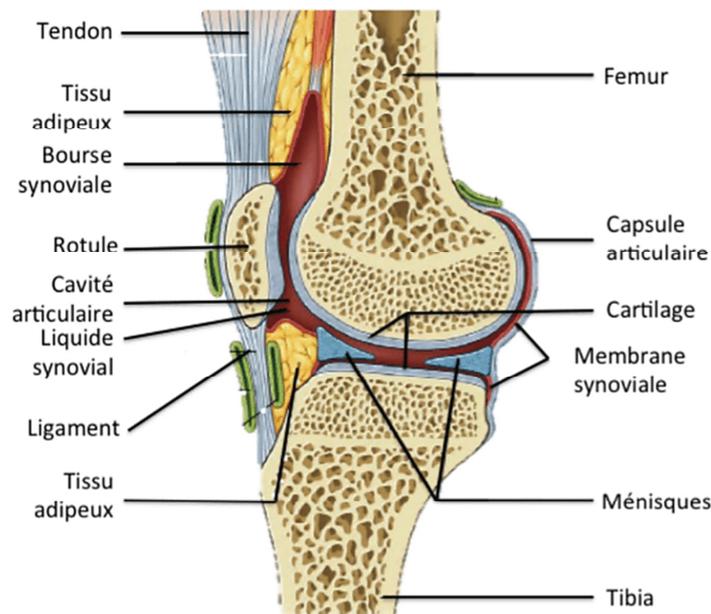


Figure 12: Anatomie de l'articulation synoviale du genou.

L'articulation se compose de tissus osseux, cartilagineux, adipeux, de la membrane synoviale, du liquide synovial et des tissus élastiques (ligaments et tendons).

Source : theconversation.com/arthrose-regenerer-le-cartilage-du-genou-au-lieu-doperer-

1.3 Origine cellulaire et développement embryonnaire du cartilage et de l'os

1.3.1 Différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Les tissus composant l'articulation ont une origine embryonnaire mésodermique, issus des cellules souches mésenchymateuses (Figure 13). Ces cellules souches ont une capacité auto-proliférative importante avant de s'engager dans une voie de différenciation donnée, à l'origine dans l'articulation des ostéoblastes et ostéocytes (os), chondrocytes (cartilage), myoblastes (muscle), cellules stromales (moelle), tenocytes/fibrocytes (tendons et ligaments), ou encore des adipocytes (tissu adipeux).

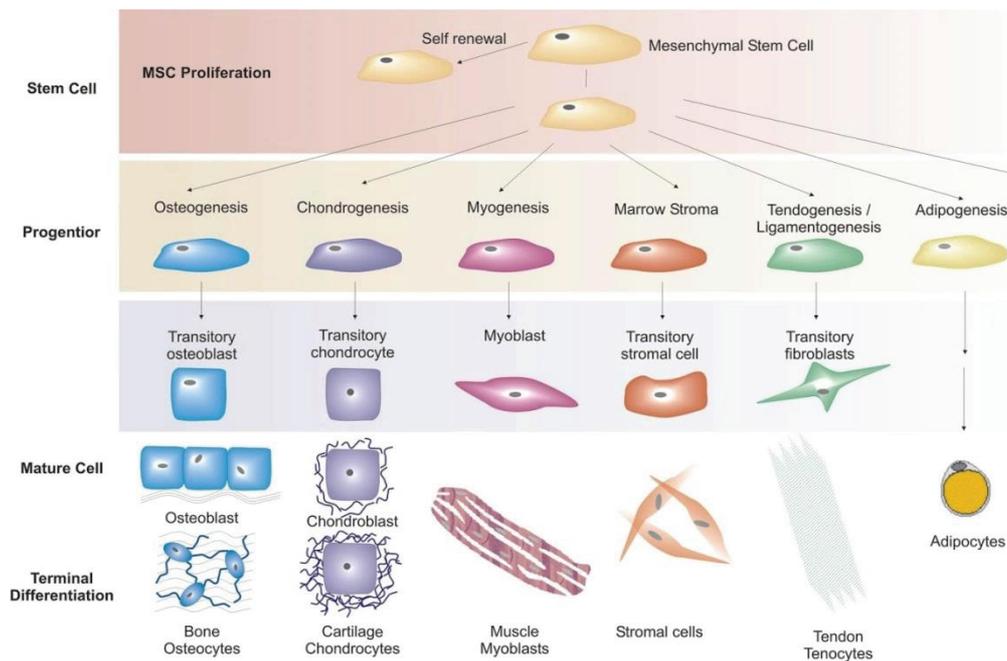


Figure 13: Voies de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

Adapté de Caplan, A. I. & Bruder, S. P. (2001).

Le squelette est composé de quatre types cellulaires spécifiques : les chondrocytes dans le cartilage, les ostéoblastes, les ostéocytes, correspondant à des ostéoblastes totalement intégrés dans une matrice, et les ostéoclastes dans l'os. Contrairement aux ostéoblastes/ostéocytes et aux chondrocytes, les ostéoclastes ne sont pas issus de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses mais des cellules souches hématopoïétiques monocytaires (Figure 14). Les recherches au cours de ces dernières décennies se sont concentrées sur l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans les mécanismes de différenciation des cellules composant le squelette. Grâce au développement de modèles animaux et particulièrement aux modèles de souris génétiquement modifiées, de nombreuses molécules impliquées dans la chondrogenèse et l'ostéogenèse ont été décrites (Karsenty, G. 2008) (Figure 15).

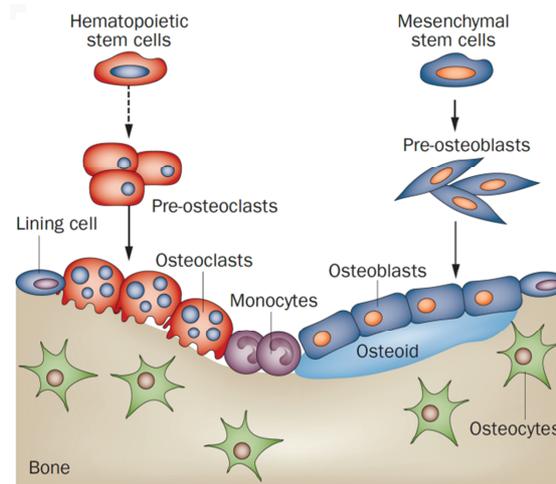


Figure 14: Origine cellulaire des ostéoblastes et des ostéoclastes, impliqués dans le remodelage osseux.

Le remodelage osseux est régulé par les ostéoclastes, qui solubilisent l'os minéral et dégradent la matrice extracellulaire, et par les ostéoblastes, qui produisent une matrice ostéoïde minéralisée. Les ostéoblastes intégrés dans la matrice se différencient alors en ostéocytes. Les ostéoclastes sont issus des cellules souches hématopoïétiques qui se différencient tout d'abord en pré-ostéoclastes mononucléés. Ces cellules fusionnent ensuite entre-elles pour former des cellules multinucléés activées. Les facteurs de croissance libérés au cours de la résorption de la matrice sont capables d'activer la différenciation des pré-ostéoblastes, issus des cellules souches mésenchymateuses afin de reformer les surfaces osseuses érodées. D'après Lian, J. B. et al. (2012).

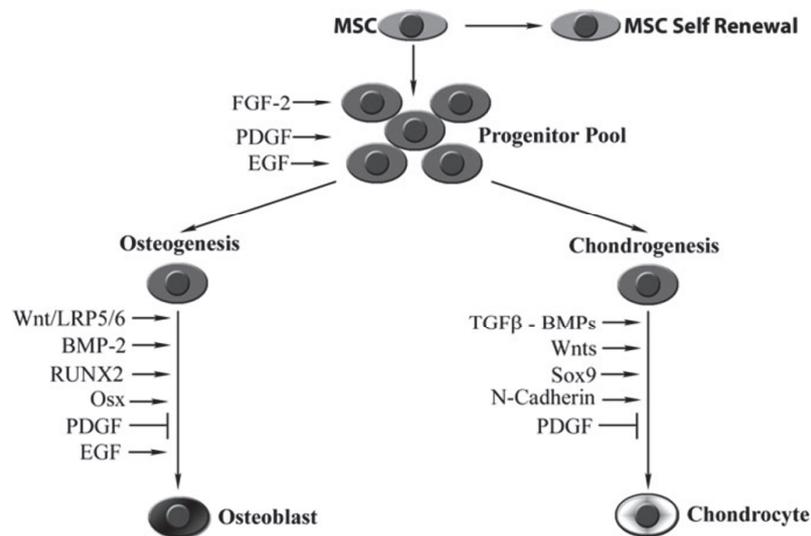


Figure 15: Principaux facteurs de transcription et molécules impliqués dans la régulation de la différenciation chondrogénique et ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses.

BMP-2: bone morphogenetic protein 2; EGF: epidermal growth factor; FGF-2: fibroblast growth factor 2; LRP5/6: low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6; Osx: Osterix; PDGF: platelet-derived growth factor; RUNX2: runt-related transcription factor 2; Sox9: SRY (sex determining region Y)-box 9; TGF- β , transforming growth factor β . D'après Augello, A. & De Bari, C. (2010).

Les voies de signalisation du transforming growth factor β (TGF- β), du fibroblast growth factor 2 (FGF-2) et du platelet-derived growth factor (PDGF) ont démontré leur importance dans la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Ng, F. et al. 2008). L'epidermal growth factor (EGF) exerce une activité mitogénique sur les MSC (Krampera, M. et al. 2005), participant ainsi à l'augmentation du pool de progéniteurs de chondrocytes et d'ostéoblastes. L'EGF favorise également la différenciation ostéoblastique contrairement au PDGF qui l'inhibe (Kratchmarova, I. et al. 2005, Gruber, R. et al. 2004). De même, le FGF-2 a été décrit pour ses capacités à promouvoir la prolifération des MSC et leur maintien dans un état indifférencié (Martin, I. et al. 1997).

La famille des protéines sécrétées de la voie Wnt a été particulièrement étudiée pour son rôle dans la modulation de la masse osseuse *in vivo* en induisant l'ostéogenèse (Liu, G. et al. 2009). La famille Wnt comprend 19 gènes chez l'Homme et 18 chez la souris, codant des protéines sécrétées, impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose, qui sont des étapes essentielles au cours du développement embryonnaire des tissus. Ces gènes jouent également un rôle dans la régénération des tissus adultes et notamment de l'os. Au cours de maladies génétiques, des mutations du gène codant la low-density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP5), un co-récepteur de la voie de signalisation canonique de Wnt, conduisant à un gain ou une perte de fonction du récepteur, sont respectivement responsables d'une faible ou d'une forte densité osseuse (Westendorf, J. J. et al. 2004). De la même façon, une perte de densité osseuse et une prédisposition aux fractures sont observées chez les souris *Lrp5*^{-/-} (Kato, M. et al. 2002) et *Lrp6*^{-/-} (Holmen, S. L. et al. 2004). Enfin, la signalisation Wnt est décrite comme étant impliquée dans la régulation du développement du cartilage en modulant la chondrogenèse et notamment la condensation mésenchymateuse au cours de l'ossification endochondrale, décrite dans le chapitre suivant (Fischer, L. et al. 2002).

La superfamille du TGF- β inclut particulièrement les bone morphogenetic proteins (BMP), les growth and differentiation factors (GDF) et bien entendu le TGF- β . Des études *in vitro* ont démontré que le TGF- β 1 et BMP-2 initiaient et maintenaient la chondrogenèse des MSC humaines en induisant notamment l'expression de molécules d'adhérence telle que la N-cadhérine, indispensable au mécanisme de condensation mésenchymateuse, précédant la différenciation chondrogénique (Tuli, R. et al. 2003, Fischer, L. et al. 2002). Les BMP (BMP-2, BMP-4, BMP-6 et BMP-7) sont impliquées au cours de la formation du cartilage et de l'os *in vivo* (Katagiri, T. & Watabe, T. 2016). Le GDF-5 participe principalement à la formation du cartilage (Tsumaki, N. et al. 1999). Les mécanismes de différenciation ostéoblastique et

chondrogénique partagent un certain nombre d'acteurs moléculaires communs, excepté les facteurs de transcription Runt-related transcription factor 2 (Runx2) et Osterix (Osx), qui contrôlent spécifiquement la différenciation ostéoblastique (Schroeder, T. M. et al. 2005, Komori, T. 2010, Nishimura, R. et al. 2012) et le facteur de transcription Sox9, qui contrôle la différenciation chondrogénique (Akiyama, H. et al. 2004, Quintana, L. et al. 2009). Il est décrit que Runx2 et Sox9 interagissent physiquement et se régulent mutuellement dans les MSC en inhibant réciproquement leur trans-activation (Cheng, A. & Genever, P. G. 2010). Cette régulation réciproque, modulant l'activation de voies de signalisation distinctes, joue un rôle évident dans le devenir des MSC.

1.3.2 Processus d'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le mécanisme de croissance en longueur des os longs et du rachis. Chez l'Homme, le développement osseux débute au cours de la 6^{ème} semaine du développement embryonnaire par la condensation des MSC, constituant un modèle mésenchymateux dont la forme ressemble globalement à celle du futur os (Figure 16). Le modèle mésenchymateux se transforme en modèle cartilagineux, formé de cartilage hyalin par la différenciation chondrogénique des MSC. Les chondrocytes sont ainsi les premières cellules du squelette à apparaître au cours du développement embryonnaire. Au cours de la 7^{ème} semaine, les cellules mésenchymateuses à la périphérie forment une fine membrane fibreuse, dénommée « périchondre ». Dans la portion moyenne de la future diaphyse, les MSC de ce périchondre s'engagent dans une voie de différenciation ostéoblastique, formant ainsi le périoste, qui subit les premiers phénomènes d'ossification. Parallèlement, les chondrocytes présents au cœur de la portion moyenne de la future diaphyse s'engagent dans une différenciation hypertrophique. Les chondrocytes hypertrophiques initient une minéralisation de la matrice cartilagineuse. Au cours de la 8^{ème} semaine, un bourgeon vasculaire pénètre le manchon périostal en direction du cartilage minéralisé. Un centre d'ossification primaire est alors mis en place. Des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques se différencient et réalisent un remodelage du cartilage calcifié, produit par les chondrocytes hypertrophiques, afin de déposer une matrice extracellulaire osseuse. Parallèlement, les ostéoclastes résorbent la matrice primaire pour créer l'ébauche de la cavité médullaire, contenant la future moelle osseuse.

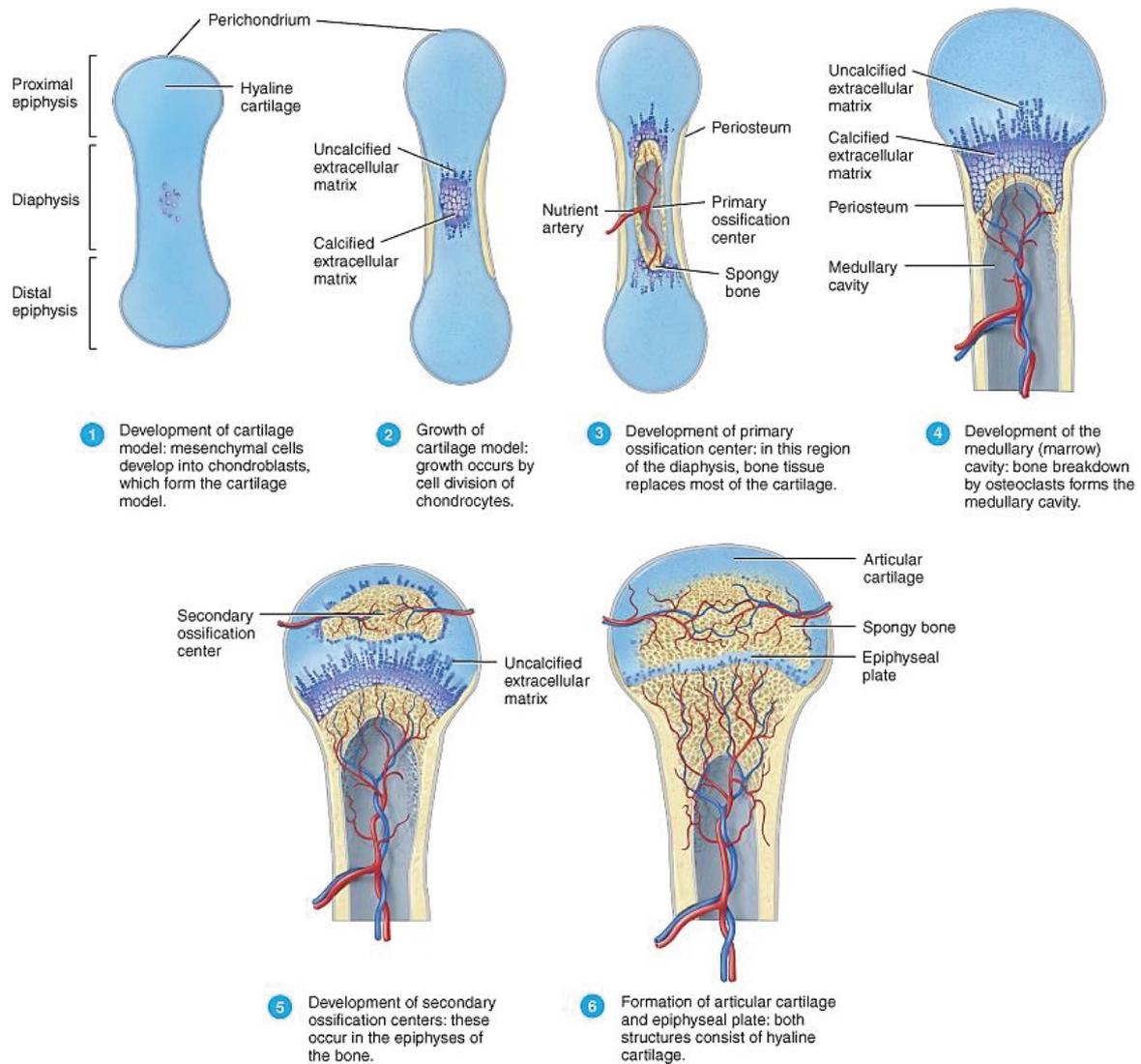


Figure 16: Principales étapes du processus d'ossification endochondrale embryonnaire chez l'Homme.

Etape 1 : Développement du modèle cartilagineux par condensation et différenciation chondrogénique des MSC. Etape 2 : croissance du modèle cartilagineux par prolifération des chondrocytes, initiation de leur différenciation hypertrophique et d'une minéralisation de la matrice au centre de la future diaphyse. Etape 3 : développement d'un centre d'ossification primaire, avec une invasion vasculaire du cartilage et un remplacement du cartilage minéralisé par un tissu osseux. Etape 4 : développement de la cavité médullaire par érosion de l'os par les ostéoclastes. Croissance de l'os par la progression de la prolifération des chondrocytes et de leur différenciation hypertrophique à proximité du centre d'ossification primaire, la minéralisation de la matrice cartilagineuse et de son remplacement par de l'os. Etape 5 : Développement de centres d'ossification secondaires aux extrémités des épiphyses. Etape 6 : Formation d'un cartilage hyalin artriculaire aux extrémités de chaque pièce osseuse et d'une plaque de croissance composée de cartilage hyalin dans la métaphyse, à la jonction entre l'épiphysse et la diaphysse. Source : knowosteoporosis.wordpress.com/physiology/

Ce processus d'ossification endochondrale va ensuite s'étendre entre le 4^{ème} et 5^{ème} mois de vie post-natale vers les extrémités des épiphyses avec la formation de centres d'ossification secondaires, envahis de vaisseaux sanguins, repoussant vers l'extérieur la zone cartilagineuse. Un cartilage hyalin, au-dessus d'une plaque de croissance, apparaît alors à chacune des extrémités des os longs. La croissance en longueur de l'os est liée à la formation de tissu osseux du côté métaphysaire de la plaque de croissance. L'épiphyse et la diaphyse seront séparées par du cartilage de croissance jusqu'à la fin de la croissance de l'individu.

1.3.3 Plaque de croissance

La plaque de croissance comprend quatre couches distinctes de chondrocytes, caractérisés selon leur morphologie et leur stade de différenciation (Figures 17 et 18):

- La zone de **réserve**, composée de cellules souches mésenchymateuses.
- La zone **proliférative**, composée de chondrocytes en colonnes qui participent activement à la croissance longitudinale et à la production de protéines matricielles.
- La zone de **maturation**, composée de chondrocytes pré-hypertrophiques.
- La zone **hypertrophique**, composée de chondrocytes d'un volume augmenté, synthétisant une matrice calcifiée. Directement en contact avec la zone de chondrocytes hypertrophiques, une invasion vasculaire massive se produit, suivie de la formation d'une matrice osseuse minéralisée.

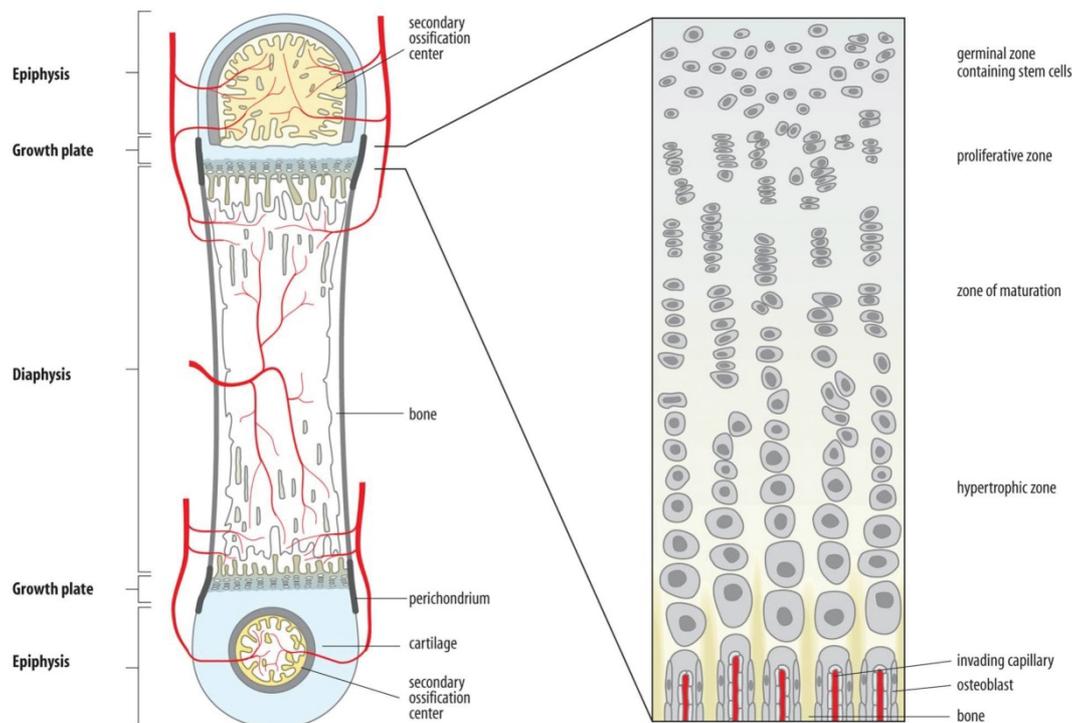
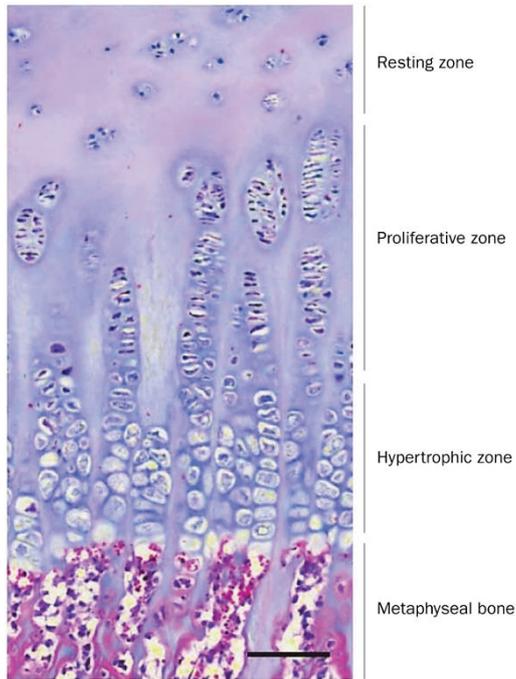


Figure 17: Organisation et morphologie des chondrocytes de la plaque de croissance.

Source: tratando-acondroplasia.blogspot.fr/2012/03/last-stronghold-growth-plate-cartilage.html

A



B

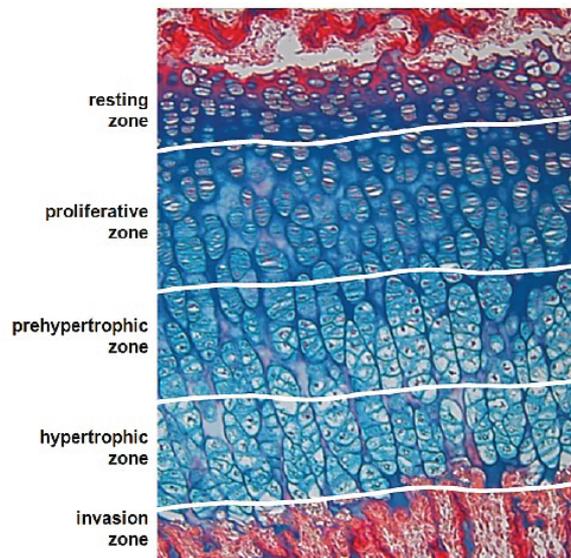


Figure 18: Organisation histologique des plaques de croissance humaine et murine.

(A) Coupe histologique d'une plaque de croissance d'un jeune garçon de 11 ans, tirée des travaux de Baron, J. et al. (2015). (B) Coupe histologique de la plaque de croissance du tibia d'une souris âgée de 15 jours, colorée à l'hématoxyline (noyaux), bleu alcian (protéoglycanes) et rouge sirius (fibres de collagènes). D'après les travaux de Dreier, R. (2010).

1.3.4 Mécanismes de différenciation hypertrophique des chondrocytes de la plaque de croissance

Une multitude de molécules, incluant des facteurs de transcription (Sox9, Runx2), des voies de signalisation (Wnt, indian hedgehog homolog (Ihh), parathyroid hormone-related protein (PTHrP)), des facteurs de croissance (membres de la famille du FGF, TGF- β , BMP, VEGF) et des hormones (insulin-like growth factor 1 (IGF-1), growth hormone (GH), hormones thyroïdiennes), contrôlent séquentiellement la maturation des chondrocytes, leur morphologie, leur différenciation hypertrophique, leur apoptose, mais aussi les processus de minéralisation et d'invasion vasculaire au cours de l'ossification endochondrale. En effet, ces mécanismes sont finement régulés de manière spatio-temporelle par l'expression de gènes spécifiques, dont les principaux sont schématiquement synthétisés dans la figure 19 (Zuscik, M. J. et al. 2008). Ainsi, des zones distinctes de cellules avec des propriétés morphologiques et moléculaires sont spécifiquement identifiées.

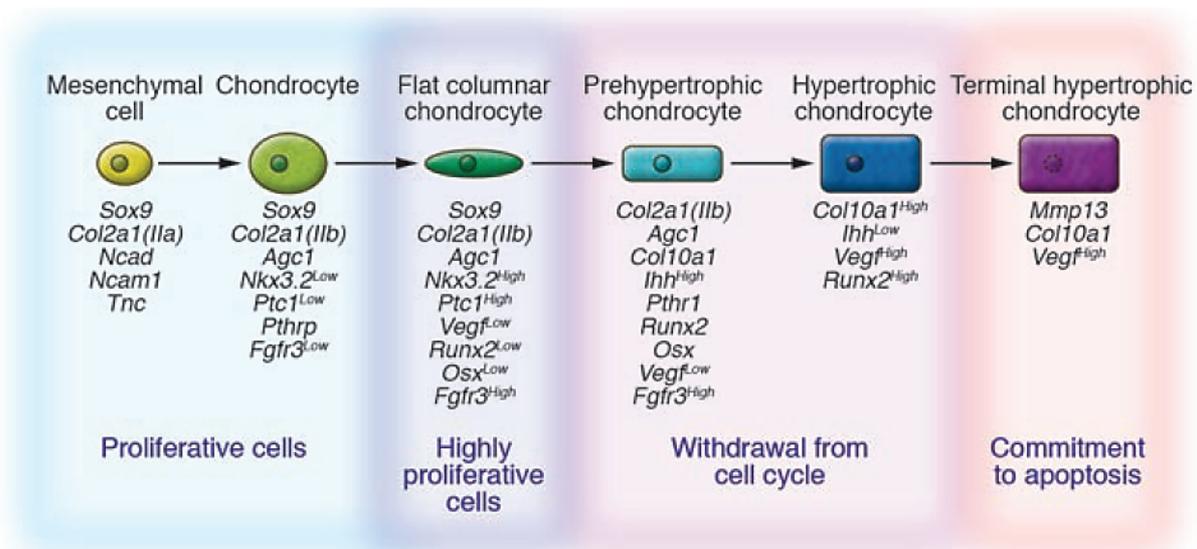


Figure 19: Principaux marqueurs moléculaires impliqués dans la différenciation des chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale.

Les principaux marqueurs moléculaires, associés aux événements cellulaires au cours de la chondrogenèse, sont schématiquement représentés ci-dessus. Une expression génique spécifique à chaque type cellulaire permet le développement et le maintien du cartilage au cours de l'ossification endochondrale. Les mentions Low et High indiquent les niveaux d'expression des gènes mentionnés. D'après les travaux de Zuscik, M. J. et al. (2008).

1.3.4.1 Cellules souches mésenchymateuses (MSC)

Les cellules mésenchymateuses expriment des molécules matricielles comme le collagène de type II (Col2a1(Iia)), des facteurs de transcription tels que Sox9 et des molécules d'adhérence comme la N-cadhérine (Ncad), la neural cell adhesion molecule 1 (Ncam1) et la ténascine C (Tnc), indispensables à la condensation mésenchymateuse afin d'initier la chondrogenèse (Figure 19) (Zuscik, M. J. et al. 2008). Il est décrit que Sox9 régule directement l'expression des gènes codant le collagène de type II et l'aggrécane au cours de la chondrogenèse chez la souris (Ng, L. J. et al. 1997, Takahashi, I. et al. 1998). Des souris déficientes pour Sox9 par knock-out conditionnel (Cre/loxP) présentent des perturbations importantes dans les étapes précoces de la différenciation chondrogénique avec une absence totale de cartilage et d'os si l'inactivation de Sox9 a été réalisée avant la condensation mésenchymateuse des MSC (Akiyama, H. et al. 2002). A l'inverse, une expression ectopique de Sox9 *in vivo* est capable de trans-activer l'expression du gène Col2a1 dans des cellules non destinées à devenir des chondrocytes (Bridgewater, L. C. et al. 1998). Des mutations du gène SOX9 causent chez l'Homme de sévères chondrodysplasies, caractérisées par un fémur courbe, des pieds bots en varus équins, de petites omoplates et une macrocéphalie avec fente

palatine. Ces atteintes sont regroupées sous l'appellation de « dysplasies campoméliques » (Foster, J. W. et al. 1994).

1.3.4.2 Chondrocytes prolifératifs

Après la différenciation des MSC en chondrocytes, une matrice extracellulaire riche en collagène de type II (Col2a1(IIb)) et en aggrécane (Agc1) est produite. Des embryons de poulets et de souris déficients pour l'aggrécane présentent un nanisme sévère et une mortalité prématurée, démontrant la contribution essentielle de l'aggrécane dans le développement squelettique (Domowicz, M. S. et al. 2009). Au cours des phases précoces de différenciation, une prolifération rapide des chondrocytes permet la croissance en longueur du futur os. Ces cellules s'aplatissent et forment des colonnes parallèles à l'axe longitudinal de croissance. Ces chondrocytes à haute capacité proliférative ont une faible expression des gènes codant Runx2, Osx et à l'inverse une forte expression du récepteur FGF receptor 3 (FGFR3). Dans ces chondrocytes, Sox9 inhibe la différenciation hypertrophique en ciblant directement les voies induites par Wnt et Runx2. Sox9 bloque également indirectement la voie de signalisation canonique de Wnt en favorisant l'ubiquitination de la β -caténine et sa dégradation par le protéasome (Akiyama, H. et al. 2004). En effet, une signalisation limitée de la β -caténine et une expression réduite de Runx2 empêchent la différenciation hypertrophique des chondrocytes. La β -caténine est finement régulée au cours du développement, par une expression cytoplasmique dans les chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques, bloquant leur différenciation hypertrophique, alors qu'une expression nucléaire est retrouvée dans les chondrocytes hypertrophiques, promouvant leur différenciation terminale (Tamamura, Y. et al. 2005).

1.3.4.3 Chondrocytes pré-hypertrophiques

Les chondrocytes pré-hypertrophiques s'élargissent légèrement et initient l'expression d'indian hedgehog (Ihh) et du parathyroid hormone-related protein receptor (PTHrP-R), impliqués dans l'inhibition de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Vortkamp, A. et al. 1996). Parallèlement, ces chondrocytes pré-hypertrophiques augmentent aussi l'expression de la phosphatase alcaline et des facteurs de transcription Runx2 et Osx, qui interviennent dans la différenciation hypertrophique et la minéralisation du cartilage. Runx2 est décrit comme un facteur de transcription essentiel pour la régulation de l'expression des gènes codant Ihh, le collagène de type X (Col10a1) et le vascular endothelium growth factor (Vegf) (Komori, T. 2010). Les souris knock-out pour Runx2 présentent une différenciation

hypertrophique des chondrocytes sévèrement altérée, à l'origine d'un squelette peu minéralisé (Yoshida, C. A. et al. 2004). A l'inverse, l'expression constitutive d'un transgène codant Runx2 dans des chondrocytes non hypertrophiques conduit à leur différenciation hypertrophique et à des processus d'ossification endochondrale ectopiques. De plus, l'introduction de ce transgène chez des souris Runx2^{-/-} restaure la différenciation hypertrophique et l'invasion vasculaire au cours de la formation osseuse (Takeda, S. et al. 2001). Des mutations du gène RUNX2 causent chez l'Homme une dysplasie cléido-crânienne (Zhang, Y. W. et al. 2000) qui se caractérise par une diminution du volume ou une absence de clavicule, associée à un retard ou à une absence de soudure des os du crâne, avec une malformation des dents. Le facteur de transcription Osx a été identifié comme une cible de Runx2 mais aussi comme un régulateur direct de l'expression du gène codant la métalloprotéase matricielle 13 (MMP-13) (Nishimura, R. et al. 2012), une enzyme catabolique qui dégrade la matrice du cartilage (Mattot, V. et al. 1995). Il s'agit d'un facteur nécessaire au cours de l'ossification endochondrale.

1.3.4.4 Chondrocytes hypertrophiques

Au cours de leur différenciation hypertrophique, les chondrocytes élargissent leur volume intracellulaire de près de 10 fois, en augmentant le nombre et la taille des organites et des vacuoles (Melrose, J. et al. 2016). Ces chondrocytes hypertrophiques minéralisent leur matrice et expriment fortement Runx2, le collagène de type X et la phosphatase alcaline, permettant l'initiation de la calcification du cartilage. Ils expriment également le gène codant le VEGF, qui constitue un facteur essentiel impliqué dans la coordination de l'apoptose des chondrocytes, le remodelage de la matrice extracellulaire, la vascularisation du cartilage minéralisé et la formation osseuse dans la plaque de croissance murine (Gerber, H. P. et al. 1999).

1.3.4.5 Différenciation terminale des chondrocytes

Les chondrocytes hypertrophiques se différencient jusqu'en phase terminale où ils expriment fortement la MMP-13. Un mécanisme de dégradation précède la minéralisation induite par les ostéoblastes et la création de la cavité de la moelle osseuse. Chez les souris Runx2^{-/-}, le VEGF, le collagène de type X et la MMP-13, requis pour l'invasion vasculaire et le remodelage du tissu au cours de l'ossification endochondrale sont drastiquement réduits voire absents (Gerber, H. P. et al. 1999, Inada, M. et al. 1999). La différenciation terminale des chondrocytes aboutit à une apoptose. Leur matrice résiduelle sert de base pour les dépôts

minéraux et la formation d'os par les ostéoblastes. Runx2 est également impliqué dans l'engagement des MCS vers une voie de différenciation ostéoblastique. En effet, dans des études *in vivo*, ce facteur induit l'expression de gènes codant des protéines matricielles osseuses telles que le collagène de type I, l'ostéopontine (OPN), l'ostéocalcine (OC), la bone sialoprotein 2 (BSP-2) et la fibronectine 1 (Komori, T. 2010).

Enfin, grâce à une approche de lignage cellulaire des chondrocytes hypertrophiques murins, une équipe a démontré l'existence, jusqu'ici controversée, d'une différenciation des chondrocytes hypertrophiques en cellules ostéogéniques au cours de l'ossification endochondrale embryonnaire et post-natale, qui persistent chez l'adulte (Yang, L. et al. 2014). La découverte d'un continuum entre les lignages chondrocytaire et ostéoblastique revisite ainsi le concept de l'origine des ostéoblastes et leur implication dans le contrôle de l'homéostasie de l'os. D'autres travaux ont également confirmé ces résultats (Zhou, X. et al. 2014, Park, J. et al. 2015, Hu, D. P. et al. 2017).

Au cours du développement post-natal précoce, les chondrocytes épiphysaires immatures subissent une différenciation similaire à celle produite au cours de l'embryogenèse, à savoir une différenciation chondrocytaire, une hypertrophie des chondrocytes et une invasion vasculaire, participant à la formation du cartilage articulaire hyalin.

1.4 Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif spécialisé atypique, puisqu'il n'est ni vascularisé ni innervé. Il est composé d'une matrice extracellulaire cartilagineuse très abondante, représentant près de 95% du volume du cartilage, synthétisée par l'unique type cellulaire de ce tissu, le chondrocyte (5%) (Aigner, T. et al. 2006a). Il s'agit d'un cartilage de type hyalin, qui est un tissu blanc, nacré, lisse et élastique (Figure 20). Son épaisseur varie entre les différentes articulations mais aussi au sein d'une même articulation, celle-ci étant proportionnelle à l'intensité des contraintes mécaniques subies (Shepherd, D. E. T. & Seedhom, B. B. 1999). L'épaisseur moyenne du cartilage articulaire de l'articulation fémoro-tibiale est de 5 à 6 mm contre 2 à 4 mm pour l'articulation coxo-fémorale. Grâce à ses propriétés viscoélastiques, le cartilage permet d'amortir et de distribuer les chocs mécaniques appliqués sur l'articulation.

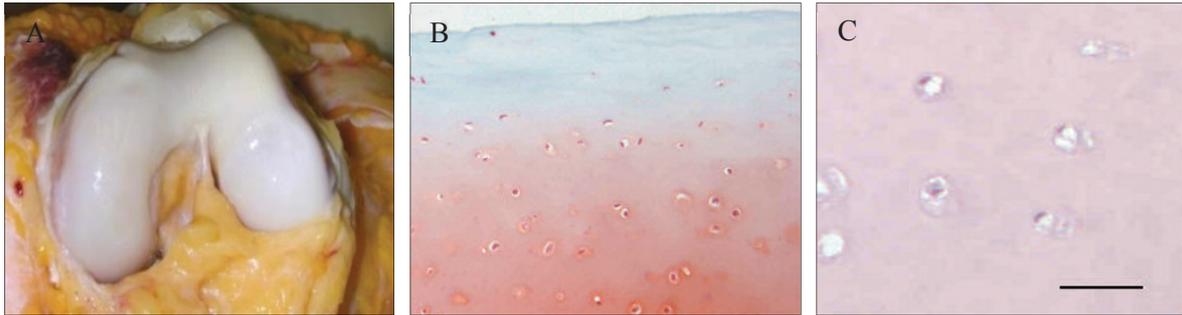


Figure 20: Aspects macroscopique et histologique du cartilage articulaire humain.

(A) Aspect macroscopique des condyles fémoraux d'un genou sain (Aigner, T. et al. 2006a).
 (B) Coupe histologique d'un cartilage articulaire, coloré à la safranine O (protéoglycanes).
 (C) Visualisation des chondrocytes articulaires dans leur matrice sur une coupe histologique de cartilage colorée à l'hématoxyline/éosine (noyaux/fibres de collagènes du tissu conjonctif).
 D'après les travaux de Wachsmuth, L. et al. (2006).

1.4.1 Organisation des chondrocytes articulaires

Le chondrocyte est une cellule de forme sphérique ou ovoïde de 10 à 30 μm de diamètre. Il est contenu dans une logette, dénommée chondroplaste, et produit une matrice organisée en différentes régions, les matrices péri-cellulaire (PCM), territoriale (TM) et extracellulaire (ECM), bien visualisées en microscopie électronique (Figure 21) (Wilusz, R. E. et al. 2014). Les chondrocytes possèdent tous les organites nécessaires à la synthèse et à la maturation des protéines intra- et extracellulaires : un noyau volumineux, un réticulum endoplasmique, un appareil de golgi et des mitochondries. En condition physiologique, les chondrocytes maintiennent l'homéostasie du cartilage en préservant un équilibre entre la synthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) des protéines de la matrice cartilagineuse.

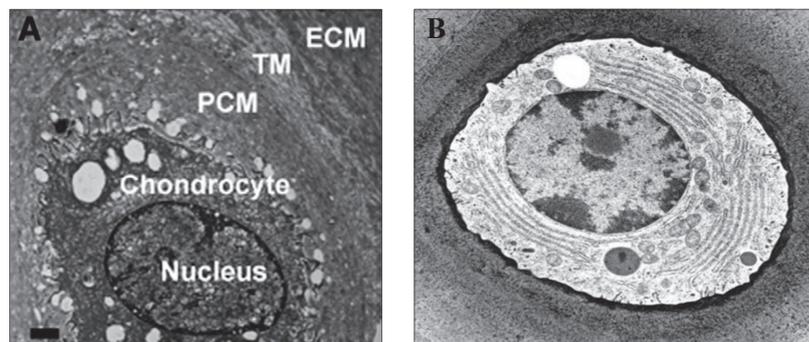


Figure 21: Structures d'un chondrocyte et de sa matrice environnante en microscopie électronique.

(A) Visualisation des 3 régions de la matrice, synthétisées par le chondrocyte : matrice péri-cellulaire (PCM), territoriale (TM) et extracellulaire (ECM). D'après Wilusz, R. E. et al. (2014). (B) Mise en évidence d'un noyau volumineux et d'une machinerie cellulaire développée (réticulum endoplasmique, appareil de golgi, mitochondries, lysosomes et vacuoles de glycogène).

Ces cellules ont un métabolisme majoritairement anaérobie en raison des propriétés avasculaires du cartilage. Il existe en effet un gradient hypoxique de 10% de teneur en oxygène à la surface articulaire à 1% en profondeur (Chevalier, X. & Richette, P. 2005). L'oxygène et les nutriments sont principalement fournis par le liquide synovial, correspondant à un dialysat sélectif du plasma, dépourvu des protéines de haut poids moléculaire. Les molécules pénètrent alors le cartilage par simple diffusion pour les plus petites d'entre elles et par imbibition, favorisée par la compression du cartilage et les mouvements de fluides au cours de la mobilité de l'articulation (O'Hara, B. P. et al. 1990). L'os sous-chondral, richement vascularisé, contribue à la nutrition des zones les plus profondes du cartilage.

La taille des chondrocytes, leur nombre et leur forme varient en fonction des couches du cartilage articulaire (Figure 22). En effet, ce cartilage est structurellement et fonctionnellement hétérogène, organisé en quatre zones distinctes : superficielle, intermédiaire, radiale et calcifiée. Ces zones sont caractérisées par la composition et l'organisation de leurs matrices, ainsi que le phénotype et le profil d'expression génique des chondrocytes qui les composent, de façon similaire aux événements précédemment décrits dans la plaque de croissance (Zuscik, M. J. et al. 2008, Mahjoub, M. et al. 2012, Zhang, X. et al. 2015).

La **couche superficielle** représente environ 10 à 20% du volume total du cartilage et comporte de nombreux chondrocytes aplatis et de petite taille. Il s'agit de la couche directement en contact avec le liquide synovial, qui correspond à la surface de glissement du cartilage au cours d'un mouvement. Les fibres de collagènes, principalement de type II et IX, sont disposées parallèlement à la surface articulaire, lui conférant ainsi une importante résistance aux forces de cisaillement engendrées au cours des mouvements et une protection des couches plus profondes du cartilage (Figures 22 et 23).

La **couche intermédiaire ou moyenne** représente 40 à 60% du volume du cartilage. Les chondrocytes sont arrondis, dispersés dans un réseau de fibres épaisses de collagènes, entrecroisées et non orientées, ainsi que de protéoglycanes, qui procurent au cartilage une résistance aux forces de compression (Figures 22 et 23).

Les chondrocytes des couches superficielles et intermédiaires expriment fortement les marqueurs de la différenciation chondrocytaire, tels que le facteur de transcription Sox9 et les composants majeurs de la MEC, qui sont le collagène de type II et l'aggrécane (Zuscik, M. J. et al. 2008).

La **couche profonde** représente environ 30% du volume du cartilage, où les chondrocytes sont organisés en colonnes au sein d'une matrice riche en protéoglycanes, constituée de fibres de collagènes perpendiculaires à la surface. Elle assure la plus grande résistance aux forces de compression (Figures 22 et 23).

Les chondrocytes de la couche profonde expriment à la fois des marqueurs de différenciation chondrocytaire (Sox9, Col II, Agg) et d'hypertrophie (Runx2, Col X, phosphatase alcaline). Il s'agit des chondrocytes décrits comme pré-hypertrophiques (Zuscik, M. J. et al. 2008).

La **couche calcifiée**, représentant entre 5 et 10% du volume du cartilage, comporte des chondrocytes arrondis, d'un grand volume, identifiés comme des chondrocytes hypertrophiques. Cette couche constitue une interface entre le cartilage non minéralisé et l'os sous-chondral. Ce cartilage calcifié est séparé de la couche profonde par la tidemark (Fawns, H. T. & Landells, J. W. 1953), une fine ligne d'environ 10 µm d'épaisseur révélée après marquage à l'hématoxyline, qui délimite le front de minéralisation. Cette couche calcifiée est pauvre en protéoglycanes. Ses fibres de collagènes conservent une orientation radiaire, sans continuité avec les fibres de collagènes de l'os sous-jacent (Figures 22 et 23).

Le cartilage calcifié est unique dans sa composition matricielle, sa minéralisation, sa vascularisation, son innervation et par l'état hypertrophique des chondrocytes, qui n'expriment quasiment plus les marqueurs de différenciation chondrocytaire. En revanche, une expression importante du collagène de type X et de la phosphatase alcaline, impliqués dans les processus de minéralisation de la matrice, est détectée (Zuscik, M. J. et al. 2008).

Le « chondrocyte » représente donc un terme générique pour définir l'ensemble des types cellulaires présents dans le cartilage.

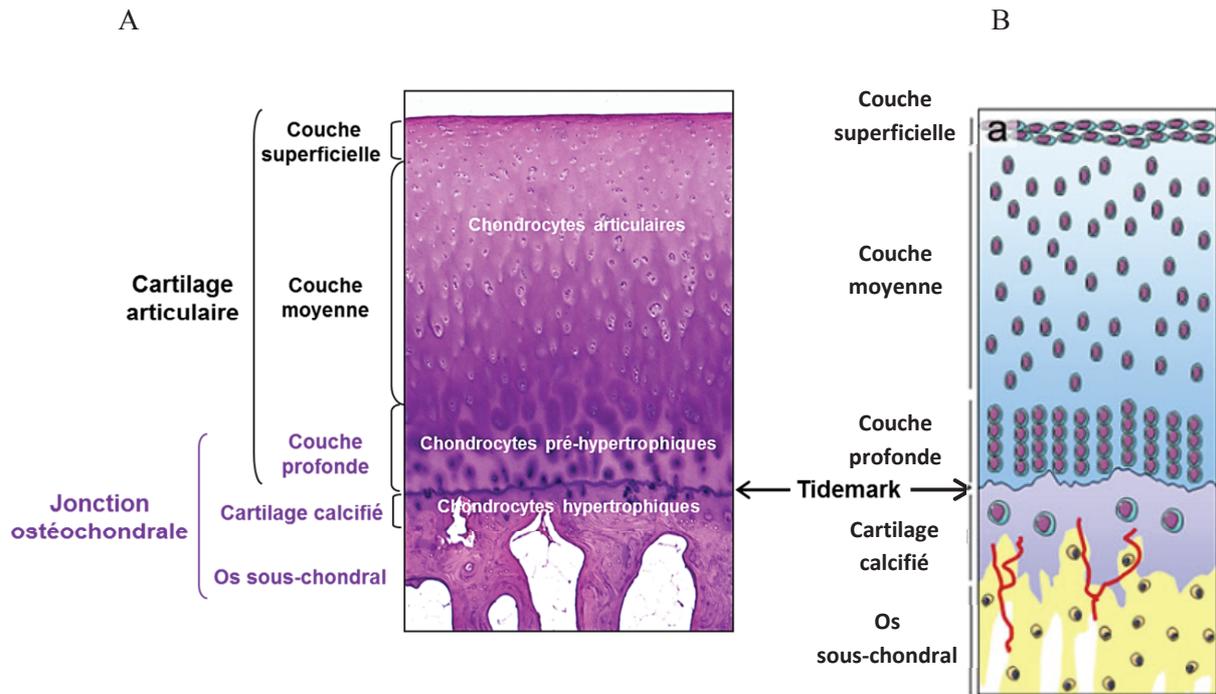


Figure 22: Organisation histologique du cartilage articulaire.

(A) Coupe histologique d'un cartilage articulaire humain sain montrant l'organisation des chondrocytes suivant les différentes couches du tissu (superficielle, moyenne, profonde et calcifiée). Les chondrocytes articulaires sont présents dans les couches superficielle et moyenne, les chondrocytes pré-hypertrophiques dans la couche profonde du cartilage articulaire. Enfin, les chondrocytes hypertrophiques sont présents dans la couche de cartilage calcifié à la jonction ostéochondrale. La tidemark délimite le cartilage articulaire non calcifié du cartilage calcifié. Adapté des travaux de Loeser, R. F. et al. (2012).

(B) Schéma représentatif de la disposition et de la morphologie des chondrocytes en fonction des couches du cartilage. Adapté des travaux de Mahjoub, M. et al. (2012).

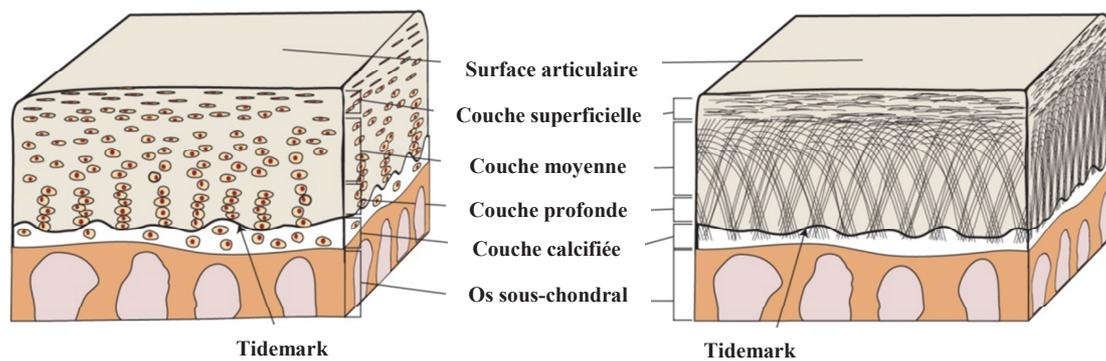


Figure 23: Organisations schématiques des chondrocytes et de la disposition des fibres de collagènes suivant la profondeur du cartilage.

(A) Disposition des chondrocytes et (B) des fibres de collagènes de la matrice extracellulaire en fonction des couches du cartilage. Ces couches correspondent à des teneurs variables en composants de la matrice et à une organisation différente des fibres de collagènes dans chaque couche. Cette organisation suggère que les fibres de collagènes sont organisées en arceaux dont les extrémités s'implantent dans la couche calcifiée et dont la réflexion se fait dans les zones moyenne et superficielle, assurant une véritable armature au tissu cartilagineux. Adapté de Zhang, X. et al. (2015).

1.4.2 Composition de la matrice cartilagineuse

La matrice extracellulaire cartilagineuse (MEC) est composée majoritairement d'eau (60-80%) et d'un réseau complexe de macromolécules, qui confèrent au cartilage ses propriétés de résistance aux contraintes mécaniques subies par l'articulation (Figure 24) :

Les **collagènes** constituent les composants les plus abondants (55%) de la matrice du cartilage, dont le collagène de type II est le représentant principal (90-95% de l'ensemble des collagènes). Les collagènes de type VI, IX et XI sont également présents dans la matrice (Gelse, K. et al. 2003). Le collagène X est quant à lui restreint à la matrice du cartilage calcifié.

Les **protéoglycanes** constituent les autres composés majeurs de la matrice cartilagineuse. Il existe des protéoglycanes de haut poids moléculaire, comme l'aggrécane, qui représente près de 90% des protéoglycanes du cartilage. L'aggrécane est composé d'une protéine centrale (core protein), à laquelle se fixent des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) à chondroïtine sulfate et kératane sulfate. Les principaux GAG des protéoglycanes présents dans le cartilage sont la chondroïtine sulfate, le kératane sulfate et l'héparane sulfate. Ils sont constitués de longues chaînes composées d'unités disaccharidiques répétitives, dont un des deux résidus glucidiques est un glucide aminé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) et le second est habituellement un acide uronique (glucuronique ou iduronique). Ces GAG ont la propriété de pouvoir lier et retenir des facteurs de croissance dans la matrice extracellulaire. Il existe également des protéoglycanes de petit poids moléculaire, comme le biglycane, la décorine, la fibromoduline et la lubricine. Une fois synthétisés, les protéoglycanes s'insèrent dans le réseau de fibres de collagènes et participent à sa stabilité. L'aggrécane joue un rôle particulièrement important dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC grâce à sa liaison avec l'acide hyaluronique (Kiani, C. et al. 2002).

L'**acide hyaluronique** est un GAG de longue taille et de haut poids moléculaire non sulfaté, qui présente la particularité de ne pas se lier aux protéines pour former des protéoglycanes. Toutefois, l'acide hyaluronique permet aux protéoglycanes de se lier à sa chaîne de façon non covalente par l'intermédiaire de glycoprotéines (link protein). Une molécule d'acide hyaluronique pourrait fixer plus de 1000 molécules d'aggrécane. Cette dernière est composée de nombreux GAG chargés négativement, lui conférant une grande

affinité pour l'eau. Cette rétention d'eau assure donc l'hydratation et la viscoélasticité du cartilage (Kiani, C. et al. 2002).

Les **protéines non collagéniques** vont piéger dans leurs maillages différents facteurs de croissance, dont la concentration et l'activité vont permettre aux chondrocytes de garder leur phénotype. Les glycoprotéines, comme la fibronectine, la chondroadhérine, les thrombospondines (TSP) et la laminine, sont capables de se fixer aux collagènes et aux protéoglycanes, ce qui permet de stabiliser l'architecture du réseau et d'ainsi renforcer la résistance de la matrice cartilagineuse (Bosman, F. T. & Stamenkovic, I. 2003). La protéine oligomeric protein (COMP ou TSP-5) serait également impliquée dans le maintien de l'intégrité de la matrice cartilagineuse en raison de ses nombreuses interactions avec les fibres de collagènes, l'aggrécane, les chaînes de chondroïtine sulfate ou encore la fibronectine (Acharya, C. et al. 2014). Elle serait aussi impliquée dans la régulation de la réponse des chondrocytes aux facteurs de croissance en favorisant leur interaction. La protéine COMP est utilisée comme un biomarqueur sérique reflétant la dégradation du cartilage (Hunter, D. J. et al. 2007, Valdes, A. M. et al. 2014).

De manière intéressante, la composition de la matrice varie également en fonction de sa région péri-cellulaire, territoriale et extracellulaire (Figure 25). La matrice péri-cellulaire est une fine couche de matrice en contact direct avec la membrane du chondrocyte. Elle est principalement constituée de protéoglycanes, glycoprotéines et de protéines non collagéniques. Cette région matricielle pourrait être impliquée dans l'initiation de la transduction des signaux au sein du cartilage. La matrice territoriale, plus épaisse, entoure la matrice péri-cellulaire. Elle comporte majoritairement des fibres de collagènes qui s'organisent en réseaux autour des chondrocytes, participant à la protection du cartilage contre les contraintes mécaniques. Enfin, la région inter-territoriale ou extracellulaire est la plus étendue et correspond au réseau de fibres de collagènes, organisées parallèlement à la surface dans la zone superficielle du cartilage, aléatoirement dans la zone intermédiaire et enfin perpendiculairement dans la zone profonde. Cette région inter-territoriale est celle qui contribue le plus aux propriétés biomécaniques du cartilage articulaire.

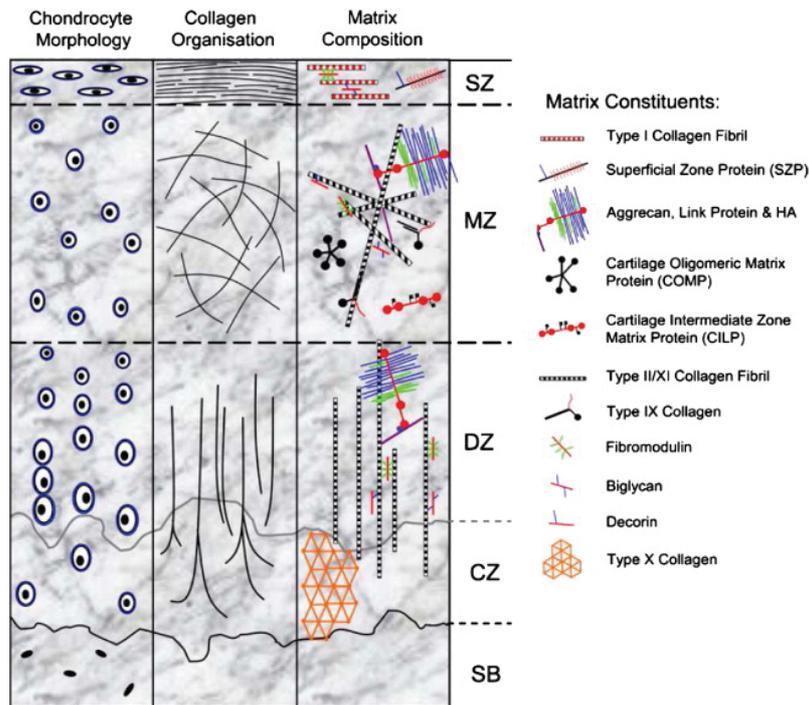


Figure 24: Organisation cellulaire et macromoléculaire du cartilage articulaire mature. Ce schéma synthétise la morphologie des chondrocytes (à gauche), l'organisation des fibres de collagènes (au milieu) et la composition en protéines matricielles (à droite) majoritairement présentes selon les couches de cartilage : superficielle (SZ), moyenne (MZ), profonde (DZ) et calcifiée (CZ), reposant sur l'os sous-chondral (SB). Tiré des travaux de Wilson, R. et al. (2009).

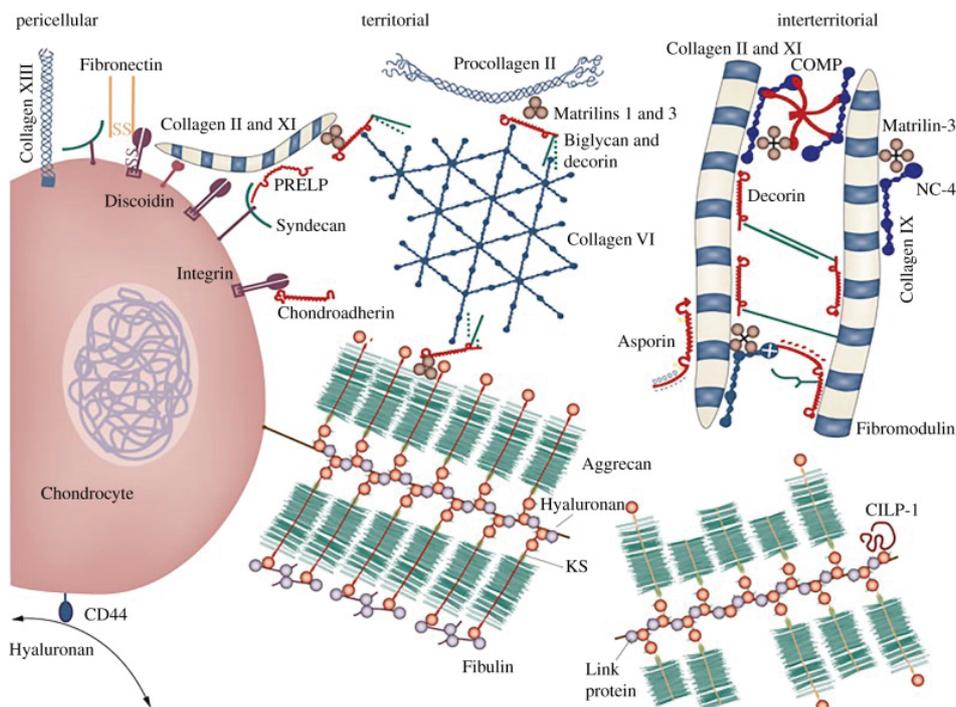


Figure 25: Composition macromoléculaire de la matrice péri-cellulaire, territoriale et inter-territoriale. D'après Lindahl, A. et al. (2015).

1.4.3 Propriétés avasculaires du cartilage non calcifié

Le cartilage articulaire non calcifié fait partie des rares tissus de l'organisme totalement dépourvus de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et de nerfs (Eisenstein, R. et al. 1973). Plusieurs études ont démontré que l'hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) était un facteur essentiel promouvant la fonction et la survie des chondrocytes en condition hypoxique, en activant l'expression de Sox9, Col2a1 et Acan et en inhibant l'expression de marqueurs de dédifférenciation comme Col1a1, Col1a2 et Col3a1 (Schipani, E. et al. 2001, Pfander, D. et al. 2003, Duval, E. et al. 2009). Au cours du développement du cartilage articulaire et de la plaque de croissance, un certain nombre de molécules angiogéniques, comme le bFGF (Twal, W. O. et al. 1994) et le VEGF (Gerber, H. P. et al. 1999), a été mis en évidence dans la régulation de la formation de ces tissus. L'expression du VEGF dans la plaque de croissance est régulée positivement par des mécanismes en partie dépendants de HIF-1 α . Ces deux facteurs sont décrits comme indispensables à la survie des chondrocytes au cours du développement (Zelzer, E. et al. 2004). Le cartilage a également été montré comme l'une des sources majeures de TGF- β (Gelb, D. E. et al. 1990), qui est décrit comme un facteur favorisant l'angiogenèse *in vivo* (Yang, E. Y. & Moses, H. L. 1990). Cependant avant 1990, aucune molécule n'a été identifiée comme responsable des propriétés avasculaires des tissus. L'équipe de Moses a purifié pour la première fois une protéine de 35 kDa, dérivée du cartilage bovin, qui a montré un effet inhibiteur sur l'angiogenèse dans des études *in vitro*, sur la prolifération et la migration de cellules endothéliales, et *in vivo* sur une membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet. Cette protéine a également démontré un effet inhibiteur sur les collagénases (Moses, M. A. et al. 1990 et 1992).

Peu de temps après, la chondromoduline I (ChM-I) a été purifiée à partir de cartilage bovin fœtal par l'équipe d'Hiraki (Hiraki, Y. et al. 1991). Elle a ensuite été identifiée comme un inhibiteur de l'angiogenèse, bloquant la prolifération des cellules endothéliales et la tubulogenèse *in vitro* (Hiraki, Y. et al. 1997). Shukunami, C. et al. (1999) a étudié l'expression génique de la ChM-I au cours de l'ossification endochondrale chez la souris et a montré qu'elle était exprimée spécifiquement dans les zones non vascularisées du cartilage, associée à l'expression du collagène de type II. En revanche, l'expression de la ChM-I était complètement abolie dans la zone de cartilage calcifié, contenant les chondrocytes hypertrophiques. Les auteurs ont ainsi suggéré un potentiel rôle de la chondromoduline I dans la régulation de l'invasion vasculaire du cartilage au cours du processus d'ossification endochondrale. Ce facteur anti-angiogénique est retrouvé en grande quantité dans les matrices

extracellulaires des cartilages de croissance et des cartilages articulaires de rats (Kitahara, H. et al. 2003). Sa présence a été étudiée plus récemment dans le cartilage articulaire humain (Zhang, X. et al. 2016a). Finalement, en plus de ses propriétés anti-angiogéniques, la ChM-I a été suggérée comme une protéine impliquée dans le maintien du phénotype chondrocytaire en inhibant la différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires (Klinger, P. et al. 2011, Zhang, X. et al. 2016a).

Le pigment epithelium-derived factor (PEDF) a été identifié comme une molécule anti-angiogénique jouant un rôle essentiel dans la cornée (Dawson, D. W. et al. 1999). Dans la plaque de croissance murine, l'expression du PEDF est limitée aux chondrocytes de la zone de réserve, de la zone proliférative et au niveau des couches supérieures des chondrocytes hypertrophiques (Quan, G. M. Y. et al. 2005). En revanche, son expression est fortement diminuée dans les couches profondes des chondrocytes hypertrophiques, à proximité des zones vascularisées.

Les thrombospondines 1 et 2 (TSP-1, TSP-2) sont des molécules anti-angiogéniques qui ont été mises en évidence par immunohistochimie dans la matrice extracellulaire du cartilage non vascularisé de la plaque de croissance murine, notamment dans les couches de chondrocytes prolifératifs et prolifératifs tardifs, au-dessus des chondrocytes hypertrophiques (Tooney, P. A. et al. 1998). Ces observations suggèrent la formation d'une barrière de facteurs anti-angiogéniques entre le cartilage calcifié vascularisé et le cartilage non calcifié avasculaire. La TSP-1 a également été suggérée comme une molécule induisant la prolifération des chondrocytes et le maintien de leur phénotype (O'Shea, K. S. & Dixit, V. M. 1988). Dans le cartilage humain, la présence de TSP-1 a été décrite dans les couches intermédiaires et profondes contenant les chondrocytes pré-hypertrophiques (Pfander, D. et al. 2000). En revanche, son expression n'a pas été détectée dans le cartilage calcifié, contenant les chondrocytes hypertrophiques.

D'autres molécules aux propriétés anti-angiogéniques ont été identifiées dans le cartilage articulaire, comme des fragments de collagène et notamment du collagène XVIII, dénommé endostatine, qui a démontré des effets inhibiteurs sur la voie de signalisation du VEGF (Pufe, T. et al. 2004a).

Enfin, les tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), présentent également des actions anti-angiogéniques dans le cartilage en inhibant l'action des protéases et des métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire au cours de sa

vascularisation. Ainsi, les TIMP-1, TIMP-3 et les inhibiteurs de protéases : le secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) et le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) ont été décrits comme des molécules potentiellement impliquées dans le maintien des propriétés avasculaires du tissu cartilagineux (Fransès, R. E. et al. 2010). TIMP-1 est la plus abondante dans le cartilage et est capable d'inhiber tous les types de collagénases. TIMP-3 jouerait un rôle essentiel dans l'inhibition des enzymes A-disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeats-4 et -5 (ADAMTS-4/ADAMTS-5), particulièrement impliquées dans la dégradation de l'aggrécane (Kevorkian, L. et al. 2004).

Finalement, la présence de l'ensemble de ces facteurs aux propriétés anti-angiogéniques permettrait de protéger le cartilage articulaire contre l'invasion vasculaire, de maintenir le phénotype chondrocytaire et d'assurer en conséquence l'intégrité du tissu cartilagineux.

1.4.4 Homéostasie du cartilage articulaire

L'homéostasie du cartilage est garantie par le renouvellement de sa matrice, grâce au maintien de l'équilibre entre la dégradation de ses composants (catabolisme) et leur synthèse (anabolisme). Ce renouvellement, assuré par les chondrocytes, est un processus lent en raison de la stabilité de la majeure partie des composants de cette matrice cartilagineuse. En effet, la demi-vie du collagène de type II est d'environ 120 ans alors que celle de l'aggrécane est d'une centaine de jours (Houard, X. et al. 2013).

La physiologie du chondrocyte est influencée par son environnement matriciel, la présence de facteurs de croissance, de cytokines ou encore par les contraintes mécaniques subies (Figure 26). En réponse aux stress mécaniques et biochimiques, les chondrocytes vont sécréter des facteurs de croissance, tels que l'IGF-1, les BMP et le TFG- β , qui jouent un rôle pro-anabolique (ex : synthèse de collagène II, d'aggrécane), mais aussi des cytokines pro-inflammatoires, comme l'interleukine 1 beta (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6) et le tumor necrosis factor α (TNF- α), qui jouent cette fois-ci un rôle pro-catabolique (ex : production d'aggrécases, de métalloprotéases matricielles (MMP) et diminution des inhibiteurs de MMP (TIMP)) (Aigner, T. et al. 2006b, Demoor, M. et al. 2012).

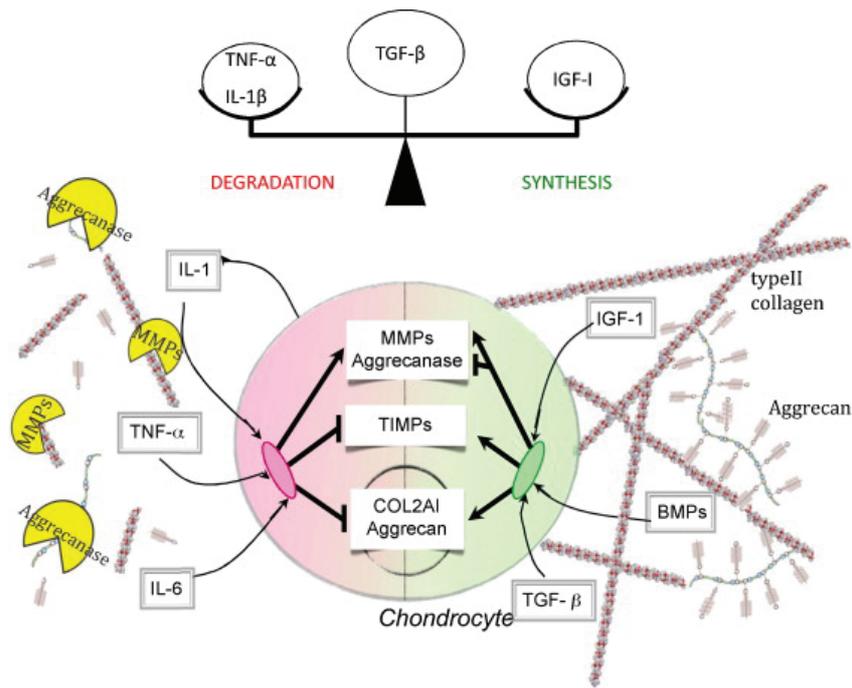


Figure 26: Homéostasie du cartilage articulaire assurée par un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme au sein de la matrice extracellulaire cartilagineuse.

En réponse aux stress mécaniques et biochimiques, les chondrocytes sécrètent des facteurs anaboliques (IGF-1, BMP, TGF- β) et cataboliques (IL-1, TNF- α , IL-6) qui régulent la synthèse et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Tiré des travaux de Demoor, M. et al. (2012).

La composition et l'architecture de la matrice assurent les propriétés biomécaniques du cartilage, comme sa résistance à la compression et ses capacités d'amortissement et d'absorption des pressions auxquelles il est soumis (Chevalier, X. & Richette, P. 2005). De plus, la contrainte mécanique assure la nutrition des chondrocytes en participant aux mouvements d'entrée et de sortie des molécules d'eau au cours des charges mécaniques cycliques (Figure 27). Ces flux favorisent en effet l'élimination des déchets métaboliques grâce à la compression du tissu, puis l'apport de nutriments à partir du liquide synovial lorsque la charge est levée. Un déséquilibre de l'anabolisme ou du catabolisme au sein du cartilage altérerait donc ses propriétés biomécaniques et nutritives, engendrant des conséquences néfastes sur l'intégrité du cartilage.

Les effets d'une contrainte mécanique sur le cartilage dépendent de l'importance et de la durée de celle-ci. Des études réalisées sur des chondrocytes en culture ou des explants de cartilages soumis à des contraintes mécaniques ont montré qu'une charge physiologique (< 10 MPa), cyclique, entraîne une augmentation de l'anabolisme des composants de la matrice. À l'inverse, une charge mécanique trop importante ou à intermittence trop rapprochée entraîne

une diminution de la synthèse des protéoglycanes (Buschmann, M. D. et al. 1996) et potentiellement des fissurations au sein du réseau de collagènes (Quinn, T. M. et al. 1998). Enfin, l'immobilisation prolongée d'une articulation est aussi délétère sur son fonctionnement par l'absence de l'effet de pompe, qui permet le transport des macromolécules et l'activation d'un phénotype pro-catabolique des chondrocytes (Leong, D. J. et al. 2010).

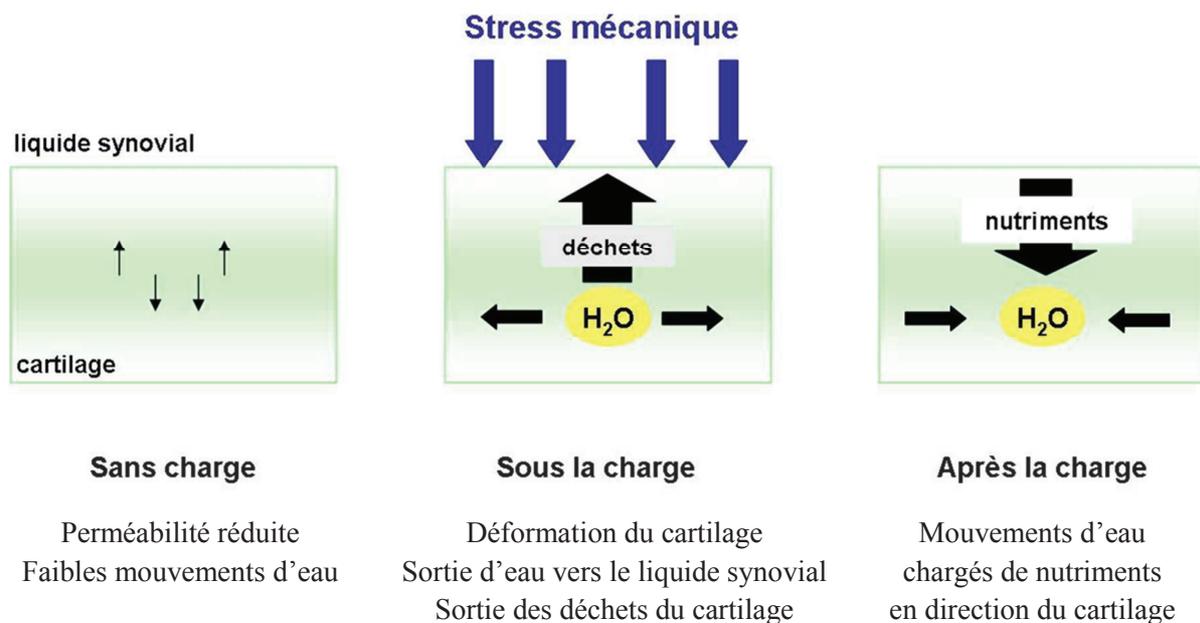


Figure 27: Implication du stress mécanique dans la nutrition du cartilage articulaire.

Sans contrainte mécanique (à gauche), les flux d'eau dans la cavité articulaire sont faibles, la perméabilité du cartilage est donc réduite. Sous l'effet d'un stress mécanique (au milieu), l'eau présente dans le cartilage est poussée hors du tissu vers la cavité articulaire, emportant avec elle les déchets métaboliques contenus dans le cartilage. A la levée de la charge (à droite), des mouvements d'eau, chargés en nutriments et en oxygène, sont à nouveau attirés dans le cartilage. Ces flux d'eau et de liquide synovial, engendrés cycliquement au cours de la marche, participent donc à la nutrition du cartilage.

1.5 Le tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif constitué d'une matrice extracellulaire minéralisée qui lui permet d'assurer quatre grandes fonctions :

- Le **soutien** : le squelette supporte le poids de l'organisme, sert de point d'ancrage aux ligaments, tendons et muscles. Il permet ainsi la réalisation des mouvements.
- La **protection** : les organes vitaux sont protégés par une structure osseuse ; le cerveau est protégé par le crâne, le cœur et les poumons par la cage thoracique et la moelle épinière par les vertèbres.
- Le **stockage** : l'os contient 99% du calcium et 80% du phosphore de l'organisme.
- L'**hématopoïèse** : les cellules sanguines sont produites par la moelle rouge de l'os trabéculaire.

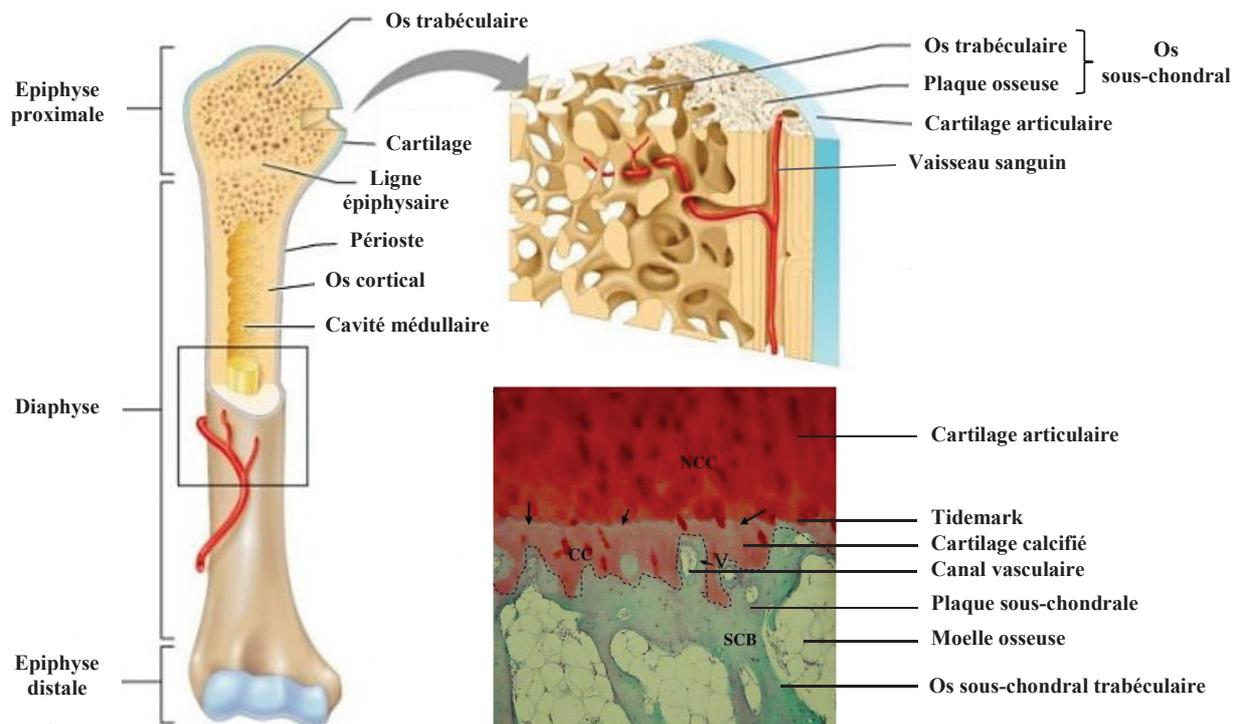
L'ensemble de ces fonctions est assuré par un remodelage physiologique de l'os qui permet une adaptation aux besoins de l'organisme et une réponse aux contraintes environnementales.

1.5.1 Structure et fonctions de l'os sous-chondral

L'os sous-chondral, situé au-dessous du cartilage calcifié, fait la transition entre les tissus cartilagineux et osseux (Figure 28). Il joue un rôle essentiel dans l'amortissement des contraintes mécaniques subies par l'articulation. Radin & Rose ont d'ailleurs montré que l'os sous-chondral participait davantage à l'absorption des chocs (30%) que le cartilage articulaire (5%) (Radin, E. L. & Rose R. M. 1986). Grâce à son réseau vasculaire, l'os sous-chondral participe à l'apport des nutriments et de l'oxygène aux couches profondes du cartilage. Il se divise en deux zones : la plaque osseuse sous-chondrale et l'os trabéculaire sous-chondral (Madry, H. et al. 2010).

La plaque sous-chondrale, située en dessous du cartilage calcifié, est constituée d'os cortical dense et vascularisé, organisé par des structures cylindriques orientées selon l'axe de l'os. Cette composition lui confère une résistance efficace face aux contraintes mécaniques.

L'os trabéculaire sous-chondral, situé en-dessous de la plaque sous-chondrale, est un os spongieux constitué d'un réseau de travées osseuses contenant la moelle hématopoïétique ainsi que du tissu adipeux. L'orientation de ses travées s'adapte en réponse aux contraintes mécaniques subies par l'articulation. Cette caractéristique apporte à l'os trabéculaire sa résistance et sa flexibilité.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Figure 28: Structure et composition d'un os long.

Un os long des membres supérieures ou inférieures comprend à ses deux extrémités une épiphyse (une proximale et une distale), formée d'os spongieux ou trabéculaire, recouverte de cartilage artéculaire hyalin. La partie centrale de l'os long constitue la diaphyse, comprenant la cavité de la moelle osseuse (cavité médullaire), qui est constituée d'os compact ou cortical. La ligne épiphysaire représente la plaque de croissance résiduelle, fermée et minéralisée à l'âge adulte, lorsque la croissance de l'individu est terminée. Adapté de Midlandtechnical. La plaque sous-chondrale, comprenant la plaque osseuse et l'os sous-chondral trabéculaire, est présente directement sous le cartilage calcifié. Elle fait la jonction entre le tissu cartilagineux et l'os sous-chondral trabéculaire. NCC : cartilage non calcifié, CC : cartilage calcifié, V : vaisseau sanguin, SCB : os sous-chondral. Adapté des travaux de Suri, S. & Walsh, D. A. (2012).

1.5.1.1 Cellules osseuses

L'os est composé de deux types cellulaires : les cellules de la lignée ostéoblastique impliquées dans la formation de la matrice osseuse (cellules ostéoformatrices) et les cellules de la lignée ostéoclastique impliquées au contraire dans la résorption de la matrice (cellules ostéorésorbantes). Ces activités opposées permettent un renouvellement continu du tissu osseux.

1.5.1.1.1 Cellules ostéoformatrices

La lignée ostéoblastique, issue des cellules souches mésenchymateuses, est constituée de plusieurs types cellulaires qui présentent des niveaux de maturation distincts (Figure 29) :

Les **pré-ostéoblastes** sont des cellules allongées, qui représentent l'état de transition entre l'ostéoprogéniteur possédant d'importantes capacités prolifératives et l'ostéoblaste mature. Il s'agit en effet de l'unique type cellulaire de la lignée ostéoblastique capable de se diviser (Blair, H. C. et al. 2007). Les pré-ostéoblastes expriment encore peu les marqueurs des cellules osseuses tels que le collagène de type I, la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine ou l'ostéopontine (Long, M. W. 2001).

Les **ostéoblastes** sont des cellules de forme cubique formant une couche de cellules jointives qui communiquent entre-elles via des jonctions communicantes. Leur cytoplasme est riche en organites cellulaires, capables d'assurer la synthèse et la maturation des protéines intra- et extracellulaires. Leur membrane plasmique contient abondamment la phosphatase alcaline. Ils synthétisent de grandes quantités de collagène de type I et de protéines matricielles (ostéocalcine, ostéopontine, protéoglycanes et facteurs de croissance) participant à la formation de la matrice osseuse, appelée matrice ostéoïde. Environ deux semaines après la formation de la MEC, les ostéoblastes initient sa minéralisation par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$. Ils sécrètent des protéines solubles, des facteurs de croissance et des cytokines qui régulent la résorption osseuse. Ils sont effectivement capables de l'inhiber par la sécrétion d'ostéoprotégérine (OPG) par exemple, ou à l'inverse de l'activer, par la sécrétion du receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), colony stimulating factor 1 (CSF-1), également dénommé macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), ou encore par la sécrétion de TNF- α , d'IL-1 β ou d'IL-6 (Bezerra, M. C. et al. 2005). Les ostéoblastes expriment le récepteur à la parathormone (PTH). En réponse à cette hormone, les ostéoblastes induisent l'activation ostéoclastique en augmentant l'expression de RANKL (Blair, H. C. et al. 2007). Une fois la synthèse de la matrice ostéoïde achevée, les ostéoblastes matures ont 3 devenir possibles : la mort par apoptose, la différenciation en ostéocytes en s'entourant complètement de MEC ou la différenciation en cellules bordantes quiescentes, tapissant les surfaces osseuses.

Les **ostéocytes** sont des ostéoblastes différenciés totalement intégrés dans la matrice osseuse minéralisée, dans des logettes appelées ostéoplastes. Ce sont des cellules aplaties en forme d'étoile, possédant moins d'organites que les ostéoblastes. Elles présentent des

capacités de synthèse limitées mais participent au maintien de la matrice osseuse et à l'homéostasie de la calcémie. Elles communiquent entre-elles ainsi qu'avec les ostéoblastes et les cellules bordantes par l'intermédiaire de leurs prolongements cytoplasmiques, via des jonctions communicantes. Il est décrit que seulement 10 à 30% des ostéoblastes se différencient en ostéocytes suivant les tissus osseux étudiés (Franz-Odenaal, T. A. et al. 2006). Ces cellules sont caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques, tels que la dental mineral protein 1 (DMP-1), la matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) et la sclérostine (SOST) (Van Bezooijen, R. L. et al. 2004, Franz-Odenaal, T. A. et al. 2006). Les ostéocytes sont mécano-sensibles et jouent ainsi un rôle essentiel dans le remodelage osseux en adaptant la formation ou la résorption de la MEC en réponse à un stress mécanique (Heino, T. J. et al. 2009).

Les **cellules bordantes** représentent des ostéoblastes dans un état quiescent, susceptibles, s'ils sont sollicités, de redevenir des ostéoblastes actifs (Dobnig, H. & Turner, R. T. 1995). Ces cellules tapissent jusqu'à 85% des surfaces osseuses chez l'adulte qui, à un moment donné, ne sont soumises ni à formation ni à résorption osseuse. Ce sont des cellules aplaties et allongées, pauvres en organites et reliées entre elles et avec les ostéocytes voisins par des jonctions communicantes.

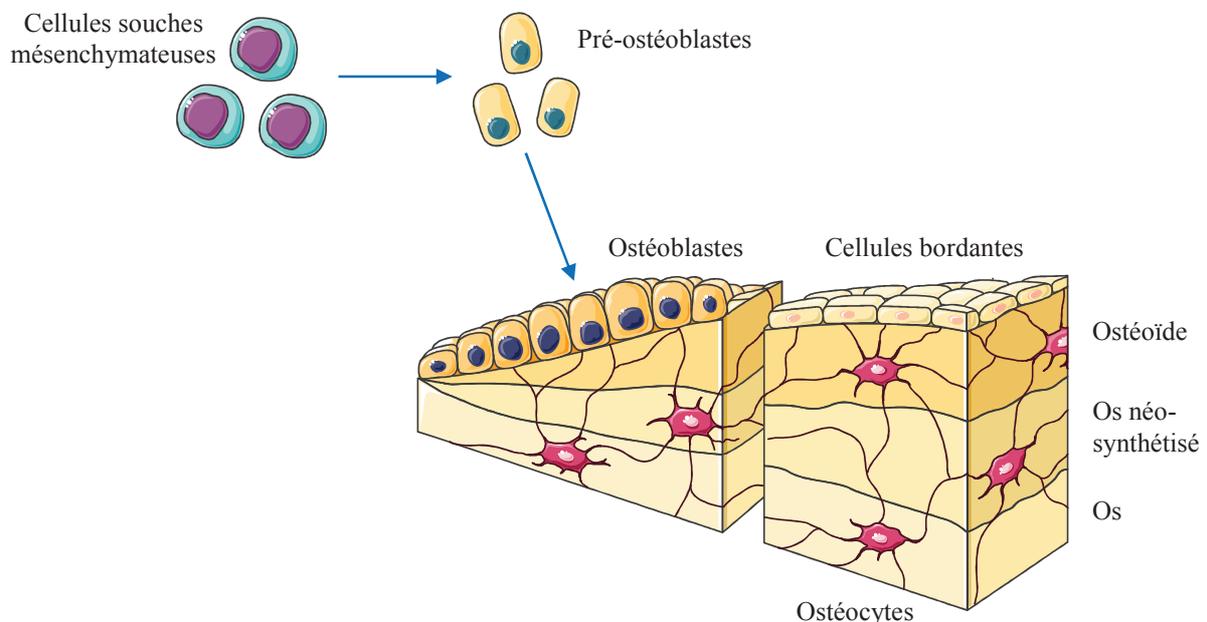


Figure 29: Types cellulaires impliqués au cours de la formation osseuse.

Les cellules ostéoformatrices comprennent les pré-ostéoblastes, issus de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes.

Source : Servier Medical Art.

1.5.1.1.2 Cellules ostéorésorbantes

Les ostéoclastes sont des cellules très volumineuses, de 20 à 100 μm de diamètre, plurinucléées, très mobiles, capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Leur différenciation à partir des cellules souches hématopoïétiques monocytaires est dépendante du M-CSF/CSF-1 et de RANKL, sécrétés par les ostéoblastes (Figure 30). Suite à leur recrutement, les pré-ostéoclastes fusionnent entre eux pour former des cellules multinucléées activées en réponse au RANKL (Takahashi, N. et al. 2014). A l'inverse, l'OPG inhibe la différenciation ostéoclastique en limitant l'interaction entre RANKL et son récepteur RANK, présent à la surface des ostéoclastes.

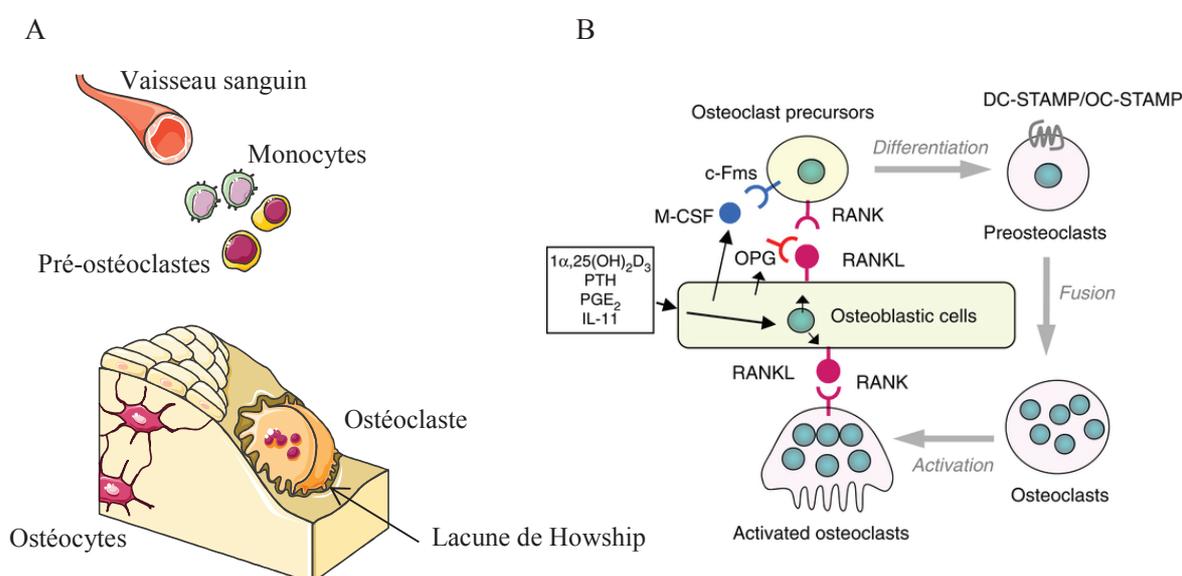


Figure 30: Types cellulaires impliqués au cours de la résorption osseuse.

(A) Les ostéoclastes issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques monocytaires assurent la résorption de la matrice osseuse en formant une structure appelée la « lacune de Howship ». Source : Servier Medical Art. (B) Les ostéoblastes régulent la différenciation et la fonction des ostéoclastes par l'intermédiaire de l'expression de RANKL et de M-CSF/CSF-1, capables d'interagir avec leurs récepteurs respectifs à la surface des ostéoclastes (RANK et c-Fms/CSF-1R). L'expression de RANKL par les ostéoblastes est induite en réponse à différents stimuli : la vitamine D₃, l'hormone PTH et des cytokines et facteurs pro-inflammatoires (prostaglandine E₂ (PGE₂), IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α et IL-11) (Bezerra, M. C. et al. 2005). Les ostéoclastes expriment les récepteurs dendritic cell specific transmembrane protein (DC-STAMP) et osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), impliqués dans leur fusion pour former des ostéoclastes multinucléés, activés en réponse au RANKL. Les ostéoblastes sont à l'inverse capables de sécréter l'ostéoprotégérine (OPG) afin d'inhiber la différenciation des ostéoclastes. D'après les travaux de Takahashi, N. et al. (2014).

Lorsqu'il est activé, l'ostéoclaste développe son appareil lysosomal et se polarise ; sa membrane plasmique se différencie en deux domaines séparés par un anneau étanche de jonctions cellule-MEC : un domaine apical qui développe une bordure en brosse au contact de la surface osseuse et un domaine basolatéral situé à l'opposé (Figure 31). Il exprime des intégrines $\alpha_v\beta_3$, impliquées dans son interaction avec la matrice osseuse. Il délimite ainsi un compartiment spécialisé dans lequel sont déversés des protons (H^+), des enzymes protéolytiques, comme la tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), la cathépsine K et des métalloprotéases matricielles (notamment MMP-9), responsables de la dissolution de la phase minérale osseuse et de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. La zone érodée obtenue après la résorption est appelée « lacune de Howship ». Les ostéoclastes expriment des récepteurs à la calcitonine, qui lorsqu'ils sont activés, bloquent l'activité ostéorésorbante des ostéoclastes en induisant leur apoptose (Takahashi, N. et al. 2014).

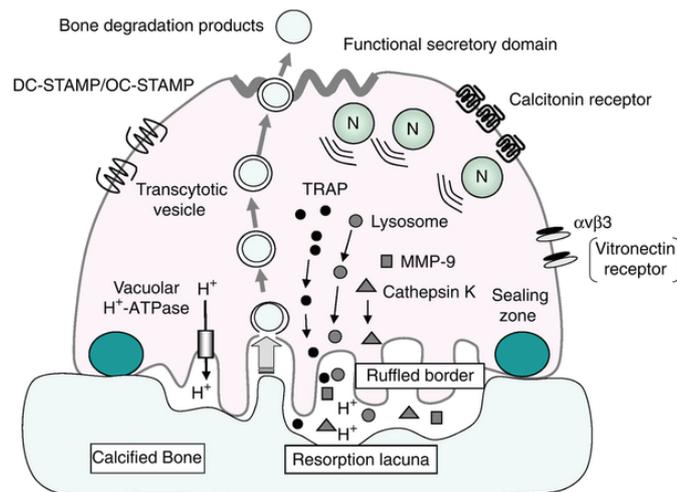


Figure 31: Structure et fonction des ostéoclastes au cours de la résorption osseuse.

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées, possédant un nombre important de mitochondries, de vacuoles et de lysosomes. Au cours du mécanisme de résorption osseuse, les ostéoclastes forment un compartiment étanche dans lequel ils déversent des protons (H^+), rendant la zone de résorption extrêmement acide, des enzymes protéolytiques, comme la tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), la cathépsine K et des métalloprotéases matricielles (MMP-9), responsables de la dissolution de la phase minérale osseuse et de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Les produits de dégradation de la matrice sont endocytés par les ostéoclastes, transportés dans des vésicules et sécrétés du côté basolatéral. D'après les travaux de Takahashi, N. et al. (2014).

1.5.1.2 Composition de la matrice extracellulaire osseuse

La matrice extracellulaire de l'os se compose d'une phase organique et d'une phase minérale.

La **phase organique** représente environ 30% de la MEC osseuse. Elle est composée majoritairement de microfibrilles de collagènes de type I (90%), V, VIII et XII qui apportent à l'os ses propriétés de résistance à l'étirement. La matrice est également composée de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate et héparane sulfate) et de protéines non collagéniques, telles que la fibronectine, le biglycane, la décorine, l'ostéopontine (relie l'hydroxyapatite aux cellules osseuses), l'ostéonectine (intervient dans la minéralisation par son affinité pour le collagène de type I et le calcium), l'ostéocalcine (marqueur des ostéoblastes matures, intervenant dans la minéralisation), des sialoprotéines osseuses et des thrombospondines (Shekaran, A. & García, A. J. 2011). L'ensemble de ces protéines est impliqué dans l'organisation de la matrice et le processus de minéralisation.

La **phase minérale** constitue près de 70% de la matrice osseuse. Elle est constituée majoritairement de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium cristallisé) et de carbonate de calcium. Ces cristaux sont visibles en microscopie électronique entre les fibres de collagènes, repérables à leur forme hexagonale dense aux électrons (Bonucci, E. 2012). L'os, qui contient 99% du calcium et 85% du phosphore de l'organisme joue un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique. Il contient également entre 40 et 60% du sodium et du magnésium de l'organisme, constituant ainsi un réservoir essentiel d'éléments minéraux. La minéralisation de la MEC osseuse est responsable de la dureté de l'os.

1.6 La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu d'origine mésenchymateuse qui tapisse la face interne de la capsule articulaire. Elle comporte deux couches : une couche superficielle, l'intima, qui s'organise en replis ou villosités en contact avec la cavité articulaire, et une couche plus profonde, la subintima, qui est directement en contact avec la capsule articulaire (Figure 32).

L'**intima** est composée d'une à quatre couches de synoviocytes macrophagiques (type A) et de synoviocytes fibroblastiques (type B) d'une épaisseur de 20 à 40 μm (Dijkgraaf, L. C. et al. 1996a). Les synoviocytes macrophagiques ont une forme arrondie et possèdent une

machinerie cellulaire développée, contenant un appareil de Golgi efficace, d'abondants lysosomes et vacuoles, qui permettent à la membrane synoviale de phagocyter les déchets cellulaires, métaboliques et matriciels libérés dans la cavité articulaire (Dijkgraaf, L. C. et al. 1996b).

Les synoviocytes fibroblastiques sont moins abondants et présentent de longs prolongements cytoplasmiques, contenant de nombreuses mitochondries, un réticulum endoplasmique rugueux développé, permettant la synthèse de macromolécules telles que l'acide hyaluronique, la lubricine, des fibres de collagènes et des protéoglycanes. Ils sont contenus dans une matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique. La membrane synoviale joue également un rôle majeur dans la défense de l'articulation, principalement contre les infections, grâce à ses capacités de recrutement rapide de cellules immunitaires. Enfin, ces synoviocytes fibroblastiques produisent l'acide hyaluronique qui est le composant principal du liquide synovial. En effet, la membrane synoviale est chargée de sécréter le liquide synovial dans la cavité articulaire, garantissant d'une part la lubrification des surfaces articulaires et d'autre part la nutrition du cartilage, dépourvu de vascularisation. En se combinant à l'eau, l'acide hyaluronique forme un gel qui participe aux propriétés viscoélastiques du liquide synovial, assurant ainsi une absorption des chocs, une résistance aux contraintes mécaniques et aux forces de cisaillement induites au cours d'un mouvement.

Dans un contexte physiologique, le liquide synovial est produit en faible quantité (environ 2 mL dans le genou), constitué d'acide hyaluronique, de lubricine, d'un dialysat plasmatique et de rares cellules inflammatoires (monocytes/macrophages). L'évaluation du nombre de cellules inflammatoires présentes dans le liquide synovial permet d'estimer le niveau d'inflammation dans l'articulation.

La **subintima** est constituée de nombreux types cellulaires, tels que des fibroblastes, des cellules endothéliales, des histiocytes ou encore des mastocytes (Dijkgraaf, L. C. et al. 1996a). Elle est composée d'un important réseau de collagènes, principalement de type I et III. La subintima est innervée et extrêmement vascularisée dans sa partie la plus superficielle par des capillaires, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques. Elle renferme des cellules souches mésenchymateuses qui sont capables de se différencier en chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes ou cellules musculaires (Fan, J. et al. 2009). Cette caractéristique lui permet de participer à la régénération et la réparation des tissus articulaires endommagés (Fox, D. B. & Warnock, J. J. 2011).

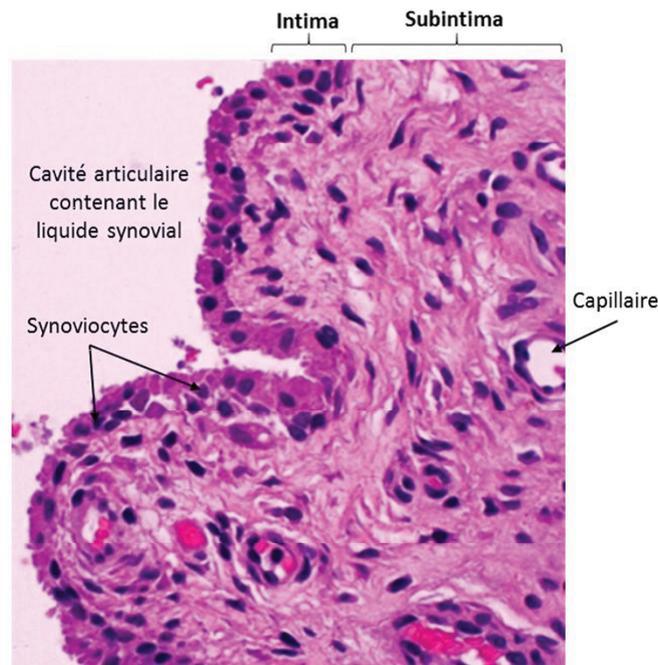


Figure 32: Coupe histologique de membrane synoviale.

L'intima est apparente par son organisation en fine couche à la bordure de la membrane synoviale, au contact de la cavité articulaire. Elle contient la majeure partie des synoviocytes. La subintima constitue la couche principale de la membrane synoviale. Située plus en profondeur, elle est richement vascularisée.

1.7 Les autres tissus de l'articulation synoviale

1.7.1 Les tendons et ligaments

Les **tendons** sont des tissus conjonctifs fibreux et élastiques enrichis en fibres de collagènes, principalement de type I, regroupées en faisceaux épais et parallèles, qui relient les muscles aux os, permettant ainsi le mouvement. Ils sont organisés en trois zones : l'enthèse, qui constitue le point d'ancrage osseux, le corps tendineux et la jonction myo-tendineuse. Ils présentent des propriétés viscoélastiques, qui leur permettent de résister à une traction et d'emmagasiner une certaine énergie pour la restituer lors du mouvement. En cas d'étirement excessif, des lésions voire une rupture du tendon se produisent et sont à l'origine d'une invalidité fonctionnelle de l'articulation.

Les **ligaments** sont des tissus conjonctifs fibreux et élastiques enrichis en fibres de collagènes, qui relient les épiphyses de deux os au sein d'une articulation. Ils assurent une stabilité à l'articulation en résistant aux mouvements forcés, non désirés par l'individu, qui pourraient conduire à une luxation de l'articulation. De façon générale, plus une articulation est entourée par un nombre important de ligaments, plus elle est solide et renforcée. Leur rôle

est donc de maintenir les surfaces articulaires en contact et de limiter les mouvements pour qu'ils ne dépassent pas leur amplitude autorisée. En protégeant ainsi l'articulation, les ligaments sont susceptibles d'être soumis à des tensions importantes, entraînant alors leur étirement. En cas d'étirement excessif, une déchirure du ligament est à l'origine d'une entorse et par conséquent d'une instabilité de l'articulation. Il existe de nombreux ligaments dans l'articulation du genou mais les quatre principaux sont : les ligaments latéraux externe et interne et les ligaments centraux croisés antérieur et postérieur. Leur déchirure ou leur rupture, se produisant généralement au cours d'un traumatisme, sont à l'origine d'intenses douleurs et sont susceptibles d'altérer l'intégrité de l'articulation.

1.7.2 Ménisques

Les ménisques sont des structures fibrocartilagineuses présentes aux épiphyses de deux pièces osseuses, dans les zones de frictions. Le genou possède deux ménisques entre le fémur et le tibia, l'un dans le compartiment externe et l'autre dans le compartiment interne de l'articulation. Lors des mouvements, les ménisques se déforment et s'adaptent à la surface articulaire afin de stabiliser l'articulation et de répartir les contraintes mécaniques reçues par le fémur et le tibia. Des atteintes méniscales provoquent une déstabilisation de l'articulation, une augmentation des contraintes mécaniques subies et de ce fait peuvent altérer l'intégrité du cartilage articulaire.

1.7.3 Les tissus adipeux intra-articulaires

Le **tissu adipeux de Hoffa** est le tissu adipeux intra-articulaire le plus connu et le plus volumineux, parmi les tissus **adipeux supra-patellaires pré-fémoral** et **quadricipital** et le **tissu adipeux postérieur**. Il est situé sous la rotule, en avant des condyles fémoraux et des plateaux tibiaux. Il est décrit comme étant intra-capsulaire mais extra-synovial, la membrane synoviale recouvrant sa face postérieure. Le rôle physiologique du tissu adipeux de Hoffa reste encore peu expliqué. Il est décrit qu'il comble l'espace articulaire antérieur au cours de la flexion du genou (Maurel, B. et al. 2010), ce qui pourrait lui conférer un rôle d'amortisseur de la contrainte mécanique dans l'articulation.

2. L'arthrose et sa physiopathologie

2.1 Epidémiologie de l'arthrose

L'arthrose est la pathologie musculo-squelettique la plus fréquente, atteignant actuellement près de 17% de la population française, soit environ 10 millions de personnes dont 4 à 5 millions symptomatiques. A l'horizon 2030, l'arthrose est amenée à toucher 22% de la population en France. Parmi 315 pathologies recensées dans une étude globale (« Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2015 ») regroupant 195 pays et territoires entre 1990 et 2015, l'arthrose fait partie des pathologies non transmissibles qui a connu la plus grande augmentation du nombre de cas (+35%) entre 2005 et 2015 (GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators, Feigin, V. et al. 2016).

Cette pathologie atteint fréquemment les articulations portantes, telles que la hanche (coxarthrose), le genou (gonarthrose), le rachis cervical et lombaire (arthrose vertébrale), mais également les articulations inter-phalangiennes (arthrose digitale). A l'échelle mondiale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 9,6% des hommes et 18% des femmes âgés de plus de 60 ans souffrent d'une arthrose symptomatique. Elle entraîne des difficultés dans la réalisation des mouvements chez ces sujets dans 80% des cas et est responsable d'une incapacité à exécuter les tâches de la vie quotidienne dans 25% des cas. L'arthrose serait également responsable d'un risque de surmortalité, liée principalement au développement de pathologies cardiovasculaires et de démences chez ces patients. Les auteurs de ces études ont suggéré que cette surmortalité résulterait d'une inflammation systémique de bas grade ou d'un manque d'activité physique chez les patients souffrant d'une arthrose symptomatique et radiographique du genou ou de la hanche (Nüesch, E. et al. 2011, Hawker, G. A. et al. 2014, Veronese, N. et al. 2016).

En 2003, l'arthrose représentait 13 millions de consultations (270 millions d'euros), 18 millions de prescriptions médicamenteuses (574 millions d'euros), des hospitalisations (820 millions d'euros) et 5 millions de journées d'arrêt de travail (180 millions d'euros) (Le Pen, C. et al. 2005). Elle constitue la deuxième cause de consultation chez le généraliste, derrière les maladies cardiovasculaires. Le coût de l'arthrose généré pour la sécurité sociale est passé de 1,6 milliards d'euros en 2003 à plus de 3,6 milliards d'euros en 2010.

2.2 Définitions de l'arthrose

Une définition de l'arthrose a été proposée en 1994 par l'OMS et l'American Academy of Orthopaedic Surgeons : « *L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthroïdale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral associée à la formation d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire, avec des degrés variables d'inflammation locale* ».

L'arthrose n'est ainsi plus considérée comme une pathologie dégénérative due à une simple usure mécanique du cartilage mais comme une pathologie atteignant l'ensemble des tissus de l'articulation, soit le cartilage, l'os sous-chondral, la membrane synoviale, les ligaments, les muscles et les tendons (Rannou, F. et al. 2010) (Figure 33). Par l'existence de communications inter-tissulaires au sein de l'articulation, les atteintes d'un tissu peuvent altérer l'intégrité des autres tissus.

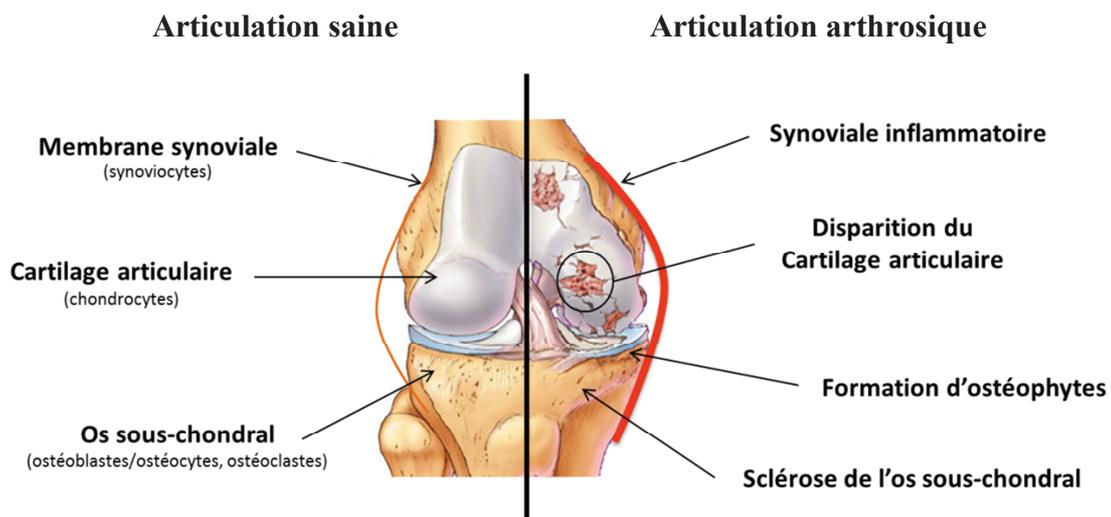


Figure 33: Comparaison de la structure anatomique d'une articulation saine et d'une articulation arthrosique.

Le cartilage arthrosique est caractérisé par une disparition du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral, une formation d'excroissances osseuses, appelées ostéophytes et une inflammation modérée de la membrane synoviale, tapissant la capsule articulaire.

Il s'agit d'une pathologie difficile à décrire par sa multiplicité, pouvant être définie à différents niveaux : moléculaire, tissulaire, radiographique et clinique. Son diagnostic repose sur des examens cliniques et radiologiques de l'articulation. L'arthrose radiographique est principalement évaluée par le score Kellgren et Lawrence (score KL) (Kellgren, J. H. & Lawrence, J. S. 1957) (Tableau 1), compris entre 0 et 4, qui détermine la sévérité de l'atteinte arthrosique selon l'évolution du pincement artriculaire, qui reflète l'amincissement du cartilage, la présence d'ostéophytes, qui sont des excroissances osseuses, la condensation de l'os sous-chondral et l'apparition de kystes, qui font suite à un remodelage osseux pathologique (Figure 34).

Score KL	Stades radiologiques de la gonarthrose
Stade 0	Radiographie normale
Stade 1	Ostéophyte de signification douteuse
Stade 2	Ostéophyte net sans modification de l'interligne artriculaire
Stade 3	Ostéophyte net et diminution de l'interligne artriculaire
Stade 4	Pincement sévère de l'interligne artriculaire et sclérose de l'os sous-chondral

Tableau 1: Classification radiologique de la gonarthrose par le score de Kellgren et Lawrence.

D'après la Société Française de Rhumatologie.

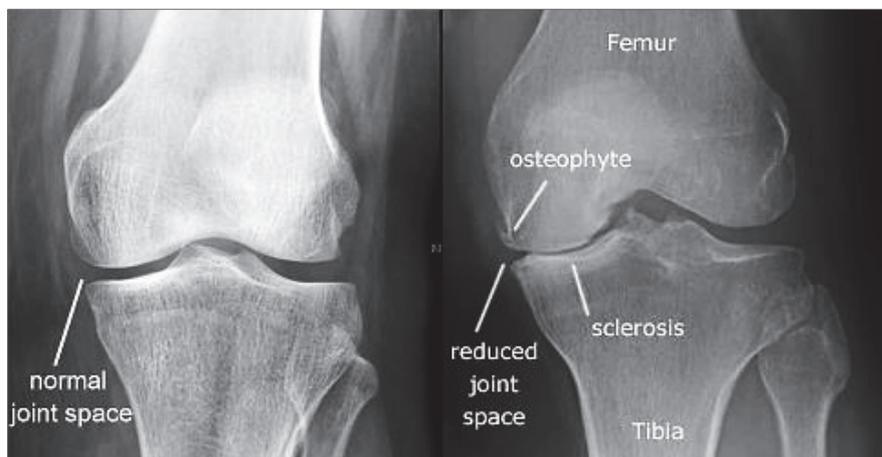


Figure 34: Examen radiologique mettant en évidence une arthrose du genou.

L'arthrose radiographique se caractérise par les observations d'un pincement artriculaire (diminution de l'espace entre les deux surfaces articulaires), d'ostéophytes et d'une sclérose de l'os sous-chondral. Source : <http://www.docjoints.com/knee-arthritis/>

Il existe une importante dissociation entre les observations radiologiques et les symptômes cliniques. En effet, seulement 40% des patients présentant une gonarthrose

radiographique modérée et 60% présentant une gonarthrose sévère sont symptomatiques (Anderson, J. J. & Felson, D. T. et al. 1988). Cette dissociation serait à l'origine d'une prise en charge tardive des patients au moment de l'apparition de leurs symptômes.

2.3 Thérapeutiques

Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de stopper ou de ralentir l'évolution de la pathologie vers une destruction totale du cartilage articulaire (Rannou, F. et al. 2010, Roman-Blas, J. A. et al. 2016, Bay-Jensen, A. C. et al. 2016). La prise en charge des symptômes de l'arthrose se fait par la combinaison d'approches pharmacologiques, comme le recours aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les injections intra-articulaires de corticostéroïdes ou d'acide hyaluronique (Wehling, P. et al. 2017) et des approches non pharmacologiques, telles que des mesures hygiéno-diététiques (alimentation équilibrée, perte de poids, activité physique régulière, exercices de renforcement musculaire), une kinésithérapie ou encore le port d'orthèses (Sanchez, K. et al. 2010). Lorsque ces approches deviennent inefficaces dans la prise en charge de la douleur et/ou de la gêne fonctionnelle, la pose de prothèse est alors recommandée. Toutefois, cette chirurgie n'est pas une fin en soi puisque qu'elle ne remplace que temporairement l'articulation arthrosique et ne concerne que la hanche et le genou. Une prothèse doit effectivement être remplacée au bout d'une quinzaine d'années. De plus, 20% des patients ayant subi une pose de prothèse totale de genou conservent des douleurs chroniques (Beswick, A. D. et al. 2012). Il paraît donc nécessaire de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie pour pouvoir prétendre développer des thérapeutiques spécifiques, capables de retarder la progression de la pathologie voire d'inverser son évolution et non plus seulement de proposer aux patients des traitements symptomatiques.

2.4 Phénotypes d'arthrose : Identification des facteurs de risque

Il est aujourd'hui clairement établi qu'il n'existe pas qu'un seul type d'arthrose mais plusieurs, déterminés d'une part, par les antécédents du patient et d'autre part, par les causes de l'atteinte articulaire. Il apparaît nécessaire de définir et de comprendre les mécanismes physiopathologiques intervenant au cours de ces différents phénotypes d'arthrose afin de développer des thérapeutiques adaptées au mieux à la pathologie. En effet, les traitements couramment utilisés pour prendre en charge toutes les manifestations d'arthrose n'ont pas démontré d'effet efficace dans l'interruption de la progression des atteintes articulaires.

Les facteurs prédisposant au développement d'une arthrose sont nombreux. Leur identification permet de définir différents phénotypes d'arthrose, particulièrement étudiés dans le contexte d'une gonarthrose.

2.4.1 Vieillessement

Le vieillissement représente le principal facteur de risque d'arthrose (Felson, D. T. & Zhang, Y. 1998, Suri, P. et al. 2012), en raison des modifications cellulaires et biochimiques induites dans le cartilage articulaire. Avec l'âge, la réponse des chondrocytes aux facteurs de croissance est réduite tandis qu'elle est augmentée à un stress inflammatoire (IL-1 β), la qualité des protéoglycanes de la matrice extracellulaire est altérée et la teneur en eau du cartilage est diminuée (Felson, D. T. & Zhang, Y. 1998). Une accumulation de produits de glycation avancés (advanced glycation end products), dénommés « AGE » (Verzijl, N. et al. 2002), perturbent les propriétés biomécaniques du cartilage et de l'os et activent un phénotype chondrocytaire pro-catabolique et pro-inflammatoire (Loeser, R. F. et al. 2005, Rasheed, Z. et al. 2011). Une augmentation de la laxité ligamentaire péri-articulaire, une faiblesse musculaire ainsi qu'une diminution de la proprioception sont également décrites au cours du vieillissement, participant à la déstabilisation de l'articulation (Felson, D. T. & Zhang, Y. 1998, Litwic, A. et al. 2013).

2.4.2 Traumatismes

Les antécédents traumatiques ont montré leur implication dans l'augmentation du risque d'apparition d'une arthrose. En effet, certaines activités sportives intenses et/ou répétitives ont été identifiées comme de potentiels facteurs prédisposant à la survenue d'une arthrose (Neogi, T. & Zhang, Y. 2013). L'articulation du genou est l'une des plus susceptibles aux blessures. La rupture du ligament croisé antérieur conduit à une arthrose précoce dans environ 13% des cas dans les 10 à 15 ans suivant la lésion. Lorsqu'une telle rupture est combinée à des atteintes du cartilage, de l'os sous-chondral, des ligaments collatéraux et/ou des ménisques, observées dans près de 65 à 75% des cas, la prévalence de la gonarthrose est augmentée de 21 à 48% (Øiestad, B. E. et al. 2009). L'inégalité de longueur des membres inférieurs, lorsqu'elle dépasse 2 cm, est à l'origine d'un risque accru de développer une gonarthrose (Golightly, Y. M. et al. 2007). De façon similaire, les défauts d'alignement, tels que la dysplasie de la hanche, le valgus ou le varus, constituent un facteur d'aggravation non négligeable de l'arthrose précoce (Cerejo, R. et al. 2002). Le valgus et le varus aggravent aussi l'effet de l'obésité sur les contraintes mécaniques subies par l'articulation.

2.4.3 Sexe - Facteurs hormonaux

Après 50 ans, la prévalence de l'arthrose est plus importante chez les femmes que chez les hommes, jusqu'à l'âge de 80 ans où l'incidence décline chez les deux sexes (Oliveria, S. A. et al. 1995). La carence oestrogénique chez la femme ménopausée pourrait constituer un facteur prédisposant au développement de l'arthrose. Toutefois, les essais cliniques n'ont pas démontré à ce jour d'effet significatif d'un traitement hormonal sur la progression radiologique ou les symptômes cliniques (Nevitt, M. C. et al. 2001, Cirillo, D. J. et al. 2006). Enfin, la prédisposition des femmes à l'arthrose pourrait aussi être expliquée par la différence structurale des os, de l'alignement des articulations, de la laxité des ligaments et par la diminution du volume du cartilage articulaire par rapport aux hommes (Johnson, V. L. & Hunter, D. J. 2014).

2.4.4 Génétique – Ethnie

Les facteurs génétiques sont également impliqués dans l'apparition et la progression de l'arthrose. Valdes & Spector ont suggéré que l'hérédité jouerait un rôle dans 39% des gonarthroses radiographiques (Valdes, A. M. & Spector, T. D. 2008). Toutefois, aucun gène de susceptibilité n'a été clairement identifié pour son implication dans la survenue de l'arthrose. Étudiés isolément, ces gènes de susceptibilité ne présentent qu'un faible impact. Seul le facteur growth differentiation factor (GDF-5) semblerait significativement associé au développement d'une arthrose dans les populations asiatiques et blanches européennes (Chapman, K. et al. 2008, Evangelou, E. et al. 2009). Des études ont également mis en évidence le rôle des mutations des gènes codant le collagène de type II (COL2A1) (Palotie, A. et al. 1989), le collagène de type IX (COL9A1, COL9A2 et COL9A3) et l'ostéoprotégérine (TNFRSF11B) dans l'apparition d'arthrose (Aury-Landas, J. et al. 2016).

Des études de cohorte ont démontré une prévalence d'arthrose variable selon l'origine ethnique des patients. Une étude a mis en avant un risque augmenté chez les individus afro-américains de présenter une arthrose radiographique du genou par comparaison aux individus caucasiens (Nelson, A. E. et al. 2011). Une autre étude a montré une différence de la morphologie du genou entre les cohortes caucasiennes et chinoises qui expliquerait la prévalence plus importante d'arthrose fémoro-tibiale latérale dans la population chinoise, présentant un valgus tibial distal (Harvey, W. F. et al. 2008).

2.4.5 Eléments nutritionnels

L'implication des éléments nutritionnels dans l'arthrose reste actuellement débattue. Différentes études démontrent des résultats contradictoires au sujet du rôle potentiel de la vitamine D (Felson, D. T. et al. 2007, Heidari, B. et al. 2011, McAlidon, T. et al. 2013), de la vitamine C (Peregoy, J. & Wilder, F. V. 2011) et vitamine E (Wluka, A. E. et al. 2002) dans la survenue d'arthrose. Toutefois, des résultats moins controversés suggèrent un rôle de la carence en vitamine K dans l'accroissement de la prévalence de la gonarthrose (Oka, H. et al. 2009, Misra, D. et al. 2013).

2.4.6 Surcharge pondérale et obésité

À l'échelle mondiale, la prévalence de l'obésité a plus que doublé depuis 1980, faisant de la surcharge pondérale un problème majeur de santé publique (OMS). En 2015, près d'un Français sur deux était en surpoids (indice de masse corporelle (IMC) compris entre 25 et 30 kg/m²) et 15% étaient concernés par l'obésité (IMC supérieur à 30 kg/m²) selon l'enquête ObEpi. D'ici 2030, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) estime que l'obésité pourrait toucher jusqu'à 21% des Français. Le lien entre la surcharge pondérale des individus et la survenue d'une arthrose a été établi dans différentes études de cohorte, telles que la cohorte de Rotterdam dans laquelle les sujets, avec un IMC supérieur à 27,5 kg/m², présentaient un risque multiplié par 3,3 de développer une gonarthrose (Reijman, M. et al. 2006). Une autre étude comportant 27960 participants répartis en 4 groupes selon leur IMC, a montré que les sujets du groupe présentant l'IMC le plus élevé, d'en moyenne 30,1 kg/m², étaient 8 fois plus susceptibles de développer une gonarthrose sévère comparativement au groupe présentant l'IMC le plus faible (Lohmander, L. S. et al. 2009). Ce risque est d'ailleurs augmenté de 15% par point d'IMC supplémentaire (Sellam, J. & Berenbaum, F. 2011). Notons que la surcharge pondérale constitue un facteur de risque sur lequel le patient peut directement intervenir afin de prévenir les risques d'évolution d'une arthrose.

2.4.7 Syndrome métabolique

L'obésité est associée à la fois au risque d'apparition d'arthrose du genou et de survenue d'arthrose digitale (Grotle, M. et al. 2008). Le risque de développer une arthrose digitale est en effet multiplié par deux en cas de surpoids (Yusuf, E. et al. 2010). Il s'agit d'une pathologie touchant une articulation non portante, dont la cause n'est pas expliquée par un stress mécanique excessif mais par les troubles métaboliques associés à l'obésité : diabète de

type II (production excessive d'AGE), insulino-résistance, dyslipidémie et hypertension artérielle. Un rôle des adipokines sécrétées par les tissus adipeux est également décrit au cours de l'arthrose dite métabolique (Sellam, J. & Berenbaum, F. 2013, Courties, A. et al. 2017). L'inflammation de bas grade et le stress oxydant sont des caractéristiques partagées par l'arthrose et les désordres métaboliques, pouvant contribuer à la mise en place et/ou à l'évolution de ces deux pathologies.

2.5 Physiopathologie de l'arthrose

L'arthrose est une maladie multi-tissulaire dont le remodelage pathologique de l'ensemble des tissus constituant l'articulation va être à l'origine de douleurs, de raideurs, de déformations et de perte de fonction de l'articulation (Figure 35) (Loeser, R. F. et al. 2010 et 2012). En raison des interactions fonctionnelles très développées entre le cartilage, l'os sous-chondral et la membrane synoviale, les atteintes d'un de ces tissus ont un impact sur la fonction et l'intégrité des autres (Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J. P. 2010). Les stades précoces de l'arthrose sont difficiles à appréhender car la plupart des patients ne développe pas de symptômes tant que les atteintes tissulaires restent limitées.

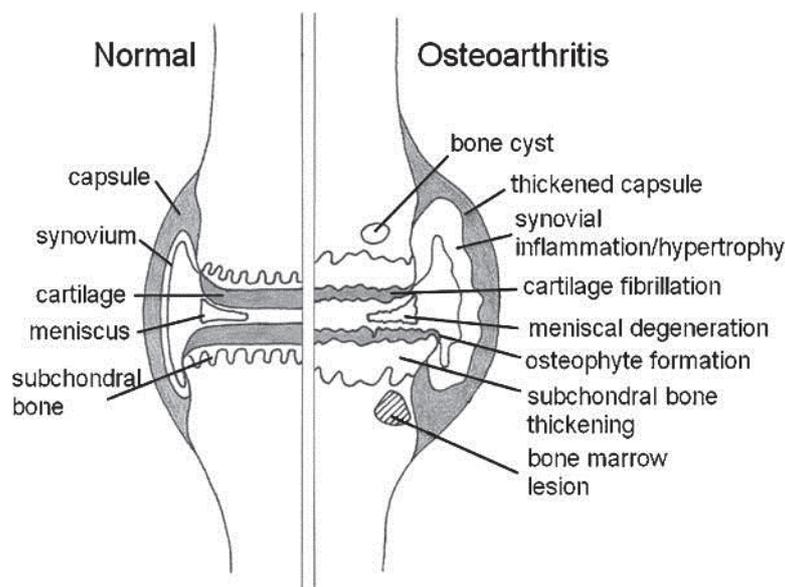


Figure 35: Atteintes des tissus de l'articulation arthrosique.

L'arthrose est caractérisée par la dégradation et la perte du cartilage articulaire, l'épaississement de la plaque de l'os sous-chondral, accompagné de la formation d'œdèmes médullaires, appelés « bone marrow lesions », de kystes sous-chondraux et d'ostéophytes. Une inflammation de la membrane synoviale, variable selon les patients, est observée ainsi qu'une dégénérescence des ménisques et un épaississement de la capsule articulaire. D'après Loeser, R. F. et al. 2010.

2.5.1 Atteintes du cartilage arthrosique

Les changements précoces ont lieu à la surface articulaire dans les zones de fortes contraintes mécaniques où s'exercent les forces de cisaillement (Andriacchi, T. P. et al. 2004). Le cartilage arthrosique perd ainsi son aspect nacré et lisse au profit d'une surface rugueuse, irrégulière, jusqu'à la mise à nu de l'os sous-chondral aux stades les plus avancés de la pathologie (Figure 36).

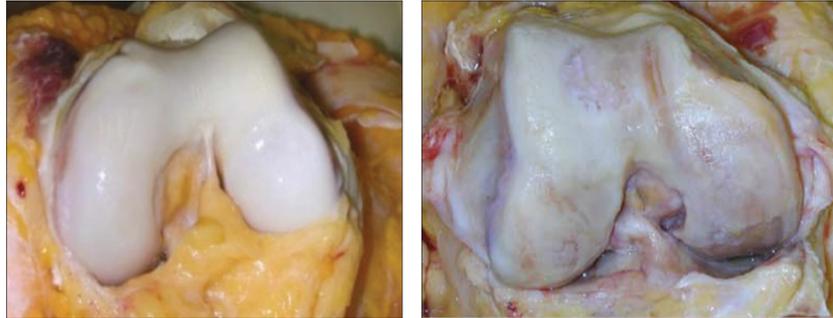


Figure 36: Aspect de la surface articulaire des condyles fémoraux d'un genou sain et d'un genou à un stade sévère d'arthrose.

Le genou à un stade sévère d'arthrose (à droite) laisse apparaître l'os sous-chondral sous la surface érodée du cartilage. D'après les travaux d'Aigner, T. et al. (2006a).

2.5.1.1 Réactivation du processus d'ossification endochondrale

Les chondrocytes physiologiquement quiescents subissent une activation et un changement phénotypique pro-catabolique en réponse à un stress excessif sur le cartilage, qu'il soit de nature mécanique ou biochimique (Goldring, M. B. & Goldring, S. R. 2007). Ils prolifèrent pour tenter de réparer le tissu, forment des clusters (Figure 37) et produisent des protéines matricielles et des enzymes protéolytiques, favorisant le remodelage et la dégradation de leur matrice extracellulaire (Goldring, M. B. & Marcu, K. B. 2009). Les chondrocytes des clusters du cartilage arthrosique expriment des marqueurs d'hypertrophie, tels que le collagène de type X (Von der Mark, K. et al. 1992), la phosphatase alcaline (Kirsch, T. et al. 2000), l'ostéocalcine (Pullig, O. et al. 2000a), MMP-13 (Billinghurst, R. C. et al. 1997) et Runx2 (Orfanidou, T. et al. 2009). Ils sont responsables de la sécrétion de cytokines et chimiokines, qui modulent les réponses pro-inflammatoires et pro-cataboliques des tissus articulaires. En tant que régulateurs clés de l'homéostasie du cartilage, toute modification du phénotype des chondrocytes entraîne donc un déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme dans le cartilage.

L'interruption de l'état quiescent des chondrocytes est similaire aux mécanismes activés au cours d'une réponse à une blessure, comme une fracture osseuse, impliquant la récapitulation des programmes développementaux et particulièrement une réactivation de l'ossification endochondrale (Zuscik, M. J. et al. 2008). Cette réactivation se caractérise par le remodelage de la matrice extracellulaire cartilagineuse par des enzymes protéolytiques, la différenciation hypertrophique des chondrocytes, une néo-vascularisation à la jonction ostéochondrale et une calcification du cartilage avec l'avancement et/ou la duplication de la tidemark. La duplication de la tidemark dans le cartilage humain est reconnue comme un phénomène plus courant chez les individus âgés de plus de 60 ans (Lane, L. B. & Bullough, P. G. 1980). Son avancement vers la surface articulaire devrait engendrer une augmentation de l'épaisseur du cartilage calcifié mais il a été montré qu'au contraire son épaisseur s'amincissait avec l'âge. En effet, ce cartilage calcifié est finalement remplacé par du tissu osseux en réponse à la réactivation du processus d'ossification endochondrale.

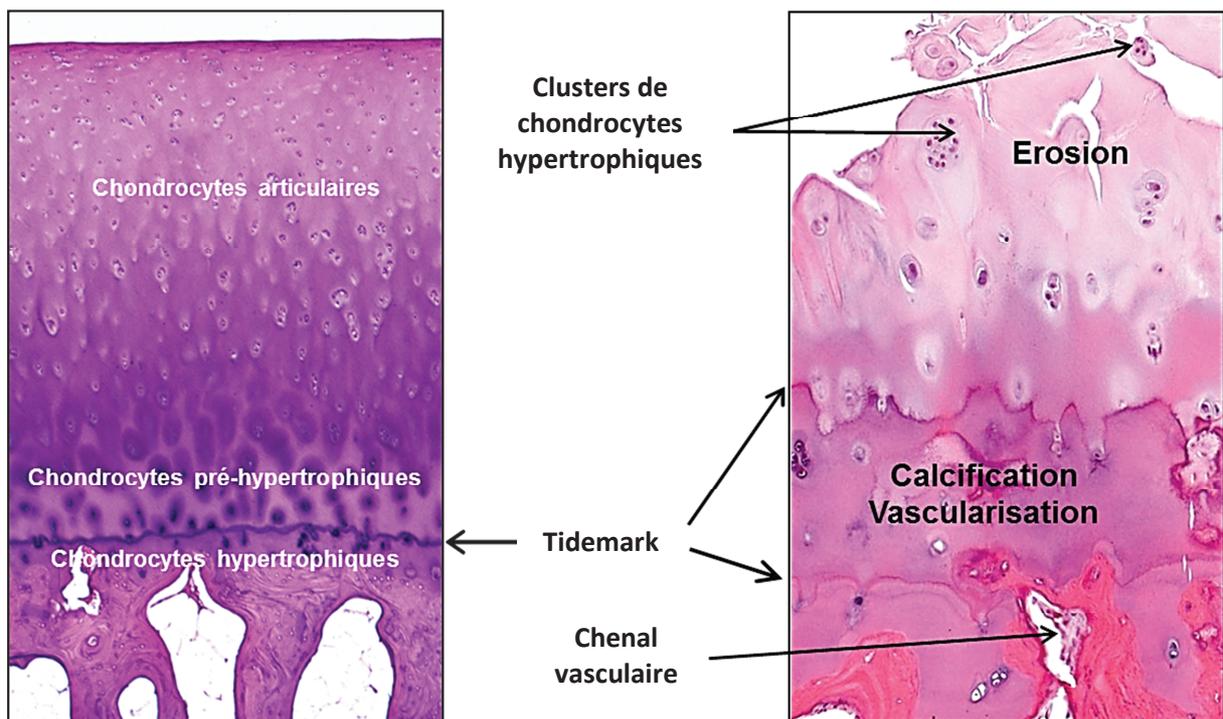


Figure 37: Coupes histologiques de cartilage articulaire sain et arthrosique.

L'organisation des chondrocytes en différentes couches de cartilage selon leur phénotype (chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques) est totalement perturbée dans le cartilage arthrosique. Les chondrocytes prolifèrent, s'organisent en clusters et expriment des marqueurs d'hypertrophie dans l'ensemble du cartilage articulaire arthrosique. Des fissures et une érosion des couches superficielles sont observées, une duplication de la tidemark, reflétant l'avancement du front de minéralisation, est constatée, parallèlement à une

angiogenèse ostéocondrale qui se développe dans le cartilage articulaire, normalement non vascularisé. Adapté des travaux de Loeser, R. F. et al. (2012).

Des anomalies à la fois qualitatives et quantitatives se manifestent dans le cartilage arthrosique. En effet, la tentative de réparation du tissu conduit à la formation d'une matrice de moins bonne qualité, composée de protéines matricielles différentes de celles produites par les chondrocytes du cartilage sain. Une expression de la forme fœtale du collagène de type II (IIa) ainsi qu'une expression du collagène de type III et de type X sont induites dans le cartilage arthrosique (Sandell, L. J. & Aigner, T. 2001). Ces processus anaboliques s'accompagnent de réponses inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α ...) et pro-cataboliques (aggrécases, collagénases...) qui vont progressivement dépasser les capacités de synthèse des chondrocytes.

Les modifications histologiques du cartilage arthrosique peuvent être évaluées à l'aide du score de Mankin, qui évalue l'apparence de la surface articulaire, la cellularité, la présence de protéoglycanes et l'intégrité de la tidemark, normalement non traversée par des chenaux vasculaires (Mankin, H. et al. 1971). Ce score permet d'établir le degré de sévérité de l'atteinte du cartilage articulaire.

Dans les phases précoces d'arthrose, la dégradation matricielle serait principalement causée par la MMP-3 et l'ADAMTS-5, impliquées dans la dégradation de l'aggrécane, suivies par une augmentation de l'activité des collagénases, et particulièrement de la MMP-13, responsable de la dégradation du collagène de type II (Troeberg, L. & Nagase, H. 2012). En plus de sa dégradation, la synthèse de collagène de type II est réduite en réponse aux stress (Heijink, A. et al. 2012). Lorsque l'état de dégradation du réseau de collagènes a atteint un certain seuil, cet état devient irréversible, non réparable par les chondrocytes du tissu endommagé.

En condition physiologique, le collagène de type II est non accessible pour les protéases grâce à son interaction avec les protéoglycanes, comme l'aggrécane. L'importance de la dégradation des protéoglycanes dans l'érosion du cartilage a été démontrée dans un modèle de souris knock-out pour ADAMTS-5, qui étaient protégées contre le développement d'une arthrose chirurgicalement induite (Glasson, S. S. et al. 2005). Toutefois, la déplétion en aggrécane n'est pas en elle-même la cause induisant la progression d'une arthrose car une étude a démontré dans un modèle de souris knock-out pour MMP-13 que ces souris étaient

protégées contre l'érosion du cartilage mais pas contre la déplétion en aggrecane (Little, C. B. et al. 2009).

Finalement, la destruction des couches superficielles du cartilage et l'avancement du front de minéralisation du cartilage calcifié vers les couches profondes du cartilage articulaire conduisent à une érosion bidirectionnelle du cartilage

2.5.1.2 Autres mécanismes impliqués dans l'évolution de l'arthrose

D'autres mécanismes sont aussi impliqués dans la destruction du cartilage. Citons par exemple, le rôle des fragments matriciels issus de la dégradation des collagènes (Bank, R. A. et al. 1997), de la fibronectine (Homandberg, G. A. et al. 1998, Zack, M. D. et al. 2006), de l'acide hyaluronique ou encore des protéoglycanes de petit poids moléculaire comme la fibromoduline et la décorine (Melrose, J. et al. 2008), retrouvés dans le cartilage arthrosique. Ces fragments stimulent la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de MMP (Homandberg, G. A. et al. 1998, Pulai, J. I. et al. 2005). Ces produits de dégradation pourraient également induire une inflammation par l'activation des réponses immunitaires innées. La cartilage oligomeric matrix protein (COMP) libérée du cartilage active la voie alternative du système du complément. Des complexes COMP et C3b sont d'ailleurs retrouvés dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Happonen, K. E. et al. 2010). Une analyse récente de la transcriptomique et protéomique de liquides synoviaux de patients arthrosiques a montré une expression et une activation anormalement élevées du système du complément (Wang, Q. et al. 2011).

La minéralisation du cartilage augmente les frictions des surfaces articulaires de genoux de rats (Roemhildt, M. L. et al. 2014). Cette observation suggère que cette minéralisation pourrait participer aux processus de dégradation du cartilage au cours de l'arthrose. Une équipe a mis en évidence la présence radiographique de chondrocalcinose et d'arthrose du genou chez 18,2% de la population étudiée, âgée de plus de 65 ans, alors que la part d'individus souffrant d'une gonarthrose sans chondrocalcinose passe à 6,9% (Musacchio, E. et al. 2011). Ces cristaux pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de l'arthrose en stimulant les récepteurs Toll-like (TLR) des chondrocytes et synoviocytes, qui induiraient la production de médiateurs inflammatoires (Liu-Bryan, R. et al. 2005). Dans un modèle murin d'arthrose, l'administration de sodium thiosulfate prévient la minéralisation des tissus péri-articulaires et réduit la sévérité de l'arthrose induite (Nasi, S. et al. 2016).

Les chondrocytes ont de nombreux récepteurs mécano-sensibles (intégrines, syndecans et canaux ioniques) interagissant avec les composants extracellulaires de la matrice (Houard, X. et al. 2013). La sur-activation de ces récepteurs stimule la production de protéases et métalloprotéases ainsi que de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines qui vont amplifier les évènements pro-cataboliques dans le cartilage arthrosique.

Les chondrocytes arthrosiques répondent aux différents médiateurs inflammatoires présents dans le cartilage et dans le liquide synovial (Goldring, M. B. & Goldring, S. R. 2007). Les synoviocytes de la membrane synoviale arthrosique et les ostéoblastes de l'os sous-chondral synthétisent des facteurs pro-inflammatoires et pro-cataboliques, participant à l'activation chondrocytaire. Des études récentes ont montré l'implication de l'inflammation de la membrane synoviale, responsable de la synthèse de damage-associated molecular patterns (DAMP) et d'alarmines, capables d'interagir avec les TLR ou avec le receptor for advanced glycation end products (RAGE) et d'ainsi activer des mécanismes pro-inflammatoires et pro-cataboliques dans le cartilage articulaire. Les protéines plasmatiques retrouvées dans le liquide synovial de patients arthrosiques peuvent agir comme des DAMP et contribuer ainsi à l'état inflammatoire de bas grade. Une revue récemment écrite par notre équipe (Nefla, M. et al. 2016) a recensé l'effet des alarmines au cours de l'arthrose. La protéine high mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB-1) a été montrée comme une molécule induisant une réponse inflammatoire en agissant sur les chondrocytes articulaires et les synoviocytes. Les alarmines S100A4, A8, A9 et A11, sont capables comme HMGB-1 d'activer les récepteurs RAGE et TLR et d'induire des réponses pro-inflammatoires et pro-cataboliques, participant à la dégradation du cartilage arthrosique. Les récepteurs TLR-2 et TLR-4 sont d'ailleurs exprimés dans les régions endommagées du cartilage arthrosique (Kim, H. A. et al. 2006). Ces cascades de signalisation augmentent aussi la sécrétion d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Cette production de ROS en réponse aux cytokines, au stress mécanique mais également aux débris matriciels, pourrait contribuer à la mort cellulaire des chondrocytes au cours du processus arthrosique (Del Carlo, M. & Loeser, R. F. 2008).

L'apoptose des chondrocytes est aussi impliquée dans la progression de l'arthrose. Une corrélation a été établie entre l'apoptose des chondrocytes et la sévérité des lésions de la MEC (diminution des protéoglycanes, minéralisation de la matrice) (Musumeci, G. et al. 2011).

L'expression d'adipokines par les chondrocytes peut être induite par des stimuli inflammatoires dans un contexte d'arthrose métabolique. La stimulation des chondrocytes articulaires avec la leptine, l'adiponectine, la visfatine/nampt ou la résistine, seule ou en combinaison avec d'autres cytokines inflammatoires peut induire en retour l'expression de cytokines et de MMP (Houard, X. et al. 2013).

Quelle que soit la cause primaire de l'arthrose (âge, prédisposition génétique, syndrome métabolique ou traumatisme) nous constatons toujours une activation des voies de l'inflammation et du catabolisme dans le cartilage, parallèlement à un changement du phénotype des chondrocytes vers une hypertrophie.

2.5.1.3 Rôle de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans les processus pro-cataboliques et pro-inflammatoires

La différenciation hypertrophique des chondrocytes a été mise en évidence dans le cartilage arthrosique humain mais également dans des modèles animaux d'arthrose expérimentalement induite.

2.5.1.3.1 Calcification du cartilage articulaire arthrosique

Fuerst et al. ont montré la présence de calcifications dans tous les échantillons de cartilages arthrosiques analysés au cours de son étude, soit 120 patients (Fuerst, M. et al. 2009). Ils ont démontré que la sévérité de l'arthrose était positivement corrélée au degré de calcification de la matrice du cartilage. Les cristaux de phosphate de calcium (hydroxyapatite) ont été identifiés comme les principaux minéraux composant les calcifications dans ces tissus. Cette étude a également démontré une corrélation positive entre le degré de calcification du cartilage articulaire et le niveau d'expression de marqueurs de l'hypertrophie, comme le collagène de type X. Ces travaux suggèrent que la différenciation hypertrophique des chondrocytes est un élément clé dans la minéralisation du cartilage articulaire et qu'elle est indissociable à la progression de l'arthrose.

2.5.1.3.2 Expression de marqueurs de l'hypertrophie dans le cartilage arthrosique

Au cours de l'arthrose, les chondrocytes articulaires perdent leur phénotype différencié et récapitulent un programme de différenciation hypertrophique, comme décrit dans le processus d'ossification endochondrale dans la plaque de croissance (Dreier, R. 2010).

L'expression du collagène de type X a été détectée dans le cartilage humain arthrosique, répartie autour des clusters de chondrocytes à la surface articulaire (Von der Mark, K. et al. 1992, Kirsch, T. et al. 2000). Sa présence altère les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. Comme au cours de l'ossification endochondrale, le collagène de type X favorise la minéralisation du tissu. L'expression de la phosphatase alcaline a également été rapportée dans les couches superficielles du cartilage arthrosique et notamment dans les clusters de chondrocytes (Kirsch, T. et al. 2000). Un autre marqueur de l'hypertrophie, la MMP-13 est fréquemment décrite comme augmentée dans le cartilage arthrosique (Billinghurst, R. C. et al. 1997, Shlopov, B. V. et al. 1997 et 2000).

D'autres gènes ou protéines, associés à la différenciation hypertrophique des chondrocytes ont montré un fort niveau d'expression dans le cartilage arthrosique par rapport au cartilage sain. Parmi eux, l'ostéocalcine (Pullig, O. et al. 2000a), l'ostéopontine (Pullig, O. et al. 2000b), l'ostéonectine (Goyal, N. et al. 2010), le facteur de transcription Runx2 (Orfanidou, T. et al. 2009), le VEGF (Pfander, D. et al. 2001, Enomoto, H. et al. 2003) et la β -caténine (Zhu, M. et al. 2009). A l'inverse, l'expression de Sox9 est fortement inhibée dans les chondrocytes arthrosiques (Orfanidou, T. et al. 2009), comme précédemment décrit au cours de la différenciation terminale des chondrocytes de la plaque de croissance (Zuscik, M. J. et al. 2008).

L'apoptose est considérée comme un processus accompagnant la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Blanco, F. J. et al. 1998). Les chondrocytes humains arthrosiques présentent un marquage TUNEL élevé et expriment des marqueurs de l'apoptose, comme les annexines II et V, les caspase-3 et -9, BCL-2 et FAS (Kirsch, T. et al. 2000, Matsuo, M. et al. 2001, Sharif, M. et al. 2004). L'abondance de ces marqueurs pro-apoptotiques dans les chondrocytes arthrosiques suggère l'acquisition d'un phénotype semblable aux chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance.

La différenciation hypertrophique des chondrocytes entraîne donc une modification de la composition de la matrice extracellulaire cartilagineuse, qui est de moins bonne qualité et résiste moins efficacement aux sollicitations mécaniques de l'articulation, entraînant progressivement la destruction du cartilage (Aigner, T. et al. 2006a).

2.5.1.3.3 Différenciation hypertrophique dans des modèles animaux d'arthrose

La présence de marqueurs de l'hypertrophie a été décrite dans plusieurs modèles d'arthrose, provenant d'espèces animales différentes, comme chez le cochon d'inde Hartley et des chevaux arthrosiques, où une apoptose des chondrocytes a été mise en évidence (Kim, D. Y. et al. 2003, Burton, D. W. et al. 2005). Chez la souris, dont le modèle le plus couramment utilisé est la déstabilisation de l'articulation du genou par transection du ligament médial (modèle de déstabilisation du ménisque médial « DMM »), une expression élevée de la MMP-13 et du collagène de type X a été rapportée (Kamekura, S. et al. 2005 et 2006). De façon similaire chez le rat, après transection du ligament croisé antérieur, une expression de la phosphatase alcaline, de la MMP-13 et du collagène de type X est observée dans l'articulation développant une arthrose (Appleton, C. T. et al. 2007). Une méniscectomie du ménisque médial chez des animaux de plus grande taille, tels que le mouton, engendre également un phénotype hypertrophique des chondrocytes articulaires arthrosiques près de 6 mois après l'opération (Ghosh, P. et al. 1991). La régulation de la différenciation hypertrophique et sa relation avec le développement d'une arthrose ont été étudiées dans des modèles murins génétiquement modifiés, notamment chez des souris hétérozygotes pour Runx2 ($Runx2^{+/-}$) (Kamekura, S. et al. 2006) et des souris knock-out conditionnel dans le cartilage articulaire ($Runx2^{Agc1CreER}$) (Liao, L. et al. 2017). L'expression de Runx2 est induite dans le cartilage articulaire des souris WT à une étape précoce de l'arthrose, accompagnée d'une induction de l'expression du collagène de type X, puis de celle de MMP-13. Les souris $Runx2^{+/-}$ présentent un développement squelettique normal. Suite à l'induction d'une arthrose par DMM, ces souris montrent une dégradation limitée du cartilage, une formation réduite d'ostéophytes, parallèlement à une diminution de l'expression de la MMP-13 et du collagène de type X, par rapport aux souris WT arthrosiques. Les auteurs ont suggéré l'implication de Runx2 dans la pathogenèse de l'arthrose en favorisant la différenciation hypertrophique des chondrocytes et la dégradation de la matrice extracellulaire en réponse au DMM. Une seconde étude (Liao, L. et al. 2017) a également montré des atteintes d'arthrose sévère en réponse au DMM chez des souris contrôles Cre négatives, présentant une dégradation du cartilage articulaire et une sclérose de l'os sous-chondral, qui étaient au contraire significativement réduites chez les souris déficientes pour Runx2 dans le cartilage articulaire ($Runx2^{Agc1CreER}$). Leur étude immunohistochimique a révélé une expression significativement diminuée de MMP-13 chez les souris $Runx2^{Agc1CreER}$ par rapport aux souris contrôles Cre négatives. De même, les

niveaux d'expression génique d'enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation de la matrice (MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5) étaient significativement diminués chez les souris $Runx2^{Agc1CreER}$.

Notons que les observations réalisées dans ces études chez l'animal sont extrêmement similaires aux phénomènes décrits dans la pathologie humaine puisque le facteur RUNX2 est connu pour être exprimé dans le cartilage humain arthrosique et qu'il régule l'expression de la MMP-13 et du collagène de type X (Wang, X. et al. 2004, Higashikawa, A. et al. 2009).

2.5.1.4 Régulation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes

Le facteur de transcription hypoxia-inducible factor 2 alpha (HIF-2 α) est fortement exprimé dans le cartilage arthrosique humain et dans des modèles murins d'arthrose (Yang, S. et al. 2010, Saito, T. et al. 2010). HIF-2 α est impliqué dans la régulation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes au cours du processus d'ossification endochondrale (Saito, T. et al. 2010). Son gène endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) est décrit comme un trans-activateur important du gène COL10A1. Il a été montré que HIF-2 α activait également l'expression de MMP-13 et du VEGF via son interaction avec les éléments de réponse à l'hypoxie dans les promoteurs de ces gènes. Les souris hétérozygotes pour *Epas1* montrent une résistance face au développement de l'arthrose induite par DMM (Yang, S. et al. 2010). A l'inverse, les chondrocytes issus de souris transgéniques pour *Epas1* démontrent une destruction spontanée du cartilage articulaire. Finalement, HIF-2 α induit une destruction du cartilage en favorisant la différenciation hypertrophique des chondrocytes et en régulant l'expression de gènes cataboliques cruciaux au cours de la physiopathologie de l'arthrose, comme la MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 ou ADAMTS-4. Une équipe a démontré récemment l'importance de la chondromoduline I (ChM-I), abondamment présente dans le cartilage articulaire sain, dans le maintien du phénotype articulaire des chondrocytes et de l'avasculaireité du cartilage par l'inhibition de la translocation nucléaire du facteur HIF-2 α (Zhang, X. et al. 2016a). La ChM-I permettrait ainsi de maintenir l'homéostasie du cartilage en inhibant la différenciation hypertrophique des chondrocytes et l'expression de facteurs cataboliques induites par HIF-2 α (Figure 38). Au cours de l'arthrose, la diminution de la ChM-I dans le cartilage conduirait à l'activation de HIF-2 α .

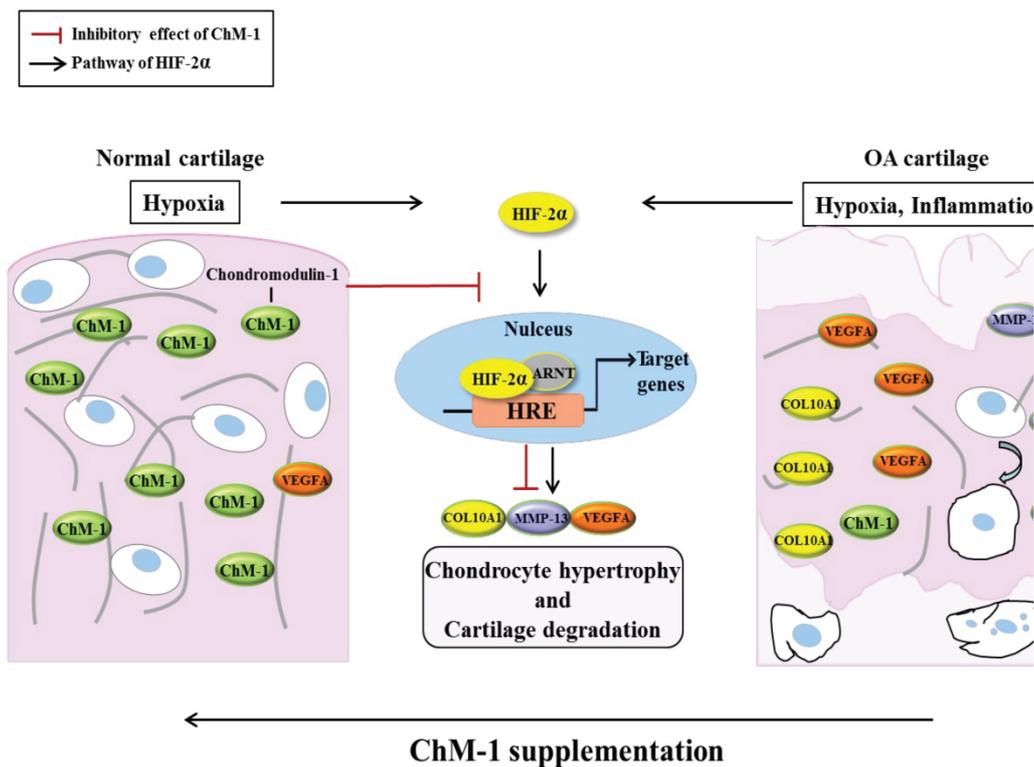


Figure 38: Mécanisme de l'effet protecteur de la chondromoduline I sur l'homéostasie du cartilage articulaire.

Dans le cartilage sain, l'expression abondante de ChM-I bloquerait l'activité de HIF-2 α , dont l'action favorise la différenciation hypertrophique des chondrocytes et l'activation des voies pro-cataboliques et pro-angiogéniques. Au contraire, dans le cartilage arthrosique, le défaut de ChM-I conduit à l'activation de l'activité transcriptionnelle de HIF-2 α , supportant la différenciation hypertrophique des chondrocytes et la dégradation du cartilage à travers l'induction de l'expression de gènes cataboliques (COL10A1, MMP-13 et VEGFA). D'après les auteurs, une supplémentation en ChM-I pourrait constituer un potentiel moyen thérapeutique contre l'arthrose. D'après les travaux de Zhang, X. et al. (2016a).

La voie de signalisation Wnt pourrait jouer un rôle dans les atteintes du cartilage au cours de l'arthrose en promouvant également la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Luyten, F. P. et al. 2009). En effet, une surexpression de la β -caténine dans des modèles murins conduit à une augmentation de l'expression de marqueurs de l'hypertrophie, tels que la MMP-13 et le collagène de type X par les chondrocytes articulaires, en réponse à une augmentation de l'expression de Runx2 (Dong, Y. F. et al. 2006, Guo, X. et al. 2009) favorisant ainsi la dégradation du cartilage (Zhu, M. et al. 2009).

L'activation de la voie de signalisation d'indian hedgehog (Ihh) promeut également la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le cartilage humain arthrosique, en induisant l'expression de MMP-13 et du collagène de type X (Wei, F. et al.

2012). L'expression d'Ihh dans le cartilage corrèle d'ailleurs avec la progression de l'arthrose et les changements morphologiques des chondrocytes. Des données d'IRM ont confirmé cette association entre l'activation de la voie de signalisation d'Ihh et les manifestations cliniques d'arthrose (Shuang, F. et al. 2015). Dans un modèle murin, les expressions géniques de Mmp13 et de Col10a1 sont diminuées chez les souris arthrosiques déficientes pour Ihh (*Col2a1-CreER^{T2}; Ihh^{fl/fl}*) par rapport aux souris arthrosiques contrôles (Zhou, J. et al. 2014).

Les facteurs pro-inflammatoires présents dans l'articulation arthrosique (IL-8, TNF- α ou les alarmines S100) peuvent aussi accélérer la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Cecil, D. L. et al. 2005a, 2005b et 2009, Cecil, D. L. & Terkeltaub, R. 2008, Olivotto, E. et al. 2008).

Finalement, la différenciation hypertrophique des chondrocytes semble être modulée par une variété de stimuli et régulée en intra-cellulaire par de nombreuses molécules et facteurs de transcription, comme Runx2, qui joue un rôle central. La voie de différenciation des chondrocytes semble être par défaut la différenciation hypertrophique, une destinée inhibée dans le cartilage non calcifié sain. L'inhibition de cette différenciation hypertrophique est un mécanisme finement régulé. L'arthrose est une pathologie en grande partie liée à l'âge ou à des traumatismes articulaires qui sont associés à une dérégulation de la réponse des chondrocytes aux stress mécaniques et/ou inflammatoires, ayant pour conséquence la perte de nombreux systèmes de régulation dans le cartilage (Van der Kraan, P. M. & Van den Berg, W. B. 2012, Dufour, E. & Larsson, N. G. 2004). L'incapacité des chondrocytes à inhiber leur différenciation hypertrophique pourrait constituer l'un de ces systèmes de régulation défaillant au cours du vieillissement et de l'arthrose. Prenons l'exemple de la diminution de l'expression de Sox9 ou de la chondromoduline I dans le cartilage arthrosique, les rendant incapables de contrecarrer efficacement la différenciation hypertrophique des chondrocytes.

L'ensemble de ces études nous démontre l'importance du processus de différenciation hypertrophique dans l'induction des voies pro-cataboliques et de la minéralisation du cartilage, impliquées dans le développement de l'arthrose. Les altérations du phénotype chondrocytaire semblent donc jouer un rôle central dans la progression de la pathologie.

2.5.2 Atteintes de l'os sous-chondral arthrosique

Au cours de l'arthrose, un remodelage pathologique de l'os sous-chondral est observé en réponse aux stress mécaniques et biochimiques subis. Il se caractérise par un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse, aboutissant *in fine* à la sclérose de l'os sous-chondral, à l'apparition d'ostéophytes, d'œdèmes médullaires et de kystes sous-chondraux, décrits ci-dessous.

Il est aujourd'hui clairement démontré que le remodelage de l'os sous-chondral joue un rôle essentiel dans l'évolution des lésions arthrosiques (Funck-Bretano, T. & Cohen-Solal, M. 2015). Les changements structuraux de l'os sous-chondral sont aisément visualisables par des techniques d'imagerie. Dieppe et al. étaient les premiers à proposer la scintigraphie osseuse comme marqueur prédictif des modifications structurales observées dans l'arthrose (Dieppe, P. et al. 1993). Une augmentation de l'activité de l'os sous-chondral, mesurée par l'absorption du diphosphonate pouvait en effet prédire la dégradation du cartilage, contrairement à une baisse d'activité corrélée à une diminution des lésions cartilagineuses.

De récentes études cliniques ont mis en avant par imagerie par résonance magnétique (IRM) des changements osseux dès les phases précoces de l'arthrose, avant toute apparition de lésions cartilagineuses, suggérant que les modifications qui ont lieu dans l'os sous-chondral pourraient initier les lésions du cartilage (Xu, L. et al. 2012). La détection de modifications osseuses, avant tout changement détectable dans le cartilage articulaire, pourrait être due aux capacités différentielles de l'os et du cartilage à s'adapter à une contrainte mécanique ou à une lésion. L'os est en effet capable de remodeler son architecture et sa structure, contrairement au cartilage qui présente des capacités relativement limitées de réparation et de modification de son environnement matriciel (Goldring, M. B. & Goldring, S. R. 2007).

Au cours des stades précoces de l'arthrose, une hyperactivité de l'os favoriserait une résorption osseuse, associée à un défaut de minéralisation. La plupart des modèles animaux montre une augmentation précoce de la résorption osseuse suivie ultérieurement par une augmentation de la formation osseuse, aboutissant à une sclérose de l'os sous-chondral (Funck-Bretano, T. & Cohen-Solal, M. 2015).

2.5.2.1 Sclérose de l'os sous-chondral

A un stade d'arthrose précoce, l'os sous-chondral trabéculaire est aminci alors que la plaque osseuse corticale sous-chondrale est épaissie. Les changements ostéoporotiques de l'os sous-chondral sont supposés être dus à la transmission réduite de la contrainte mécanique par la plaque sous-chondrale plus épaisse (Messent, E. A. et al. 2005a et 2005b). Au cours de l'arthrose, les ostéoblastes se différencient plus vite (Hilal, G. et al. 1998), prolifèrent davantage (Mutabaruka, M. S. et al. 2010) et ont un taux d'apoptose réduit. Ces mécanismes font suite à un besoin plus important de répondre aux sollicitations mécaniques. Toutefois, ces ostéoblastes arthrosiques ne produisent pas la même matrice ostéoïde qu'à l'état physiologique. Une expression de collagène de type Ia1 plutôt que Ia2 est observée dans l'os arthrosique (Bailey, A. J. et al. 2002). Ces changements altèrent la qualité du tissu osseux par la désorganisation des fibres de collagènes, conduisant à une diminution de la résistance et à une minéralisation anormale de l'os (Couchourel, D. et al. 2009). Ces changements aboutissent à une réduction de la capacité d'absorption des contraintes mécaniques par l'os et à une augmentation du risque d'apparition de microfissures (Fazzalari, N. L. et al. 1998). Ces défauts de minéralisation sont dus à une production anormale de TGF- β 1 par les ostéoblastes arthrosiques. Ces ostéoblastes sécrètent aussi davantage d'IGF-1, ce qui pourrait favoriser la surproduction d'une matrice ostéoïde et par conséquent conduire à une sclérose osseuse (Figure 39) (Massicotte, F. et al. 2006). Ces modifications augmentent le stress mécanique sur le cartilage sus-jacent (Radin, E. L. & Rose, R. M. 1986).

En réponse au stress mécanique, les ostéoblastes acquièrent un phénotype sclérotique, caractérisé par une activité sécrétoire accrue par rapport aux ostéoblastes non sclérotiques (Sanchez, C. et al. 2008 et 2012). Ce phénotype présente une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance (TGF- β 1, VEGF), de cytokines (IL-6, IL-8), d'enzymes (MMP-13, phosphatase alcaline) et de protéines matricielles (ostéocalcine, ostéopontine) qui jouent un rôle régulateur dans le remodelage osseux. Des études *in vivo* ont confirmé les effets délétères d'un stress mécanique appliqué sur des genoux de souris, qui modifie leur structure sous-chondrale en favorisant la sclérose osseuse et la formation d'ostéophytes (Ko, F. C. et al. 2013).

Le rôle précis des ostéoclastes au cours de l'arthrose est moins connu. Il est décrit que l'activité ostéoclastique est augmentée dans l'arthrose, en partie expliquée par une sécrétion plus importante de RANKL par les ostéoblastes et les synoviocytes arthrosiques (Karsdal, M.

A. et al. 2014). Dans un modèle murin d'arthrose expérimentalement induite par méniscectomie, des injections d'ostéoprotégérine (OPG), inhibant le complexe RANK/RANKL, ont démontré un effet bénéfique en limitant la sévérité des remaniements osseux au cours de l'arthrose (Kadri, A. et al. 2008). De même, l'administration sous-cutanée d'un inhibiteur de la résorption osseuse (alendronate) dans un modèle de rats arthrosiques a démontré des effets protecteurs sur le cartilage articulaire et une diminution de la formation d'ostéophytes (Hayami, T. et al. 2004). Ces études ont ainsi suggéré le rôle potentiel des ostéoclastes dans la physiopathologie de l'arthrose.

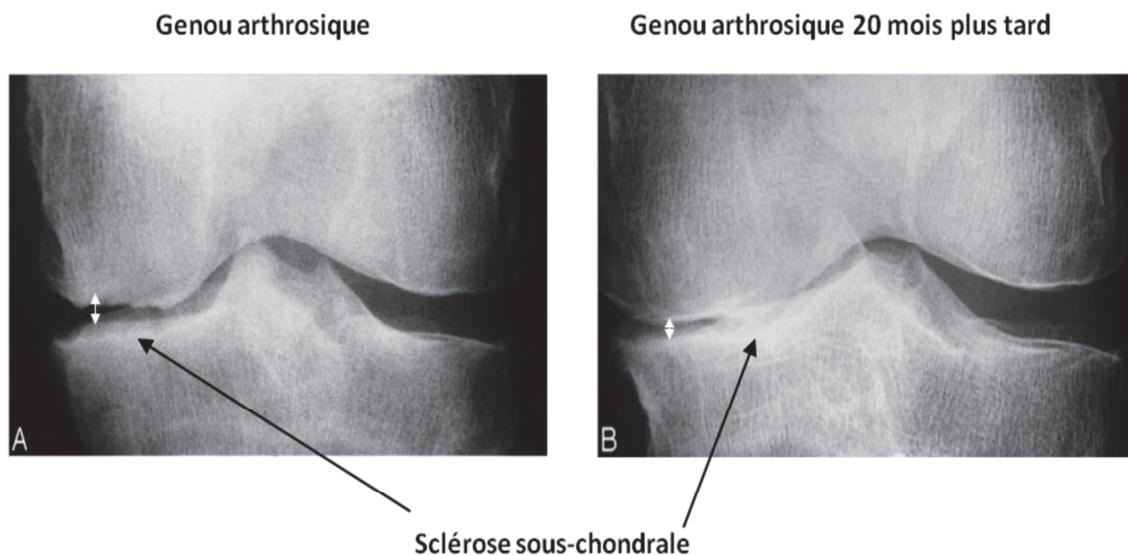


Figure 39: Evolution d'une gonarthrose visualisée par radiographie.

Ces radiographies représentent l'évolution 20 mois plus tard de la sclérose de la plaque osseuse sous-chondrale chez un patient arthrosique, accompagnée d'un pincement de l'interligne articulaire (doubles flèches blanches). Adapté des travaux de Buckland-Wright, C. (2004).

2.5.2.2 Ostéophytes

Les ostéophytes sont des excroissances osseuses recouvertes de tissu fibrocartilagineux qui apparaissent sur les bords des pièces osseuses de l'articulation. Ils sont communément responsables d'une douleur importante (Boegård, T. et al. 1998a et 1998b, Van der Kraan, P. M. & Van den Berg, W. B. 2007). La formation de ces ostéophytes pourrait être un mécanisme adaptatif du squelette, servant à stabiliser l'articulation arthrosique et à étendre la surface de transmission des charges afin de répartir le stress mécanique (Pottenger, L. A. et al. 1990, Van der Kraan, P. M. & Van den Berg, W. B. 2007). Ces ostéophytes seraient mis en place suite à la récapitulation du processus d'ossification endochondrale entraînant une

prolifération des cellules souches du périoste, qui se différencieraient en chondrocytes hypertrophiques. Cette différenciation aboutirait ensuite au dépôt d'une matrice osseuse minéralisée (Van der Kraan, P. M. & Van den Berg, W. B. 2007). La production locale de facteurs de croissance (TFG- β , BMP-2, bFGF) est impliquée dans ce mécanisme (Uchino, M. et al. 2000, Zoricic, S. et al. 2003, Blaney Davidson, E. N. et al. 2007). Il a été montré que l'injection intra-articulaire de TFG- β 1 induisait la formation d'ostéophytes dans un modèle murin (Bakker, A. C. et al. 2001). Enfin, des données cliniques ont montré une corrélation entre les niveaux élevés d'IGF-1 circulant et la croissance d'ostéophytes (Schouten, J. S. et al. 1993).

2.5.2.3 Œdèmes médullaires « bone marrow lesions »

Les œdèmes médullaires sont des lésions osseuses mises en évidence pour la première fois par Wilson et al. grâce à l'IRM (Wilson, A. J. et al. 1988). Ce terme regroupe diverses anomalies histologiques, telles qu'une nécrose de la matrice ostéoïde, une fibrose de la moelle osseuse et un infiltrat de cellules inflammatoires. La moelle osseuse nécrosée est remplacée par du tissu cicatriciel fibreux qui altère les propriétés biomécaniques de l'os trabéculaire sous-chondral (Martig, S. et al. 2007, Taljanovic, M. S. et al. 2008).

Ces œdèmes médullaires ont un aspect sclérotique, présentant une épaisseur trabéculaire augmentée mais une minéralisation réduite, conférant une fragilité à ces régions osseuses et un risque important d'attrition (Hunter, D. J. et al. 2009). Ces zones de remodelage osseux sont corrélées aux zones de dégradation du cartilage et à la douleur chez les patients (Felson, D. T. et al. 2001, Hunter, D. J. et al. 2006). La douleur pourrait être causée par la présence de microfissures et des chenaux vasculaires qui favorisent la croissance de nerfs sensitifs (Mapp, P. I. & Walsh, D. A. 2012). Une étude de cohorte américaine a montré que la présence d'œdèmes médullaires chez des patients arthrosiques asymptomatiques leur augmentait le risque d'apparition de douleurs articulaires au cours de la période de suivi de l'étude. Les auteurs ont ainsi suggéré que ces lésions seraient prédictives de l'apparition des symptômes de l'arthrose (Javaid, M. K. et al. 2010). La présence de lésions au niveau des régions soumises à un stress mécanique, notamment dans les défauts d'alignement des articulations, suggère que ces lésions seraient d'origine mécanique (Felson, D. T. et al. 2003, Taljanovic, M. S. et al. 2008).

2.5.2.4 Kystes sous-chondraux

L'apparition de kystes sous-chondraux est liée aux œdèmes médullaires dans les zones de remodelage osseux excessif (Carrino, J. A. et al. 2006, Chen, Y. et al. 2015). Ces kystes sous-chondraux sont des lésions cavitaires de l'os sous-chondral trabéculaire qui peuvent être détectées par IRM. Il s'agit de cavités qui contiennent des fragments d'os nécrotiques, des résidus fibreux et du liquide, issu du réseau vasculaire osseux et/ou du liquide synovial (Pouders, C. et al. 2008). Il est décrit que 75% des patients arthrosiques présentent des kystes sous-chondraux (Raynauld, J. P. et al. 2008). Ils sont associés aux douleurs, aux atteintes structurelles de l'os sous-chondral et à la dégénérescence du cartilage (Chen, Y. et al. 2015). Une corrélation a été établie récemment entre les kystes sous-chondraux et l'inflammation de la membrane synoviale dans les stades tardifs d'arthrose, suggérant que la synovite pourrait être due aux atteintes sous-chondrales et pas uniquement à la dégradation du cartilage articulaire (Yusup, A. et al. 2015).

2.5.3 Atteintes de la membrane synoviale

Le degré d'inflammation de la membrane synoviale est très variable au cours de l'arthrose, pouvant s'accompagner d'un épanchement intra-articulaire (Figure 40). Parmi les patients souffrant d'une arthrose sévère, environ un tiers présente une synovite marquée, un tiers une synovite modérée et le dernier tiers une faible synovite (Haywood, L. et al. 2003). Cette observation suggère que la synovite pourrait jouer un rôle déterminant chez un certain nombre de patients arthrosiques mais ne constitue pas le moteur principal de la progression de la pathologie. Des infiltrats inflammatoires ont été identifiés dans la membrane synoviale de nombreux patients arthrosiques, bien qu'ils soient généralement à des niveaux bien inférieurs à ceux observés chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (Pessler, F. et al. 2008). Une synovite, caractérisée par une infiltration de macrophages et de lymphocytes, est observée dans les stades précoces d'arthrose (Benito, M. J. et al. 2005) mais sa prévalence augmente avec la sévérité de la maladie (Scanzello, C. R. et al. 2011, Krasnokutsky, S. et al. 2011). Des données d'IRM démontrent que la synovite est impliquée précocement dans la physiopathologie de l'arthrose et qu'elle précède parfois les lésions cartilagineuses (Atukorala, I. et al. 2016). En effet, il a été suggéré que la synovite et l'épanchement intra-articulaire repérés par IRM seraient prédictifs de l'apparition des lésions du cartilage.



Figure 40: Coupe sagittale d'un genou arthrosique en IRM.

Visualisation de l'inflammation de la membrane synoviale tapissant la face profonde du tissu adipeux de Hoffa. L'inflammation se propage au sein du tissu adipeux (flèches). Un épanchement intra-articulaire est également mis en avant chez ce patient (*). D'après les travaux d'Atukorala, I. et al. (2016).

Une hyperplasie, une fibrose et une vascularisation accrue sont observées dans la membrane synoviale inflammatoire (Figure 41) (Ashraf, S. et al. 2011a). L'intima s'hyperplasia suite à un recrutement massif de synoviocytes, principalement de type macrophagique. La subintima est également infiltrée par de nombreux types cellulaires de l'immunité innée (macrophages, mastocytes) mais également de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B) (Revell, P. A. et al. 1988). L'inflammation de la membrane synoviale stimule l'angiogenèse, qui entretient l'inflammation (Honorati, M. C. et al. 2006). Parallèlement à ces mécanismes pro-inflammatoires, une perturbation de la production de certains facteurs impliqués dans l'homéostasie de l'articulation est constatée. C'est le cas de l'acide hyaluronique dont le poids moléculaire et la concentration sont diminués dans le liquide synovial des patients arthrosiques, à l'origine d'une altération de la lubrification de l'articulation arthrosique (Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. 2012). Des changements semblables sont observés pour la lubricine, une autre molécule indispensable à la lubrification de l'articulation (Szychlińska, M. A. et al. 2016).

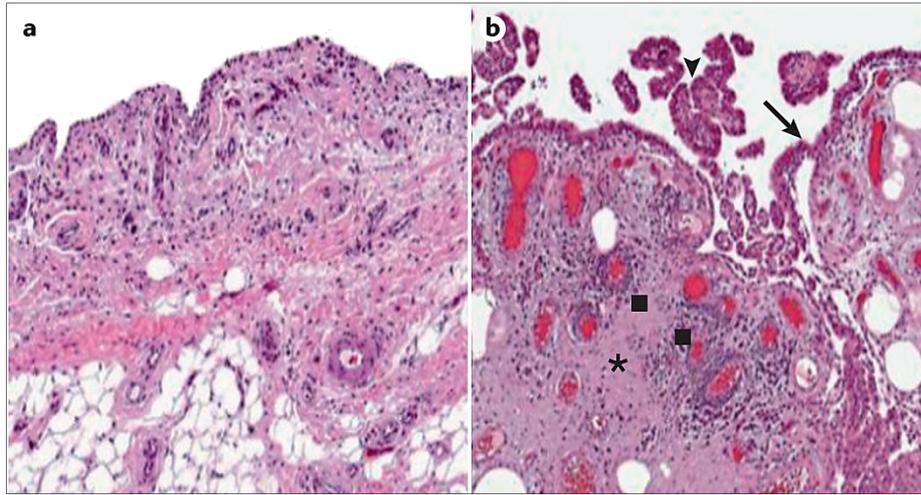


Figure 41: Histologie de la membrane synoviale arthrosique.

(a) Histologie d'une membrane synoviale saine composée d'une fine couche supérieure, l'intima, au-dessus de la subintima. (b) Atteintes de la membrane synoviale au cours de l'arthrose, caractérisées par une hyperplasie de l'intima (tête de flèche) et des villosités (flèche), une fibrose (*) et un infiltrat de cellules mononucléées péri-vasculaires (■). D'après Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. (2012).

Les synoviocytes macrophagiques sont les principaux producteurs locaux de $\text{TNF-}\alpha$ et d' $\text{IL-}\beta$. Cette production favorise une réponse pro-inflammatoire des synoviocytes fibroblastiques, qui participent aussi à l'inflammation articulaire en sécrétant des médiateurs pro-inflammatoires, tels que le $\text{TNF-}\alpha$, l' $\text{IL-}1\beta$, l' $\text{IL-}6$, l' $\text{IL-}8$, la monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), le C-C motif chemokine ligand-5 et -19 (CCL5, CCL19) et la prostaglandine E_2 (PGE_2), ainsi que des enzymes protéolytiques (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 et ADAMTS-4) (Bondeson, J. et al. 2006, Sellam, J. & Berenbaum, F. 2010, Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. 2012). L'implication de la membrane synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose a été décrite dans une revue publiée par notre équipe (Figure 42) (Sellam, J. & Berenbaum, F. 2010). Les produits de dégradation du cartilage et de l'os, ainsi que les cristaux d'hydroxyapatite, libérés dans la cavité articulaire sont captés par la membrane synoviale, causant une réaction inflammatoire à l'origine d'une sécrétion massive de médiateurs pro-inflammatoires, de protéases, de médiateurs lipidiques et d'adipokines qui vont agir en retour sur le cartilage articulaire et l'os sous-chondral. Cette rétroaction est responsable de l'installation d'un cercle vicieux qui engendre la dégradation progressive du cartilage et le remodelage des tissus adjacents (os, ligaments, tendons, ménisques...). Les synoviocytes arthrosiques sont également impliqués dans la production de $\text{TGF-}\beta$, de BMP-2 et BMP-4, qui favorisent le développement d'ostéophytes (Blom, A. B. et al. 2004) et de

monoxyde d'azote (NO), qui participe à la mise en place d'un stress oxydant au sein de l'articulation (McInnes, I. B. et al. 1996).

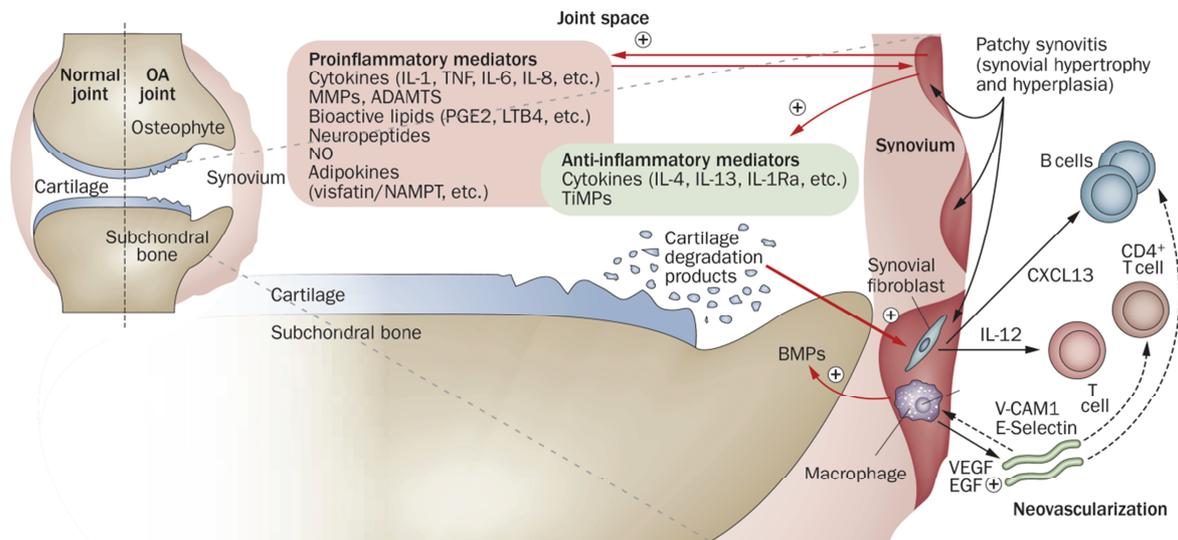


Figure 42: Rôle de la membrane synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose.

Des produits de dégradation du cartilage sont libérés dans la cavité articulaire et phagocytés par les synoviocytes, conduisant à une amplification de l'inflammation synoviale. Les synoviocytes activés produisent massivement des médiateurs pro-cataboliques et pro-inflammatoires, impliqués dans la dégradation du cartilage, créant en conséquence une boucle de rétroaction positive. L'activation des synoviocytes et le recrutement de lymphocytes B et T amplifient la réponse inflammatoire de la membrane synoviale. Pour tenter de contrecarrer cette réponse inflammatoire exacerbée, la membrane synoviale peut produire des médiateurs anti-inflammatoires. D'après la revue de Sellam, J. & Berenbaum, F. (2010).

2.5.4 Atteintes des tissus adipeux intra-articulaires

L'implication du tissu adipeux de Hoffa dans des syndromes douloureux a été mise en évidence par un orthopédiste allemand, le professeur Albert Hoffa, qui a décrit des remodelages provoquant une hyperplasie et une fibrose de ce tissu, à l'origine de douleurs antérieures du genou. Ces remodelages seraient la conséquence de processus inflammatoires et hémorragiques en réponse à des traumatismes répétés. Le volume du tissu adipeux de Hoffa semble corrélé à l'indice de masse corporelle (IMC) des sujets (Diepold, J. et al. 2015), avec un volume plus important chez les individus obèses (Ballegaard, C. et al. 2014). Il existerait également une corrélation entre l'importance de la surcharge pondérale et le phénotype pro-inflammatoire de ce tissu, reflété par la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 (Klein-Wieringa, I. R. et al. 2011). Une étude a démontré chez des patients souffrant d'une gonarthrose une corrélation positive entre le volume de ce tissu adipeux, la sévérité de l'arthrose radiographique, l'intensité des symptômes douloureux et des troubles fonctionnels de l'articulation

(Ballegaard, C. et al. 2014). Des études récentes réalisées dans notre équipe de recherche ont permis une meilleure caractérisation des profils pro-inflammatoires et pro-cataboliques des tissus adipeux intra-articulaires dans un contexte d'arthrose, en démontrant notamment une sécrétion importante d'IL-6, d'IL-8 et de PGE₂ par le tissu adipeux de Hoffa, le tissu adipeux supra-patellaire et le tissu adipeux de la fosse acétabulaire de la hanche (Eymard, F. et al. 2014 et 2017). Ces tissus adipeux intra-articulaires pourraient jouer un rôle essentiel dans les processus inflammatoires de l'articulation arthrosique et notamment de la membrane synoviale en raison de leur proximité anatomique.

2.5.5 Atteintes des structures péri-articulaires : ménisques, ligaments, tendons et muscles

Des atteintes méniscales se produisent chez près de 63% des individus souffrant d'une gonarthrose symptomatique (Englund, M. et al. 2008). Dans une étude longitudinale, les patients avec des atteintes méniscales significatives ont une probabilité bien plus importante (odd ratio de 7,4) de développer 30 mois plus tard une arthrose fémoro-tibiale visible par radiographie (Englund, M. et al. 2009). Les modifications observées dans les ménisques des patients âgés ou arthrosiques ont des similarités avec les événements qui se déroulent dans le cartilage articulaire, à savoir une dégradation de la matrice, une fibrillation, une transition phénotypique des fibroblastes vers un aspect chondrocytaire, une prolifération cellulaire avec la formation de clusters, une minéralisation et une apoptose cellulaire (Katsuragawa, Y. et al. 2010, Pauli, C. et al. 2011). Il existe d'ailleurs une corrélation significative entre les modifications morphologiques du cartilage articulaire et celles des ménisques issus d'un même patient arthrosique (Pauli, C. et al. 2011). Une augmentation de la vascularisation et de l'innervation sensitive a été décrite dans les ménisques arthrosiques, dont on suppose une implication dans la douleur ressentie par le patient (Ashraf, S. et al. 2011b).

Des atteintes du ligament croisé antérieur sont également régulièrement observées chez les patients arthrosiques. D'après des données d'IRM, 22,8% des patients avec une gonarthrose symptomatique ont une rupture totale du ligament croisé antérieur alors que moins de la moitié d'entre eux a déclaré un antécédent traumatique (Hill, C. L. et al. 2005). La dégénérescence des ligaments est un processus couramment observé au cours des arthroplasties. 78 % des faisceaux postéro-latéraux et 53% des faisceaux antéro-médiaux des ligaments croisés antérieurs présentent des atteintes histologiques sévères (Watanabe, A. et al. 2011). Comme observé au niveau des ménisques, les ligaments et les tendons arthrosiques

présentent une désorganisation de la matrice et notamment des fibres de collagènes (Loeser, R. F. 2010).

Les patients présentant une gonarthrose radiographique ont généralement une faiblesse du muscle quadriceps voire une atrophie, amplifiée lorsque leur arthrose est symptomatique, à cause de leur sédentarité, limitant la mobilisation du muscle (Litwic, A. et al. 2013). Cette faiblesse musculaire est à l'origine d'une instabilité du genou au cours d'une activité physique et par conséquent conduit à une aggravation de l'arthrose.

En conclusion, l'arthrose n'est plus considérée comme une pathologie affectant uniquement le cartilage articulaire. Au cours des dernières décennies, des preuves ont émergé sur le rôle de chacun des tissus de l'articulation dans le développement de la pathologie. Si les atteintes de l'os sous-chondral et de la membrane synoviale ont longtemps été considérées comme des phénomènes tardifs, réactionnels aux lésions cartilagineuses, nous connaissons aujourd'hui le rôle précoce de ces tissus dans la physiopathologie de l'arthrose et la dégradation du cartilage. Les communications mises en place entre le cartilage, l'os sous-chondral et la membrane synoviale constituent la cause majeure du développement de l'arthrose par l'intermédiaire des échanges de facteurs pro-inflammatoires et pro-cataboliques entre les différents tissus. Les remodelages pathologiques de l'ensemble de ces tissus participent également à l'évolution et à l'entretien de l'arthrose.

3. L'unité fonctionnelle cartilage articulaire – os sous-chondral

Le cartilage articulaire et l'os sous-chondral constituent une unité fonctionnelle caractérisée par des interactions mécaniques et biochimiques, impliquées dans la fonction et l'homéostasie de l'articulation (Pan, J. et al. 2009, Lories, R. J. & Luyten, F. P. 2011). Comme discuté précédemment, un changement des propriétés mécaniques ou biochimiques de l'un des tissus peut modifier les propriétés et l'intégrité de l'autre. En conséquence, le remodelage pathologique de l'os sous-chondral (sclérose, œdèmes médullaires, kystes sous-chondraux) contribue au développement d'un environnement défavorable pour l'articulation, aggravant donc la dégradation du cartilage articulaire au cours de l'arthrose (Goldring, M. B. & Goldring, S. R. 2007).

3.1 Mise en évidence des communications entre le cartilage et l'os sous-chondral

La zone du cartilage calcifié constitue une interface de rigidité intermédiaire entre le cartilage et l'os, responsable de la transmission des contraintes mécaniques et de l'ancrage du cartilage à l'os (Mente, P. L. & Lewis, J. L. 1994). Cette couche de cartilage calcifié pourrait jouer un rôle critique dans la pathogenèse de l'arthrose en amplifiant des interactions mécaniques et/ou biochimiques non physiologiques à la jonction ostéochondrale. Grâce aux modèles animaux, il est possible d'étudier les mécanismes impliqués dans de telles interactions.

3.1.1 Interactions mécaniques entre le cartilage et l'os sous-chondral

L'altération des propriétés mécaniques de l'os sous-chondral se répercute sur les capacités d'amortissement de l'articulation et soumet donc le cartilage à un stress mécanique anormal. Une étude a démontré il y a maintenant plus de 30 ans qu'une augmentation de la rigidité de l'os sous-chondral par la pose d'un implant métallique sous la plaque osseuse provoque une accélération du processus de dégradation du cartilage articulaire chez le mouton (Brown, T. D. et al. 1984). Une autre étude a démontré qu'un stress mécanique appliqué pendant 6 semaines sur des articulations de souris engendre un épaissement de la plaque sous-chondrale, associé à l'amincissement du cartilage sus-jacent (Ko, F. C. et al. 2013). Dans un modèle murin présentant une mutation pour le collagène de type I, le développement d'une fragilité osseuse chez ces souris est associé à une dégradation progressive du cartilage (Blair-Levy, J. M. et al. 2008). Au contraire, dans un modèle murin déficient pour ADAMTS-5 (ADAMTS-5^{-/-}), une arthrose expérimentalement induite par déstabilisation de l'articulation engendre un remodelage osseux limité et par conséquent des atteintes cartilagineuses réduites

par rapport aux souris WT arthrosiques (Botter, S. M. et al. 2009). Enfin, un modèle murin haploinsuffisant pour GDF-5 (Gdf5(Bp-J/+)) présente une altération de la densité minérale osseuse et une désorganisation des fibres de collagènes du réseau matriciel. Ces anomalies osseuses sont supposées être impliquées dans le développement d'une instabilité de l'articulation au cours de la marche qui serait responsable de l'apparition d'une arthrose chez ces souris (Daans, M. et al. 2011).

L'inhibition du remodelage osseux dans des modèles animaux d'arthrose par l'administration de composés pharmacologiques, tels que l'alendronate chez le rat (Hayami, T. et al. 2004), l'ostéoprotégérine chez la souris (Kadri, A. et al. 2008) ou la calcitonine chez le lapin (Papaioannou, N. A. et al. 2007) et le chien (El Hajjaji, H. et al. 2004), a démontré son efficacité en réduisant les atteintes cartilagineuses engendrées par une arthrose expérimentalement induite par déstabilisation de l'articulation. L'ensemble de ces études, sélectionnées parmi tant d'autres, confirme bien le lien existant entre le processus de dégradation du cartilage et le remodelage pathologique de l'os sous-chondral dans des modèles animaux d'arthrose traumatique. Chez l'homme, une altération de la structure de l'os sous-chondral a été décrite comme étant associée à la sévérité des lésions du cartilage adjacent (Buckland-Wright, C. 2004, Neogi, T. et al. 2009).

3.1.2 Interactions biochimiques entre le cartilage et l'os sous-chondral

Les premières études relatives à la nutrition du cartilage considéraient que le cartilage calcifié était une barrière imperméable, limitant le transport des molécules entre l'os et le cartilage (Maroudas, A. et al. 1968). Cependant, une étude *in vivo* a démontré grâce à l'IRM la pénétration d'un agent de contraste, le gadopentétate (Gd-DTPA²⁻) administré en intraveineux, dans les couches profondes du cartilage articulaire humain (Bashir, A. et al. 1997). La diffusion des molécules entre l'os et le cartilage a également été confirmée dans un modèle d'explants de cartilages de chevaux par la quantification de la diffusion de solutés fluorescents de petite taille, inférieure à 400 Da, la fluorescéine et la rhodamine B, à travers le cartilage calcifié (Arkill, K. P. & Winlove, C. P. 2008). La perméabilité de ce tissu suggère l'existence d'une voie de communication et de diffusion des nutriments vers les couches profondes du cartilage. De la même façon, l'utilisation de sodium marqué à la fluorescéine a permis de confirmer la diffusion des molécules de l'os vers le cartilage dans des modèles murins *in vivo* et *ex vivo* (Pan, J. et al. 2009). Une autre étude a cette fois-ci montré une augmentation de la conductance hydraulique dans l'os sous-chondral et la plaque osseuse

sous-chondrale au cours de l'arthrose humaine, suggérant l'existence de mouvements de fluides favorisés entre le cartilage et l'os arthrosiques (Hwang, J. et al. 2008). Ces mouvements de fluides pourraient agir comme des signaux mécaniques sur les cellules et stimuler le transport de facteurs diffusibles entre les deux tissus, régulant de ce fait leur communication.

De nombreuses études mettent en avant la présence d'interactions biochimiques à l'état physiologique entre le cartilage et l'os sous-chondral à travers des échanges de molécules solubles, qui permettraient de maintenir l'homéostasie de l'articulation (Lories, R. J. & Luyten, F. P. 2011). En condition pathologique, des cytokines et des facteurs de croissance libérés au cours du remodelage de l'os sous-chondral pourraient atteindre le cartilage articulaire sus-jacent et participer à l'initiation et/ou à la progression de l'arthrose (Lajeunesse, D. & Reboul, P. 2003). Une telle communication a été mise en évidence dans une étude de Guévremont et al., où pour la première fois le facteur de croissance hepatocyte growth factor (HGF) a été identifié par immunohistochimie dans le cartilage et plus particulièrement dans les couches profondes du cartilage arthrosique alors que les chondrocytes n'expriment pas le gène codant le HGF (Guévremont, M. et al. 2003). Ce facteur est en effet produit par les ostéoblastes de la plaque sous-chondrale, dont la synthèse est significativement augmentée au cours de l'arthrose, puis diffuse dans le cartilage. Ce facteur serait impliqué dans l'évolution de l'arthrose en induisant notamment la production de MMP-13 par les chondrocytes articulaires.

Divers systèmes de co-cultures ont permis de démontrer que l'os pourrait agir sur le cartilage à travers la sécrétion de médiateurs. La co-culture de cellules dérivées d'os arthrosique avec des explants de cartilage induit un relargage des glycosaminoglycanes contrairement aux cellules dérivées d'os sain qui ne provoquent aucun effet sur le cartilage (Westacott, C. I. et al. 1997). Ces résultats suggèrent que des médiateurs solubles libérés par les ostéoblastes arthrosiques sont capables d'induire la dégradation du cartilage. Dans un système de co-culture de chondrocytes humains arthrosiques et d'ostéoblastes récupérés à partir d'une zone scléreuse d'os arthrosique, Sanchez et al. ont démontré la capacité de ces ostéoblastes à inhiber l'expression des marqueurs de différenciation SOX9 et COL2A1 par les chondrocytes (Sanchez, C. et al. 2005). Une autre étude a montré que des milieux conditionnés provenant d'ostéoblastes arthrosiques utilisés pour stimuler des chondrocytes augmentent l'expression chondrocytaire de protéases matricielles (MMP-2, MMP-3, MMP-9, ADAMTS-4 et ADAMTS-5) (Prasad, I. et al. 2012), suggérant que des médiateurs

solubles sécrétés par les ostéoblastes arthrosiques favoriseraient l'acquisition d'un phénotype pro-catabolique par les chondrocytes. Dans cette même étude, la stimulation d'ostéoblastes sains par des milieux conditionnés de chondrocytes arthrosiques induit l'expression de MMP-1 et de MMP-2 dans les ostéoblastes, démontrant que la communication établie entre l'os et le cartilage pourrait être bidirectionnelle.

Notre équipe a mis en avant le rôle de la protéine 14-3-3 ϵ , dont la synthèse est augmentée par les ostéoblastes murins soumis à un stress mécanique, dans l'activation d'un phénotype pro-catabolique du chondrocyte articulaire, particulièrement par l'induction de l'expression de MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 et ADAMTS-5 et l'inhibition de celle du collagène de type II et de l'aggrécane (Priam, S. et al. 2013).

Finalement, la modification des communications à travers l'interface entre le cartilage et l'os ainsi que le remodelage des tissus limitant cette interface pourraient affecter l'environnement mécanique et biochimique de l'articulation, favorisant de ce fait la progression de l'arthrose. Ces échanges requièrent des réseaux de facteurs capables de communiquer de l'os vers le cartilage et inversement, en situations physiologiques comme pathologiques. De tels facteurs sont largement inconnus et leur identification constitue un véritable challenge car ils pourraient représenter des cibles thérapeutiques futures et/ou de nouveaux biomarqueurs de l'arthrose.

3.2 Structures impliquées dans la communication biochimique entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire

La diffusion de molécules au niveau de la jonction ostéochondrale est assurée par trois structures différentes: les micro-fissures, les contacts directs entre l'os et le cartilage et les chenaux vasculaires. Elles représentent des voies de passage à travers le cartilage calcifié qui facilitent les communications biochimiques entre les deux tissus (Lajeunesse, D. & Reboul, P. 2003).

3.2.1 Les micro-fissures

Les micro-fissures mesurent entre 2 et 7 μm de large entre la tidemark et la plaque osseuse sous-chondrale (Figure 43). Elles sont présentes dans le cartilage calcifié des personnes âgées et des patients arthrosiques, alors qu'elles ne sont pas décrites chez des individus jeunes et sains (Sokoloff, L. 1993, Mori, S. et al. 1993), suggérant leur développement au cours du vieillissement des articulations et/ou dans un contexte

pathologique. En effet, leur apparition est liée aux contraintes mécaniques excessives subies par l'articulation (Burr, D. B. & Radin, E. L. 2003). Leur présence pourrait faciliter une invasion vasculaire de l'os sous-chondral vers le cartilage mais aussi des échanges directs de médiateurs solubles entre les tissus, participant à leur remodelage au cours du processus arthrosique (Lajeunesse, D. & Rebol, P. 2003).

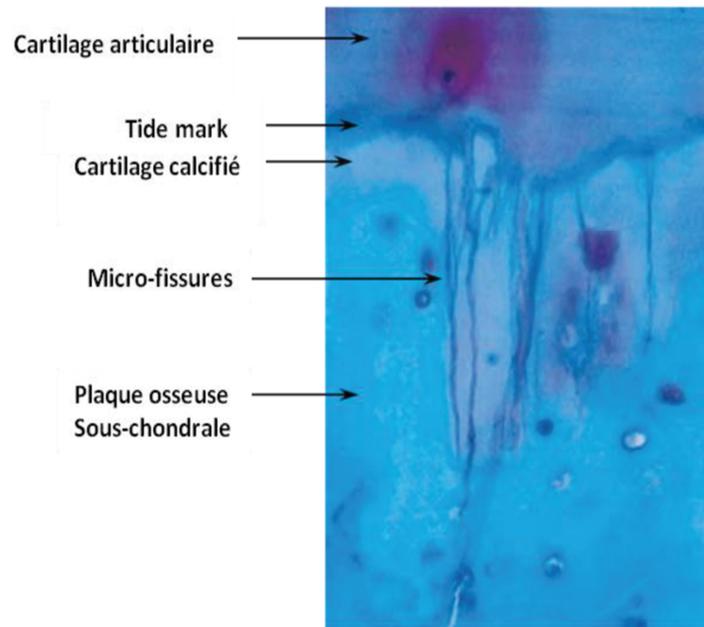


Figure 43: Les micro-fissures à la jonction ostéocondrale.

Coupe histologique de cartilage articulaire au niveau de la jonction ostéocondrale mettant en évidence la présence de micro-fissures traversant le cartilage calcifié jusqu'à atteindre la tidemark. Adapté de Sokoloff, L. (1993).

3.2.2 Les contacts directs

Des contacts directs entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire non calcifié ont été décrits dans un contexte physiologique (Lyons, T. J. et al. 2006). Les auteurs suggèrent l'existence d'une voie de diffusion facilitée des molécules entre l'os, les espaces médullaires et le cartilage hyalin non calcifié, qui pourrait jouer un rôle dans la nutrition et le métabolisme du cartilage. Ces zones de contacts pourraient également intervenir dans la transmission des contraintes mécaniques. Dans un contexte arthrosique où cette jonction ostéocondrale est particulièrement affectée, ces zones de contacts directs entre les tissus cartilagineux et osseux pourraient constituer des voies privilégiées de communications et d'échanges de médiateurs impliqués dans l'altération de ces tissus.

3.2.3 Les chenaux vasculaires

Trueta, J. & Harrison, M. H. M. (1953) ont décrit la présence de chenaux vasculaires provenant de l'os sous-chondral en contact avec la couche profonde du cartilage calcifié de têtes fémorale humaines saines. Clark, J. M. (1990) a mis en avant la structure histologique de la plaque sous-chondrale et des chenaux vasculaires, mesurant entre 10 et 30 μm de diamètre, à la jonction ostéocondrale de cartilages humains, de lapins et de chiens (Clark, J. M. 1990, Clark, J. M. & Huber, J. D. 1990). Des échanges de flux à travers ces chenaux vasculaires ont été montrés par des études *ex vivo* entre la cavité médullaire et la surface cartilagineuse de disques intervertébraux (Ayotte, D. C. et al. 2001). Il a été suggéré que ces chenaux vasculaires assureraient les apports nutritifs de l'os vers le cartilage articulaire (Clark, J. M. 1990, Malinin, T. & Ouellette, E. A. 2000). Une étude a montré que plus de 50% du glucose, de l'oxygène et des besoins en eau du cartilage étaient fournis par la vascularisation ostéocondrale (Imhof, H. et al. 2000). Lane et al. ont montré que les structures vasculaires se concentraient dans les zones de fortes contraintes mécaniques, démontrant une nouvelle fois le rôle du stress mécanique dans l'augmentation des communications pathologiques entre l'os et le cartilage (Lane, L. B. et al. 1977). Cette étude a également démontré une augmentation de la vascularisation ostéocondrale après l'âge de 70 ans, suggérant son rôle dans l'accroissement de la prévalence de l'arthrose avec l'âge. Harrison et al. ont décrit une augmentation de la vascularité dans les têtes fémorale de sujets arthrosiques (Harrison, M. H. M. et al. 1953).

Divers types cellulaires mononucléés et polynucléés sont présents dans les chenaux vasculaires, exprimant la vimentine, la MMP-1, MMP-3, MMP-13, BMP-2 et BMP-4 (Shibakawa, A. et al. 2005). Le marquage positif pour la vimentine traduit la présence de cellules d'origine mésenchymateuse, probablement des précurseurs d'ostéoblastes. Des ostéoclastes positifs pour un marquage TRAP sont également présents dans les chenaux vasculaires. Ils participent au remodelage des matrices de l'os et du cartilage et par conséquent à la progression des chenaux vasculaires dans le cartilage. Enfin, des terminaisons nerveuses et des cellules adipeuses sont mises en évidence dans ces structures (Figure 44).

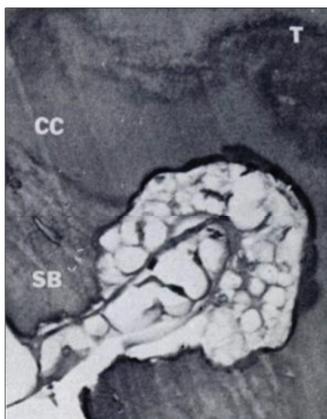


Figure 44: Un chenal vasculaire à la jonction ostéocondrale.

Photographie d'un chenal vasculaire provenant de l'os sous-chondral (SB) qui pénètre dans le cartilage calcifié (CC), en direction de la tidemark (T). Tiré des travaux de Lane, L. B. et al. (1977).

3.3 L'angiogenèse ostéocondrale au cours de l'arthrose

3.3.1 Implication de l'angiogenèse ostéocondrale dans la progression de l'arthrose humaine

Le cartilage calcifié est dans un état « activé » au cours de l'arthrose, par l'augmentation de son épaisseur suite à la formation de nouvelles zones calcifiées, par la duplication de la tidemark et par l'invasion vasculaire en direction et au travers de la tidemark (Oegema, T. et al. 1997, Dequeker, J. et al. 1997). Lorsque les chenaux vasculaires dépassent la tidemark et envahissent le cartilage articulaire, la vascularisation ostéocondrale devient pathologique et participe aux processus de dégradation de la matrice cartilagineuse (Walsh, D. A. & Pearson, C. I. 2001). Des études ont montré que la perte de la résistance à l'invasion vasculaire du cartilage était associée à une perte des protéoglycanes autour des chenaux vasculaires pénétrant le cartilage articulaire arthrosique (Figure 45) (Fenwick, S. A. et al. 1999, Smith, J. O. et al. 2003, Shibakawa, A. et al. 2005). Fenwick et al. ont décrit la perte de la propriété avasculaire du cartilage arthrosique dans un modèle *in vivo* de membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (Fenwick, S. A. et al. 1999). Cette expérience a été reproduite par Smith et al. qui ont montré que près de 57% des prélèvements de cartilages arthrosiques étaient envahis par les vaisseaux issus de la membrane chorioallantoïdienne (Smith, J. O. et al. 2003). A l'inverse, aucun prélèvement de cartilages sains n'a été envahi par des vaisseaux sanguins, ce qui indique que la modification des propriétés anti-angiogéniques représente une différence fondamentale entre les cartilages sains et arthrosiques. Shibakawa et al. ont montré que la

densité de ces chenaux vasculaires traversant la tidemark était positivement corrélée à la sévérité de l'arthrose, évaluée par le score modifié de Mankin (Shibakawa, A. et al. 2005).

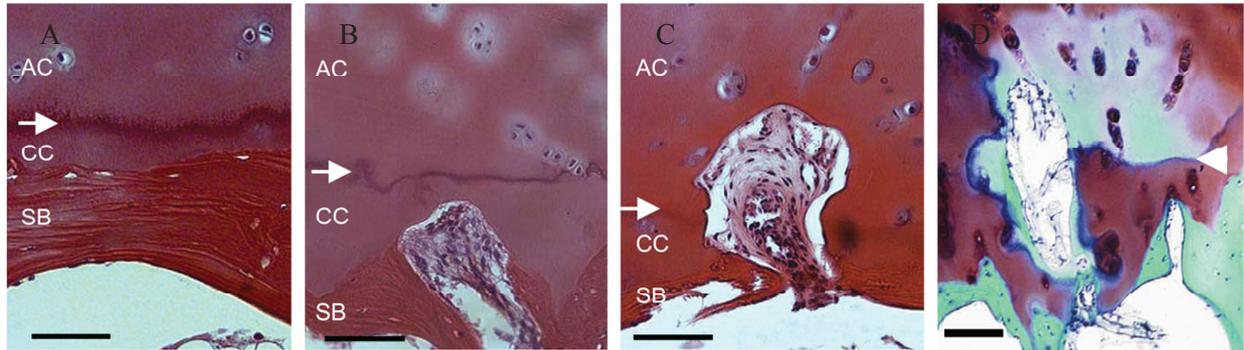


Figure 45: Coupes histologiques de cartilages sains et arthrosiques à la jonction ostéocondrale.

(A et B) Jonction ostéocondrale en condition physiologique, où les chenaux vasculaires restent limités dans le cartilage calcifié, sans atteindre la tidemark. (C) Visualisation d'un chenal vasculaire qui traverse la tidemark et pénètre le cartilage artériel arthrosique. L'invasion vasculaire du cartilage est associée à un score de Mankin élevé et (D) à une dégradation des protéoglycanes à proximité des chenaux vasculaires. D'après Shibakawa, A. et al. (2005).

Walsh et al. ont constaté que 60% des patients arthrosiques avaient une vascularisation ostéocondrale atteignant la tidemark contre 20% chez des individus contrôles sans pathologie articulaire évidente post-mortem (Walsh, D. A. et al. 2007). Cette étude a démontré qu'une augmentation de la densité des vaisseaux à la jonction ostéocondrale s'accompagnait d'une augmentation de la sévérité des atteintes du cartilage et du score clinique de la pathologie (Figure 46). En revanche, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les processus d'angiogenèse à la jonction ostéocondrale et dans la membrane synoviale, cette dernière étant associée à l'inflammation synoviale. Il s'agit de deux mécanismes indépendants au cours de l'arthrose, qui affecteraient différemment l'articulation.

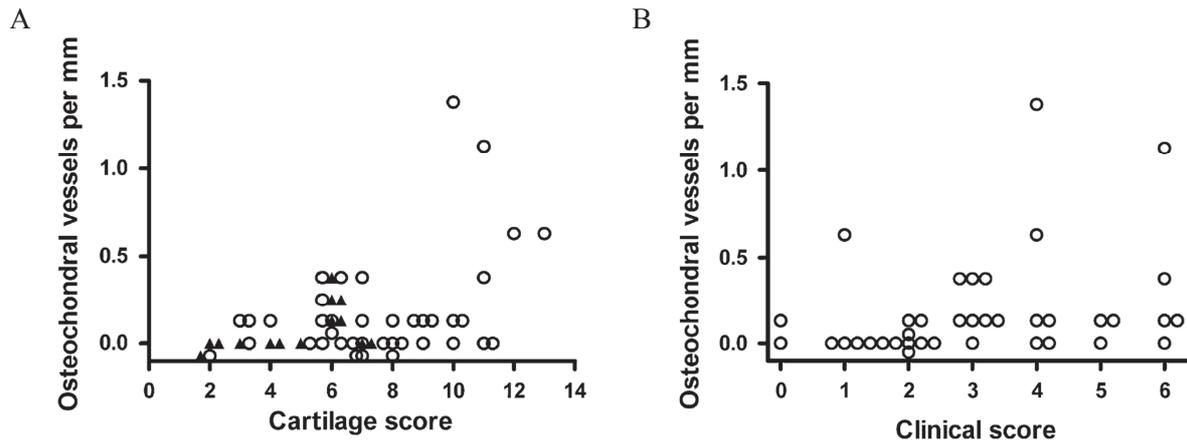


Figure 46: Corrélation entre la vascularisation ostéocondrale et la sévérité de l'arthrose.

(A) La densité de chenaux vasculaires à la jonction ostéocondrale augmente avec les atteintes histologiques du cartilage ($r=0,26$, $p=0,049$). (B) La densité de chenaux vasculaires à la jonction ostéocondrale augmente avec le score clinique de l'arthrose ($r=0,41$, $p=0,009$), caractérisé par 6 paramètres évalués avant l'arthroplastie du genou : une sensibilité de l'articulation à la palpation, des raideurs matinales, des raideurs d'inactivité, un épanchement synovial, une température élevée, un gonflement des tissus mous entourant la capsule articulaire. Les cercles (○) représentent les données des patients arthrosiques et les triangles (▲) des patients contrôles post-mortem.

De manière intéressante, nous avons pu constater visuellement cette corrélation entre la vascularisation ostéocondrale et la dégradation du cartilage au cours de la dissection de prélèvements issus de patients opérés pour une arthroplastie totale de genou dans le service de chirurgie orthopédique de l'hôpital Saint-Antoine (Figure 47). Le cartilage articulaire du condyle fémoral totalement dégradé (photo de gauche), se situe en regard d'une zone de vascularisation ostéocondrale développée (photo de droite). Cette augmentation de l'angiogenèse à la jonction ostéocondrale chez les patients arthrosiques conduit à penser que le passage de médiateurs solubles pourrait être amplifié et participer aux processus cataboliques et inflammatoires du cartilage et de l'os.

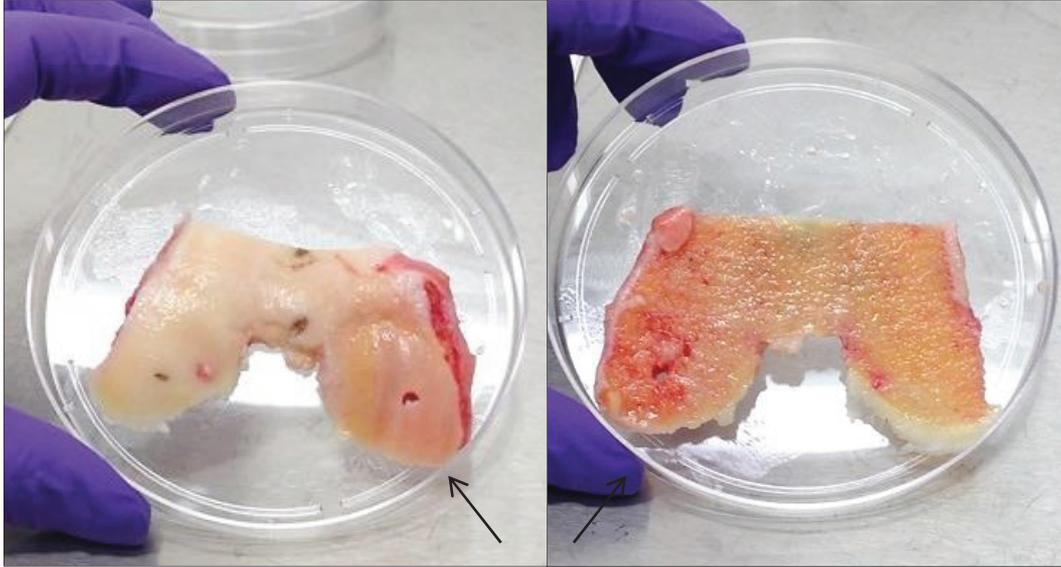


Figure 47: Lien entre la vascularisation ostéocondrale et la dégradation du cartilage sus-jacent.

Photographies des condyles fémoraux issus d'un patient arthrosique, opéré pour une arthroplastie totale de genou. Surfaces articulaires cartilagineuses visualisées à gauche et os sous-jacent à droite (collection personnelle).

Récemment, le niveau d'expression de diverses cytokines a été évalué dans le cartilage humain arthrosique à l'aide de puces *cytokine antibody arrays* et *angiogenesis PCR array* (Zhang, X. et al. 2016a et 2016b). De nombreuses cytokines liées à la fonction d'angiogenèse: des facteurs pro-angiogéniques (VEGFA, PDGF-AA, TGF- α ...), des récepteurs associés (VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α , NGF-R...), des interleukines (IL-1 β , IL-6, TNF- α ...), chimiokines (IP-10, SDF-1 β ...), molécules d'adhérence (PECAM-1, VE-cadherin...) et des MMP (MMP-9, MMP-13), ont été détectés comme significativement augmentés dans les cartilages humains à un stade avancé d'arthrose. A l'inverse, des molécules anti-angiogéniques telles que la chondromoduline I, les thrombospondines 1 et 2, l'angiopoïétine-like 4 et les TIMP1 et 2 voient leur expression significativement diminuée. Ces études nous démontrent que la transition du cartilage vers un phénotype arthrosique s'accompagne d'un passage d'un environnement hautement anti-angiogénique à un environnement pro-angiogénique.

Le VEGF est le facteur pro-angiogénique le plus connu et le plus étudié, impliqué dans l'angiogenèse de nombreux tissus et notamment dans le cartilage de la plaque de croissance. Les principaux facteurs qui induisent l'expression du VEGF dans les chondrocytes en culture sont l'hypoxie (HIF-1), le stress mécanique, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-17, TNF- α ...) et le stress oxydant (Murata, M. et al. 2008), qui activent des voies de signalisation responsables d'une angiogenèse, de la formation d'ostéophytes et de la dégradation de la matrice extracellulaire (Figure 48).

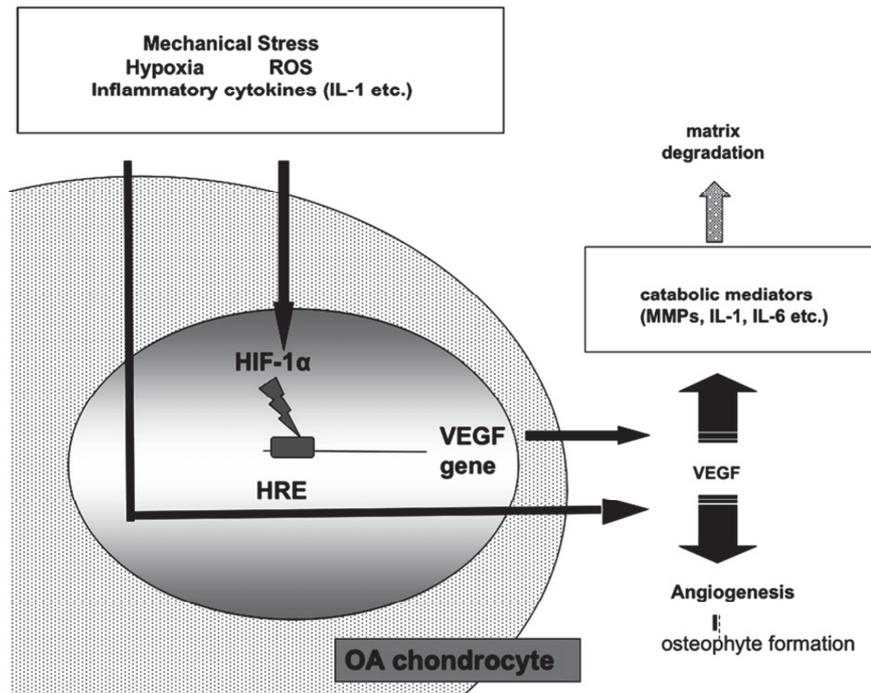


Figure 48: Potentiel rôle physiopathologique du VEGF au cours de l'arthrose.

L'expression du VEGF pourrait être induite dans les chondrocytes en réponse à diverses molécules pro-cataboliques (cytokines pro-inflammatoires, ROS) et conditions pathologiques (stress mécanique, hypoxie). En retour, le VEGF pourrait affecter ces chondrocytes en induisant une dégradation de la matrice par la stimulation de médiateurs cataboliques et une angiogenèse, responsable notamment de la formation d'ostéophytes. D'après Murara, M. et al. (2008).

Ce facteur a été mis en évidence dans le cartilage sain et arthrosique, produit principalement sous trois isoformes (VEGF₁₂₁ (soluble), VEGF₁₆₅ (soluble) et VEGF₁₈₉ (matricielle). En revanche, l'expression des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et du co-récepteur neuropiline 1 (NRP-1) est exclusivement retrouvée dans les cartilages arthrosiques (Pufe, T. et al. 2001, Pfander, D. et al. 2001, Enomoto, H. et al. 2003). Le nombre de chondrocytes exprimant le VEGF a été décrit comme significativement augmenté dans les stades tardifs de l'arthrose (Pfander, D. et al. 2001). Il a d'ailleurs été montré que les explants

de cartilages arthrosiques sécrétaient significativement plus de VEGF qu'un cartilage sain et que la présence de ce facteur dans le cartilage arthrosique était positivement corrélée à la sévérité de la pathologie (Enomoto, H. et al. 2003). Les auteurs ont constaté que la stimulation de chondrocytes arthrosiques par du VEGF induisait l'expression de MMP-1 et MMP-3, suggérant un potentiel rôle catabolique du VEGF dans le cartilage arthrosique. Une seconde étude a montré que le VEGF avait la capacité de modifier la balance entre les MMP et TIMP dans les chondrocytes en favorisant la sécrétion de MMP-1, MMP-3 et particulièrement MMP-13 et en inhibant l'expression de TIMP-1 et TIMP-2, favorisant la dégradation de la matrice du cartilage (Pufe, T. et al. 2004b). Toutefois, les chondrocytes exprimant le VEGF sont majoritairement localisés dans les couches les plus superficielles du cartilage articulaire arthrosique, à distance de la jonction ostéochondrale, suggérant l'existence d'autres facteurs pro-angiogéniques impliqués dans l'invasion vasculaire de la jonction ostéochondrale (Pufe, T. et al. 2001).

Parallèlement au VEGF, Pfander et al. ont démontré dans le cartilage arthrosique une diminution de l'expression de la TSP-1, constituant un important facteur anti-angiogénique du cartilage (Pfander, D. et al. 2000). Ils ont ainsi suggéré qu'un déséquilibre entre la production de facteurs pro- et anti-angiogéniques pourrait participer à une angiogenèse ostéochondrale et promouvoir la progression du processus arthrosique par la formation d'ostéophytes et l'avancement du front de minéralisation dans le cartilage articulaire.

Les vaisseaux sanguins qui occupent les chenaux vasculaires sont accompagnés par des prolongements de nerfs sympathiques et sensoriels (Suri, S. et al. 2007). Il a été observé que les fibres nerveuses sensorielles exprimaient le facteur de croissance nerve growth factor (NGF), suggérant un lien entre l'angiogenèse ostéochondrale et la douleur au cours de l'arthrose (Walsh, D. A. et al. 2010). De plus, l'inflammation locale a été décrite comme un facteur de sensibilisation des nerfs de la jonction ostéochondrale (Bonnet, C. S. & Walsh, D. A. 2005). De ce fait, l'angiogenèse, l'innervation et l'inflammation constituent une boucle d'amplification à l'origine des atteintes des tissus articulaires et du symptôme douloureux chez les patients arthrosiques (Figure 49).

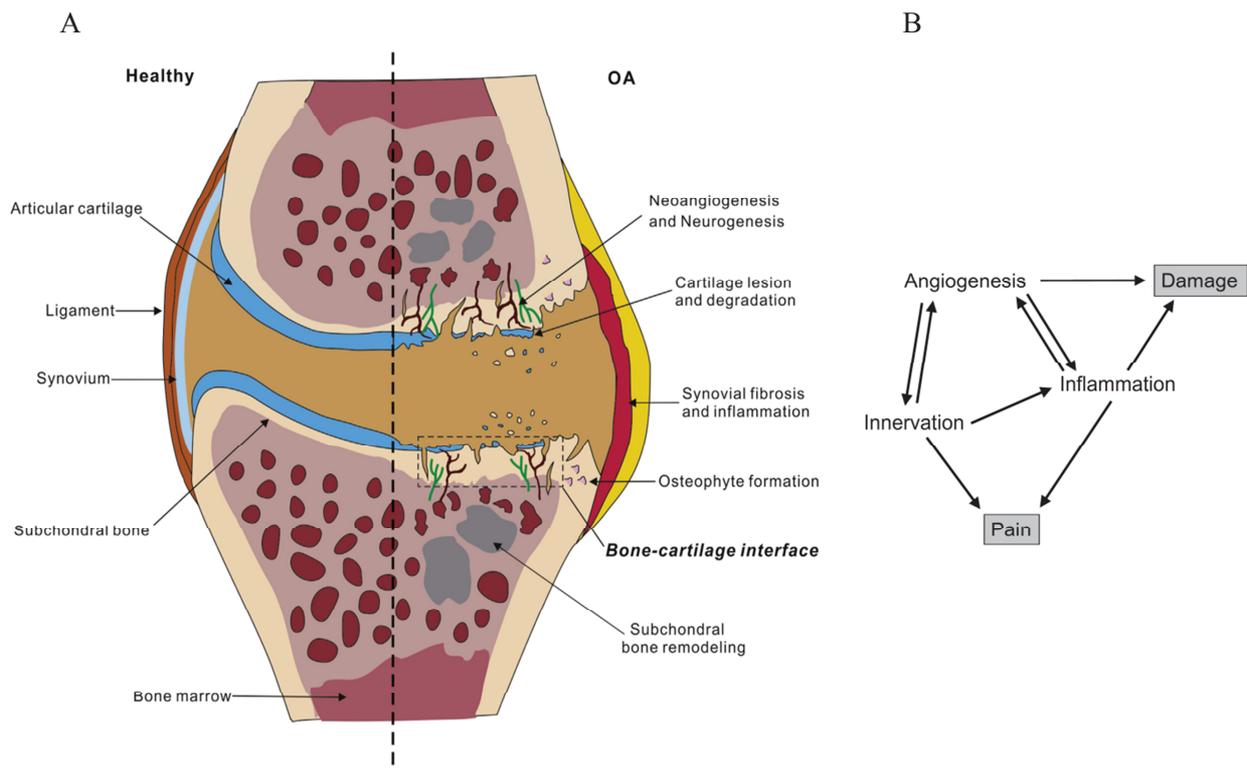


Figure 49: Rôles de l'angiogenèse et de l'innervation à la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose.

(A) Schéma représentatif des différences entre les articulations saines et arthrosiques. L'arthrose est considérée comme une pathologie de l'ensemble des tissus de l'articulation. L'interface entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral est au centre de la fonction articulaire et des mécanismes physiopathologiques développés au cours de l'arthrose. D'après Yuan, X. L. et al. (2014). (B) Schéma représentatif des relations entre l'inflammation, la plasticité neuro-vasculaire et les symptômes de l'arthrose. L'inflammation peut stimuler l'angiogenèse et l'angiogenèse peut en retour faciliter l'inflammation. Ces deux processus peuvent contribuer aux atteintes de l'articulation à travers la dégradation du cartilage et la formation d'ostéophytes. L'angiogenèse peut également être accompagnée d'une innervation du cartilage articulaire, pouvant constituer une source de douleur importante. La sensibilisation des nerfs sensoriels par les médiateurs pro-inflammatoires contribue aussi au syndrome douloureux. Les nerfs sensibilisés peuvent entraîner une inflammation neurogénique et initier une nouvelle vascularisation. D'après Bonnet, C. S. & Walsh, D. A. (2005).

En définitive, la vascularisation du cartilage articulaire pourrait contribuer à la dégradation du cartilage et à sa minéralisation en favorisant l'apport de molécules pro-cataboliques et pro-inflammatoires produites par l'os sous-chondral arthrosique. Des thérapies ciblant l'angiogenèse pourraient ainsi réduire les symptômes et la sévérité de l'arthrose. Une meilleure compréhension des mécanismes de l'angiogenèse ostéochondrale semble donc nécessaire pour développer des moyens thérapeutiques ciblés.

3.3.2 Etude de l'implication de l'angiogenèse ostéochondrale dans des modèles animaux d'arthrose

Il est supposé qu'une dérégulation précoce de la vascularisation ostéochondrale au cours de l'arthrose conduite à des atteintes secondaires du cartilage articulaire (Imhof, H. et al. 1997). Il est toutefois difficile de valider cette hypothèse chez les patients car les échantillons d'articulations présentant une arthrose précoce sont rarement disponibles puisque les patients sont pris en charge et opérés à des stades tardifs de la pathologie. Nous avons donc recours à des modèles animaux d'arthrose afin d'étudier le mécanisme d'angiogenèse ostéochondrale et son implication dans l'évolution de la pathologie.

Deux modèles conduisant à une arthrose, au cours du vieillissement ou expérimentalement induite par chirurgie (modèle de déstabilisation du ménisque médial, DMM), ont permis d'étudier la mise en place d'une angiogenèse ostéochondrale entre l'os et le cartilage (Pan, J. et al. 2012). Dans cette étude, une augmentation du nombre de chenaux vasculaires dans le cartilage calcifié, en direction de la tidemark a été décrite au cours du vieillissement des souris (+100%) et dans le modèle DMM (+50%) par comparaison aux souris contrôles. Ces voies de communication de l'ordre de 10 μ m chez la souris sont supposées faciliter le transport de larges molécules de signalisation.

Un modèle de transection du ménisque médial chez le rat (MNX) (Mapp, P. I. et al. 2008) présente une angiogenèse ostéochondrale et synoviale comparable aux observations réalisées dans l'articulation humaine arthrosique (Walsh, D. A. et al. 2007). Cette vascularisation du cartilage articulaire et de la membrane synoviale se produit précocement au cours du processus arthrosique dans ce modèle, suggérant un rôle essentiel de l'angiogenèse dans la pathogenèse de l'arthrose en promouvant la perte de l'intégrité du cartilage articulaire, la formation d'ostéophytes et la synovite. Ce modèle de transection du ménisque médial a une étiologie similaire à l'arthrose post-traumatique chez l'Homme.

Saito et al. ont mis en avant une activité angiogénique élevée de l'os sous-chondral dans les phases précoces et évolutives de l'arthrose, à l'origine d'une invasion vasculaire de la jonction ostéochondrale dans un modèle de transection du ligament croisé antérieur chez le lapin. Dans ce modèle, l'invasion vasculaire du cartilage est donc une caractéristique précoce de l'arthrose et contribue à sa progression (Saito, M. et al. 2012).

Hayami et al. ont évalué l'expression de la chondromoduline I, un facteur angiostatique essentiel dans le cartilage, dans un modèle de rats arthrosiques. Ils ont observé une diminution de l'expression de la ChM-I dans la zone superficielle du cartilage articulaire dans les stades précoces d'arthrose (Hayami, T. et al. 2003). Aux stades plus tardifs de la pathologie, l'expression de la ChM-I est diminuée dans l'ensemble du cartilage articulaire, associée à un nombre plus important de chondrocytes exprimant le VEGF. Une invasion vasculaire a été constatée dans les zones du cartilage exprimant fortement des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et où l'expression de la ChM-I a été significativement réduite. Les auteurs suggèrent que l'incapacité des chondrocytes des couches profondes à exprimer des facteurs anti-angiogéniques pourrait promouvoir une invasion vasculaire du cartilage articulaire au cours de l'arthrose.

3.3.3 Stratégies thérapeutiques ciblant l'angiogenèse dans des modèles animaux d'arthrose

Le tableau 2 synthétise les études qui ont évalué les effets d'un traitement ciblant le VEGF ou des inhibiteurs de l'angiogenèse dans des modèles animaux d'arthrose (OA), dans des modèles présentant des atteintes ostéochondrales (OCD) ou des atteintes du cartilage uniquement (CD) et enfin dans des modèles de polyarthrite rhumatoïde (RA) (Hamilton, J. L. et al. 2016). Nous discuterons ci-dessous des études réalisées dans les modèles animaux d'arthrose (OA).

3.3.3.1 Inhibiteurs du VEGF

Nagai et al. ont montré qu'un traitement précoce avec le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, réduisait significativement la dégradation du cartilage articulaire, la formation d'ostéophytes, la synovite et la douleur dans un modèle de lapins arthrosiques (Nagai, T. et al. 2014). En réponse au bevacizumab, l'expression génique de facteurs pro-cataboliques (MMP-13, ADAMTS-5) était significativement réduite dans la synoviale alors que les niveaux d'expression de l'aggrécane, du collagène de type II et de la chondromoduline I étaient augmentés dans le cartilage articulaire des lapins traités. Deux modalités

d'administration ont été testées dans ce modèle. Une administration systémique en intraveineuse et une administration locale en intra-articulaire. Le traitement administré en intra-articulaire a démontré des effets similaires à ceux obtenus avec l'administration systémique mais présentait l'avantage de réduire plus efficacement la douleur avec une dose diminuée de moitié et de s'affranchir des effets secondaires (hémorragies, défauts de cicatrisation, hypertension, protéinurie, thromboembolisme) (Hurwitz, H. et al. 2004).

L'injection en intra-articulaire de cellules souches musculaires exprimant le récepteur soluble du VEGFR-1 (sFlt-1), permettant de piéger le VEGF, a permis de réduire la progression de l'arthrose dans un modèle de rats arthrosiques (Matsumoto, T. et al. 2009).

Plus récemment, l'inhibition du VEGF par un lentivirus (VEGF small hairpin RNA, shRNA) administré en intra-articulaire retarde la progression de l'arthrose dans un modèle de rats arthrosiques (Zhang, X. et al. 2016b). A l'inverse, l'injection intra-articulaire de VEGF recombinant murin dans l'articulation du genou induit une arthrose chez la souris, caractérisée par une hyperplasie synoviale, une augmentation de la calcification et de la dégradation du cartilage articulaire et une sclérose de l'os sous-chondral (Ludin, A. et al. 2013).

Treatment	Model	Results	Ref.
VEGF inhibitor	OCD/CD	↑ Cartilage repair	(133)
	OA	↓ OA progression and pain	(52)
	RA	↓ Disease severity	(89,137-139,141-143)
VEGFR inhibitor PPI-2458	RA	↓ Disease severity	(90,138,144,145)
	OA	↓ OA progression and pain	(149)
TNP-470	RA	↓ Disease severity	(150,151)
	RA	↓ Disease severity	(152)
TSP-1	OCD/CD	↑ Cartilage repair	(157)
	OA	↓ OA progression	(158)
	RA	↓ Disease severity	(159,160)
Chm-1	OCD/CD	↑ Cartilage repair	(129)
Endostatin	RA	↓ Disease severity	(168-173,188)
Angiostatin	RA	↓ Disease severity	(178)
K1-5	RA	↓ Disease severity	(179)
ExTek	RA	↓ Disease severity	(180)
Suramin	OCD/CD	↑ Cartilage repair	(186)

Chm-1 = chondromodulin-1; CD = chondral defect; ExTek = soluble Tie-2 extracellular domain; K1-5 = protease-activated kringle 1-5; OA = osteoarthritis; OCD = osteochondral defect; RA = rheumatoid arthritis; VEGF = vascular endothelial growth factor; VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor.

Tableau 2: Synthèse des études publiées sur les effets des traitements ciblant l'angiogenèse dans des modèles animaux de pathologies ostéo-articulaires.

Ces études ont été réalisées dans des modèles animaux d'arthrose (OA), de polyarthrite rhumatoïde (RA) ou des modèles d'atteintes ostéochondrales (OCD) ou chondrales (CD). D'après Hamilton, J. L. et al. (2016).

3.3.3.2 Inhibiteur de MMP

L'utilisation d'un inhibiteur de MMP (M503902) dans un modèle de rats arthrosiques a démontré une diminution de l'angiogenèse ostéochondrale, accompagnée d'une diminution des lésions cartilagineuses et de la douleur (Mapp, P. I. et al. 2010).

3.3.3.3 Analogues de la fumagilline

La fumagilline est une substance produite par la fermentation d'*Aspergillus fumigatus*, utilisée comme anti-parasitaire. Cette molécule présente la capacité d'inhiber la traduction des protéines en ciblant la méthionine aminopeptidase de type 2 (MetAP-2). Les molécules PPI-2458 et TNP-470 sont des analogues de la fumagilline capables d'inhiber l'angiogenèse en bloquant la prolifération et le cycle cellulaire des cellules endothéliales (Kruger, E. A. & Figg, W. D. 2000). Dans un modèle de transection méniscale chez le rat, l'administration orale de PPI-2458 diminue l'angiogenèse et l'inflammation synoviale, la vascularisation du cartilage articulaire, les atteintes articulaires, la formation d'ostéophytes et la douleur (Ashraf, S. et al. 2011a). Cette étude démontre que l'inhibition de l'angiogenèse peut limiter à elle seule la progression de l'arthrose et la douleur.

3.3.3.4 Molécules angiostatiques

La thrombospondine 1 (TSP-1) est une glycoprotéine abondamment présente dans le cartilage articulaire. Elle inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et favorise leur apoptose (Bornstein, P. 2009). Le niveau d'expression de la TSP-1 est significativement diminué dans le cartilage à un stade sévère d'arthrose (Pfander, D. et al. 2000). La TSP-1 est capable d'inhiber la signalisation induite par le VEGF en se liant directement au VEGF mais aussi indirectement en bloquant la voie de signalisation du VEGFR-2 via son récepteur CD47 (Gupta, K. et al. 1999, Kaur, S. et al. 2010). Dans un modèle de rats arthrosiques, l'injection intra-articulaire d'un adénovirus codant la TSP-1 murine (adTSP-1) conduit à une diminution de la dégradation du cartilage, de la formation d'ostéophytes et de la vascularisation et de l'inflammation de la membrane synoviale (Hsieh, J. L. et al. 2010).

La chondromoduline I (ChM-I) est une glycoprotéine également présente dans le cartilage articulaire qui inhibe l'angiogenèse (Shukunami, C. et al. 1999). Dans un modèle de rats arthrosiques, une injection intra-articulaire de lentivirus codant la ChM-I (LV-ChM-1) retarde la progression de l'arthrose (Zhang, X. et al. 2016a).

L'endostatine est un fragment de la partie C-terminale du collagène de type XVIII (O'Reilly, M. S. et al. 1997). Il agit comme un inhibiteur de l'angiogenèse en ciblant notamment la voie de signalisation du VEGF. Il a été suggéré que l'endostatine pourrait jouer un rôle protecteur sur le cartilage articulaire arthrosique en bloquant le VEGF et l'invasion vasculaire (Pufe, T. et al. 2005). Néanmoins, aucune étude *in vivo* n'a rapporté les effets de l'endostatine sur l'évolution d'une arthrose.

3.3.3.5 Inhibition de la voie du TGF- β

De hauts niveaux de TGF- β 1 conduisent à un recrutement massif de cellules souches mésenchymateuses et à la formation d'ilôts ostéoïdes à l'origine d'une sclérose osseuse au cours de l'arthrose (Zhen, G. et al. 2013). Lors d'une inhibition de la signalisation du TGF- β 1 chez des souris KO pour le récepteur TGF- β de type II (TGF β RII), la progression de l'arthrose, chirurgicalement induite, est atténuée. L'inhibition pharmacologique du TGF- β 1 a également démontré une diminution de l'angiogenèse dans l'os sous-chondral de souris arthrosiques.

Cui et al. ont démontré que l'halofuginone était capable d'atténuer la dégradation du cartilage articulaire et les atteintes de l'os sous-chondral. L'halofuginone est un composé extrait d'une plante médicinale chinoise initialement utilisée pour le traitement des fièvres malariennes (Jiang, S. et al. 2005) mais également pour les pathologies fibrotiques, en inhibant la voie de signalisation du TGF- β , induisant la synthèse de collagène de type I (Gnainsky, Y. et al. 2007). L'halofuginone réduit la perte des protéoglycanes et la calcification du cartilage articulaire chez des rats arthrosiques, en inhibant notamment l'expression du collagène de type X, de la MMP-13 et d'ADAMTS-5. L'halofuginone stimule en revanche l'expression de la lubricine, du collagène de type II et de l'aggrécane. Cette molécule atténue également la progression de l'arthrose en inhibant l'activité excessive du TGF- β dans l'os sous-chondral et en stoppant l'angiogenèse pathologique assurée par les « vaisseaux de type H », un sous-type spécifique de vaisseaux qui se définit par un marquage CD31 et endomucine. Ces vaisseaux ont été identifiés comme responsables du couplage entre l'angiogenèse et l'ostéogenèse (Kusumbe, A. P. et al. 2014). Ainsi, cette étude a démontré l'intérêt de cibler les remodelages pathologiques de l'os sous-chondral à un stade précoce d'arthrose afin de prévenir les effets néfastes sur le cartilage articulaire.

Finalement, l'ensemble de ces études mettant en place une stratégie thérapeutique contre l'angiogenèse démontre un effet bénéfique dans ces modèles animaux d'arthrose, traduit par

la diminution des atteintes des tissus articulaires et l'amélioration des symptômes douloureux. Ces études mettent en avant l'existence d'une fenêtre d'action étroite pour l'administration d'un traitement anti-angiogénique car il s'agirait d'un processus intervenant précocement dans la physiopathologie de l'arthrose.

3.3.4 Mécanismes inducteurs de l'angiogenèse ostéocondrale au cours de l'arthrose humaine

Hormis l'implication du stress mécanique (Lane, L. B. et al. 1977, Murata, M. et al. 2008), les mécanismes sous-jacents à l'angiogenèse ostéocondrale dans l'arthrose sont encore peu connus. L'implication de la différenciation hypertrophique des chondrocytes a été suggérée par analogie aux événements observés dans la plaque de croissance, puisqu'il a été décrit que le mécanisme de duplication de la tidemark au cours de l'arthrose résulterait de la réactivation de l'ossification endochondrale, combinée à la différenciation hypertrophique des chondrocytes et à la minéralisation de la matrice cartilagineuse (Goldring, M. B. & Goldring, S. R. 2007, Dreier, R. 2010, Pesesse, L. et al. 2011). En effet, le changement phénotypique des chondrocytes en chondrocytes hypertrophiques conduit à la production d'enzymes protéolytiques responsables de la dégradation et de la minéralisation du cartilage, favorisant la vascularisation de la matrice extracellulaire. Les chondrocytes hypertrophiques arthrosiques pourraient, de façon similaire aux processus se déroulant dans la plaque de croissance, sécréter des facteurs capables de promouvoir l'angiogenèse ostéocondrale.

Une étude récente a recherché le lien entre le phénotype hypertrophique des chondrocytes présents dans le cartilage arthrosique et l'angiogenèse ostéocondrale (Pesesse, L. et al. 2013). Ils ont cherché particulièrement à démontrer le potentiel des chondrocytes hypertrophiques arthrosiques à exprimer un phénotype qui promouvrait l'angiogenèse par l'expression de facteurs contrôlant les étapes de migration, de prolifération et/ou d'adhérence des cellules endothéliales. Dans ce but, ils ont étudié l'effet de milieux conditionnés de chondrocytes humains hypertrophiques arthrosiques sur des cellules endothéliales (HUVEC) grâce à des tests fonctionnels. Ils ont ainsi montré une stimulation de la migration, de la prolifération et de l'adhérence des cellules endothéliales en présence des milieux conditionnés des chondrocytes hypertrophiques arthrosiques. Les auteurs ont mis en évidence une sur-expression de facteurs pro-angiogéniques par les chondrocytes hypertrophiques, tels que la bone sialoprotein (BSP), sur-exprimée d'environ 111 fois par rapport aux chondrocytes arthrosiques non hypertrophiques, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'angiopoïétine 1 (x6), de MMP-2 (x5) et du NGF (x3). En condition physiologique, la BSP

est exprimée par les ostéoblastes matures, les ostéoclastes et les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance. Une autre étude réalisée par la même équipe a montré que la présence de chondrocytes immunomarqués pour la BSP dans le cartilage arthrosique était associée à la sévérité des lésions histologiques du cartilage et à la densité vasculaire à la jonction ostéocondrale (Pesesse, L. et al. 2014). Ces deux études supportent donc que la différenciation hypertrophique des chondrocytes pourrait promouvoir l'angiogenèse au cours de l'arthrose par la sécrétion de molécules pro-angiogéniques, telles que la BSP.

L'état hypertrophique des chondrocytes a été clairement identifié dans la physiopathologie de l'arthrose (Van der Kraan, P. M. & Van den Berg W. B. 2012), discutée précédemment dans ce manuscrit. Néanmoins, une vision plus globale du rôle du chondrocyte hypertrophique à la jonction ostéocondrale est proposée dans la figure 50.

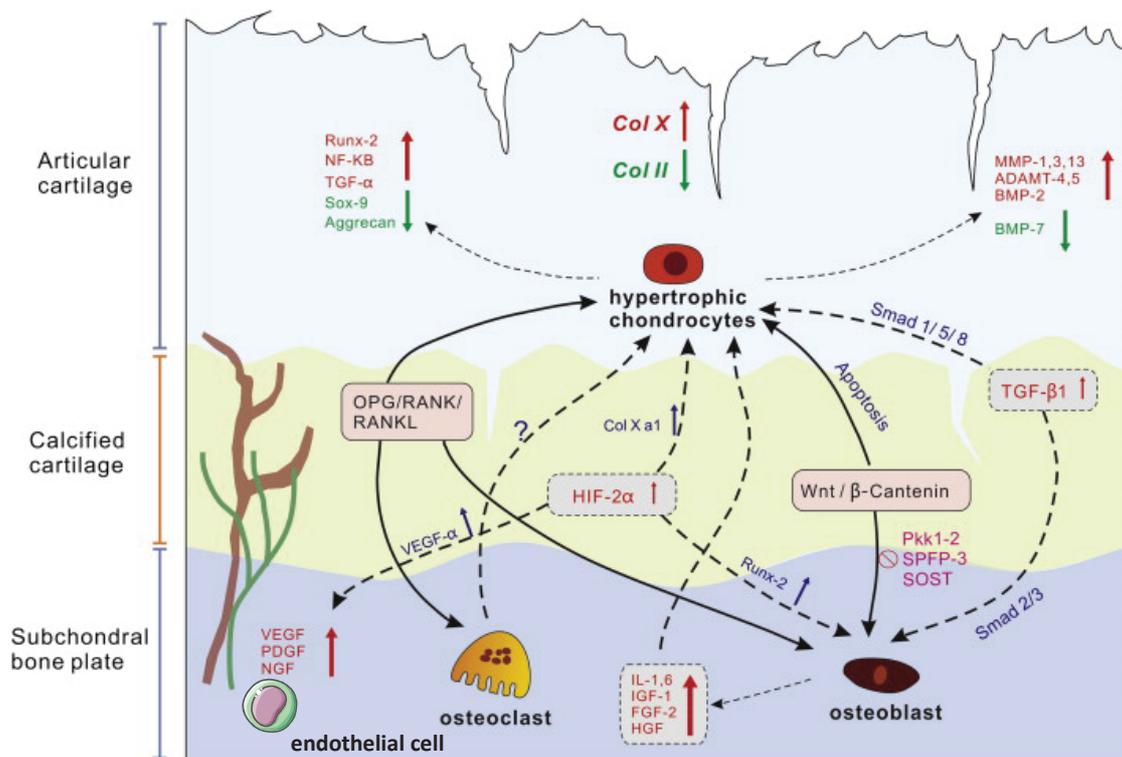


Figure 50: Communications moléculaires et cellulaires à la jonction ostéocondrale au cours de l'arthrose.

La présence de connexions (micro-fissures, contacts directs et chenaux vasculaires) entre l'os sous-chondral et le cartilage contribue à augmenter les communications entre les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes à travers des facteurs biologiques et diverses voies de signalisation. Les facteurs de croissance VEGF, PDGF et NGF sont détectés dans les chenaux vasculaires. L'os sous-chondral est exposé aux facteurs sécrétés par les chondrocytes hypertrophiques, tels que des facteurs pro-angiogéniques, des MMP et des ADAMTS. Réciproquement, l'invasion du cartilage artériel par des chenaux vasculaires expose les

chondrocytes aux cytokines et facteurs de croissance provenant de l'os sous-chondral, tels que le VEGF, le NGF, l'IL-1, l'IL-6, le HGF ou encore l'IGF-1. Le déséquilibre du système OPG/RANKL a de multiples effets sur l'os et le cartilage. HIF-2 α est associé à la différenciation hypertrophique des chondrocytes et à l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF. Les voies de signalisation du TGF- β 1 et de Wnt/ β -caténine ont émergé comme des systèmes clés de la régulation de l'homéostasie de l'os et du cartilage. Adapté de Yuan, X. L. et al. (2014).

L'hypertrophie des chondrocytes et l'angiogenèse ostéocondrale s'entretiendraient très probablement mutuellement par une boucle incluant une production accrue de divers activateurs de l'angiogenèse. De manière intéressante, l'inhibition du VEGF par un lentivirus protège les chondrocytes humains contre la différenciation hypertrophique induite en réponse au TNF- α , en inhibant l'expression de RUNX2, COL10A1, MMP-13 et ALP (Zhang, X. et al. 2016b). Le VEGF régule positivement l'expression de RUNX2 et réciproquement. Une étude a d'ailleurs démontré que le VEGF promouvait l'ostéoblastogenèse dans des cellules souches mésenchymateuses via l'activation de RUNX2 (Liu, Y. et al. 2012), suggérant l'existence de cette potentielle boucle d'auto-régulation entre l'hypertrophie chondrocytaire et l'angiogenèse ostéocondrale.

En définitive, les chondrocytes hypertrophiques contribueraient à la dégradation du cartilage, favoriseraient la minéralisation de sa matrice extracellulaire et induiraient la néo-vascularisation du cartilage articulaire au cours de l'arthrose. Contrôler la différenciation hypertrophique des chondrocytes serait donc une stratégie thérapeutique prometteuse pour l'arthrose. Ainsi, de nombreux facteurs impliqués dans l'induction et la régulation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans la plaque de croissance pourraient constituer des cibles intéressantes à investiguer pour inhiber la progression du processus arthrosique.

Objectifs

Comme discuté en introduction, l'angiogenèse ostéochondrale jouerait un rôle essentiel dans l'arthrose, cependant les mécanismes moléculaires qui la gouvernent restent inconnus. Nous supposons que la différenciation hypertrophique des chondrocytes serait l'un des moteurs de l'angiogenèse ostéochondrale à travers un déséquilibre entre la production de facteurs angiogéniques et angiostatiques. Les objectifs de ce travail de thèse ont été :

- De confirmer le lien entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes, la vascularisation ostéochondrale et la progression de la sévérité de l'arthrose chez l'Homme.
 - D'optimiser et de valider le modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes murins en culture primaire développé au laboratoire.
 - De comparer le potentiel angiogénique des chondrocytes hypertrophiques à celui des chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques en étudiant l'expression et la synthèse de molécules pro- et anti-angiogéniques.
 - D'identifier des acteurs moléculaires impliqués dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes, l'angiogenèse et le remodelage de la jonction ostéochondrale. Deux approches ont été utilisées : une approche ciblée et une approche sans a priori.
- Approche ciblée : compte tenu de la diminution de la synthèse de TSP-1 observée au cours de l'hypertrophie des chondrocytes, son implication dans la différenciation hypertrophique va être étudiée dans notre modèle *in vitro* grâce à la culture de chondrocytes déficients pour la TSP-1 (TSP-1^{-/-}). Son rôle dans la progression de l'arthrose et l'angiogenèse ostéochondrale sera ensuite évalué dans un modèle murin d'arthrose mécanique par déstabilisation du ménisque médial (DMM) en comparant des souris WT et TSP-1^{-/-}.
 - Approche sans a priori : une étude microarray a été réalisée à partir du modèle *in vitro* de différenciation hypertrophique. L'IL-34 et ses récepteurs sont ressortis de l'analyse transcriptomique comme étant fortement dérégulés au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Ainsi, l'induction de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, pro-angiogéniques et pro-cataboliques sera évaluée dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques, hypertrophiques et les ostéoblastes murins en réponse à l'IL-34.

Matériels & Méthodes

1. Expériences *ex vivo*

1.1 Collection des prélèvements de tissus humains arthrosiques

L'ensemble des protocoles de cette étude utilisant des prélèvements d'origine humaine a été approuvé par le comité de protection des personnes (CPP) Ile de France V (17/11/2015) et du comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche (CCTIRS) (16/09/2016).

1.1.1 Inclusion des patients

Les prélèvements de genoux humains arthrosiques, comprenant les plateaux tibiaux et les condyles fémoraux, sont récupérés chez des patients opérés pour une pose de prothèse totale de genou (PTG) dans le cadre d'une gonarthrose symptomatique dans le service d'orthopédie de l'hôpital Saint-Antoine (AP-HP) et à la clinique des Maussins-Nollet à Paris. Les patients inclus dans cette étude ont apporté leur consentement écrit la veille de l'opération après avoir reçu des informations détaillées sur l'utilisation des tissus recueillis et les objectifs visés par l'équipe de recherche.

1.1.2 Dissection des tissus et préparation des coupes histologiques

Les prélèvements sont conservés dans du Phosphate Buffered Saline (PBS) à 4°C jusqu'à la dissection. Il est conseillé de les disséquer au cours des premières 24 heures après l'intervention chirurgicale. Des carottes histologiques sont réalisées au centre des 4 compartiments de l'articulation (condyle fémoral interne, condyle fémoral externe, plateau tibial interne et plateau tibial externe) afin de récupérer une couche de cartilage articulaire, de cartilage calcifié et d'os sous-chondral (Figure 51).

Les tissus sont fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 48h puis décalcifiés dans une solution d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) 14% diluée dans l'eau, ajustée à un pH 7,4, pendant 4 à 6 semaines à 4°C. Les bains d'EDTA sont changés tous les deux jours. Ce qui déterminera l'arrêt de la décalcification est la mollesse perçue de l'échantillon. Les tissus sont ensuite inclus en paraffine. Des coupes sériées de 5 µm sont réalisées au microtome à rotation Leica RM2135 (Leica Biosystems) selon l'axe frontal des échantillons.

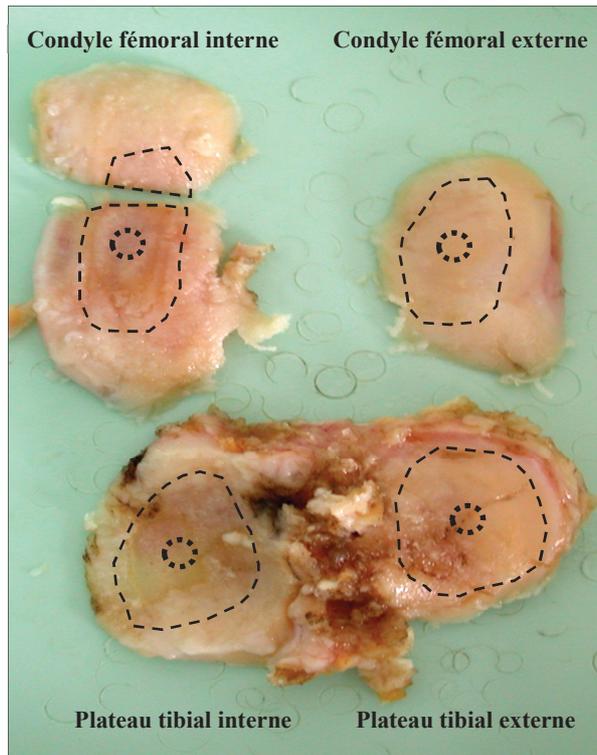


Figure 51: Prélèvements d'un genou humain arthrosique issu d'un patient opéré pour une pose de prothèse totale (PTG).

Les prélèvements récupérés suite à la chirurgie comprennent les plateaux tibiaux et les condyles fémoraux. La zone entourée au centre de chaque compartiment de l'articulation correspond à la région où est effectuée la carotte histologique.

1.2 Marquages des coupes histologiques de cartilages arthrosiques

1.2.1 Histologie

L'évaluation histologique de l'arthrose a été réalisée selon un score dérivé de celui établi par Mankin (Mankin, H. et al. 1971) sur des coupes de genoux arthrosiques humains (5 μm , n=90). Le score de Mankin analyse sur des coupes colorées à la safranine O (marquage des protéoglycanes), au vert-lumière (collagènes) et à l'hématoxyline (noyaux cellulaires), la structure du cartilage, sa cellularité, son contenu en protéoglycanes et l'intégrité de la tidemark (Tableau 3). Grâce à l'attribution d'un score pour chaque paramètre défini par Mankin (paramètres I, II et III du tableau 3) nous avons établi un score de Mankin modifié, compris entre 0 et 13, pour chaque coupe de cartilage étudiée. L'intégrité de la tidemark a été analysée séparément par le comptage du nombre de structures vasculaires qui l'atteignent.

HISTOLOGICAL-HISTOCHEMICAL GRADING *

	Grade		Grade
I. Structure		III. Safranin-O staining	
a. Normal	0	a. Normal	0
b. Surface irregularities	1	b. Slight reduction	1
c. Pannus and surface irregularities	2	c. Moderate reduction	2
d. Clefts to transitional zone	3	d. Severe reduction	3
e. Clefts to radial zone	4	e. No dye noted	4
f. Clefts to calcified zone	5		
g. Complete disorganization	6		
II. Cells		IV. Tidemark integrity	
a. Normal	0	a. Intact	0
b. Diffuse hypercellularity	1	b. Crossed by blood vessels	1
c. Cloning	2		
d. Hypocellularity	3		

* Serial histological sections, cut at five micrometers and stained with hematoxylin and eosin and safranin-O-fast green-iron hematoxylin, were analyzed for abnormalities in structure, cell population, safranin-O stain distribution, and tidemark integrity and scores assigned as the histologic-histochemical grade.

Tableau 3: Tableau original de la classification histologique du cartilage articulaire.

Classification tirée des travaux de Mankin, H. et al. (1971), sur laquelle est basée l'étude de nos coupes histologiques (n=90). Ce score varie de 0 (cartilage intact) à 14 (arthrose sévère, sans cartilage articulaire résiduel ou présentant une couche mince totalement désorganisée).

1.2.2 Immunohistochimie

Les coupes de cartilages arthrosiques humains sont préalablement chauffées à 60°C pendant 15 min puis déparaffinées dans 3 bains successifs de xylène pendant 5 min suivis de bains d'alcool (5 min) à des concentrations décroissantes (alcool absolu, 95%, 70% et 50%) pour enfin terminer dans un bain d'eau distillée (5 min). Un démasquage enzymatique des épitopes est réalisé par digestion des coupes à 37°C par la hyaluronidase (Sigma-Aldrich) (voir la concentration et le temps d'incubation dans le tableau 4 selon l'anticorps primaire utilisé) diluée dans du PBS pH 5,5 et par la pronase (Roche) (voir la concentration et le temps d'incubation dans le tableau 4 selon l'anticorps primaire utilisé) diluée dans du PBS pH 7,4. Les lames sont ensuite incubées avec une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 3% pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante afin de bloquer les peroxydases endogènes des tissus. Les lames sont ensuite incubées pendant 1h en solution de blocage TBS-TC (Trizma 4,73 mM pH 7,4, NaCl 154 mM, Tween 20 0,02% et caséine 0,06%). Enfin, l'anticorps primaire, dilué (concentration précisée dans le tableau 4) dans du TBS-TC est incubé une nuit à 4°C. Deux contrôles négatifs sont réalisés ; l'un sans anticorps primaire, l'autre avec une immunoglobuline du même isotype et à la même concentration finale que l'anticorps primaire étudié (IgG₁ de souris ou IgG de lapin, Dako). L'anticorps secondaire biotinylé (kit Vector R.T.U Vectastain) est incubé à température ambiante pendant 10 min. Le complexe streptavidine/ peroxydase (kit Vector R.T.U Vectastain) est ensuite déposé sur les coupes 5 min. La solution de révélation de la peroxydase par le 3,3'- diaminobenzidine

tetrahydrochloride (DAB) (kit Vector peroxydase substrat SK 4100) est incubée sur les tissus jusqu'à l'obtention d'une coloration brune (1 min pour les anticorps primaires anti-OC et anti-CD34, 1'30 min pour l'anticorps anti-TSP-1 et 3 min pour les anticorps anti-CSF-1R et anti-PTP- ζ). La réaction est bloquée dans l'eau distillée. Une contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer (5 min) est réalisée, rincée à l'eau basique (pH 9,7) puis abondamment lavée à l'eau courante. Enfin, les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool (50%, 70%, 95% et 2 bains d'alcool absolu) suivis de 3 bains de xylène pour être montées entre lame et lamelle en résine Eukitt®.

Anticorps primaires	Fournisseur (référence)	Espèce / Isotype	Concentration initiale (dilution)	Conditions du démasquage enzymatique
CD34	Dako M7165	Souris / Monoclonal IgG ₁ Clone QBEnd-10	12 μ g/mL (dilué au 1/50 ^{ème})	0,2 mg/mL de hyaluronidase (10 min) puis 0,1 mg/mL de pronase (20 min) à 37 °C
CSF-1R	Santa Cruz Biotechnology sc-13949	Lapin/ Polyclonal IgG H-300	200 μ g/mL (dilué au 1/50 ^{ème})	2 mg/mL de hyaluronidase (10 min) puis 1 mg/mL de pronase (20 min) à 37 °C
OC	Hy test Ltd 4OC8	Souris / Monoclonal IgG ₁ Clone 8H12	1,3 mg/mL (dilué au 1/100 ^{ème})	0,2 mg/mL de hyaluronidase (10 min) puis 0,1 mg/mL de pronase (20 min) à 37 °C
PTP- ζ	BD Transduction Laboratories 610180	Souris / Monoclonal IgG ₁ Clone 12/RPTPb	250 μ g/mL (dilué au 1/50 ^{ème})	0,2 mg/mL de hyaluronidase (10 min) puis 0,1 mg/mL de pronase (20 min) à 37 °C
TSP-1	Santa Cruz Biotechnology sc-59887	Souris / Monoclonal IgG ₁ A6.1	200 μ g/mL (dilué au 1/50 ^{ème})	2 mg/mL de hyaluronidase (15 min) puis 1 mg/mL de pronase (30 min) à 37 °C

Tableau 4: Conditions expérimentales des immunohistochimies (CD34, CSF-1R, OC, PTP- ζ et TSP-1).

Sont mentionnés dans le tableau le fournisseur de l'anticorps primaire, sa référence, l'espèce chez laquelle l'anticorps a été produit, son isotype, sa concentration initiale, la dilution utilisée au cours des expériences et les conditions des démasquages enzymatiques effectués.

La présence des chondrocytes hypertrophiques dans le cartilage a été déterminée par un immunomarquage de l'ostéocalcine (OC). L'intensité et la répartition du marquage de l'OC ont été définies par un score de 0 à 4 sur les coupes de cartilages arthrosiques, par comparaison à un contrôle négatif (IgG₁ de souris) (Tableau 5). Le score attribué à chaque coupe de cartilage correspond à la moyenne du score déterminé par deux observateurs indépendamment.

Scores marquage OC	Description du type de marquage en intensité et selon sa répartition
Score = 0	Pas de marquage OC observé
Score = 1	Peu de marquage des chondrocytes
Score = 2	Marquage modéré et diffus des chondrocytes
Score = 3	Marquage des chondrocytes dans l'ensemble du cartilage (signal intense dans les chondrocytes à une densité cellulaire normale)
Score = 4	Marquage des chondrocytes dans l'ensemble du cartilage (en cas d'hypercellularité, signal intense dans les clones de chondrocytes, « clusters »)

Tableau 5: Correspondance des valeurs du score de l'immunomarquage de l'ostéocalcine.

Un score évaluant l'intensité et la répartition du marquage de l'OC, d'une valeur de 0 à 4, a été attribué d'après l'observation de coupes de cartilages arthrosiques. Ces marquages de l'OC ont été comparés aux marquages du contrôle négatif par l'IgG isotype.

L'implication de la TSP-1 dans la progression de l'arthrose humaine a été évaluée par immunohistochimie sur des coupes de cartilages de patients arthrosiques, présentant différents stades d'arthrose. L'intensité et la répartition du marquage de la TSP-1 sur les coupes ont été définies par un score compris entre 0 et 3, par comparaison à un contrôle négatif (IgG₁ de souris) (Tableau 6). Le score attribué à chaque coupe de cartilage correspond à la moyenne du score déterminé par deux observateurs indépendamment.

Scores marquage TSP-1	Description du type de marquage en intensité et selon sa répartition
Score = 0	Aucun marquage péri-cellulaire ou dans la matrice
Score = 1	Marquage léger et diffus dans la matrice
Score = 2	Marquage modéré et homogène dans la matrice
Score = 3	Marquage intense et homogène dans la matrice

Tableau 6: Correspondance des valeurs du score de l'immunomarquage de la TSP-1.

Un score évaluant l'intensité et la répartition du marquage de la TSP-1, d'une valeur de 0 à 3, a été attribué d'après l'observation de coupes de cartilages arthrosiques. Ces marquages de la TSP-1 ont été comparés aux marquages par l'IgG isotype (contrôle négatif).

2. Expériences *in vitro*

2.1 Cultures primaires de cellules murines

L'ensemble des expériences *in vitro* de cette étude est effectué selon des protocoles approuvés par le Comité d'Ethique en expérimentation animale n°5 Charles Darwin de la région Ile de France.

2.1.1 Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes murins

2.1.1.1 Mise en culture des chondrocytes articulaires

Des souriceaux C57BL/6 (élevage Janvier) de 5 à 6 jours sont disséqués afin de prélever les genoux et les têtes fémorales (Salvat, C. et al. 2005). Les prélèvements sont lavés au PBS et soumis à des digestions enzymatiques par la libérase (Roche) à 37°C (deux fois 45 min à 0,52 U Wunsch/mL et une fois sur la nuit à 0,13 U Wunsch/mL) dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) comprenant du glucose (1 g/L), de la pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL) (PS) (Sigma-Aldrich) et de la L-glutamine (4 mM) (Glu) (Sigma-Aldrich). Le lendemain, les chondrocytes articulaires sont isolés des débris matriciels par filtration sur tamis cellulaire (100 µm) pour être ensuiteensemencés à une densité de 40 000 cellules par puits (plaques 12 puits) dans du milieu DMEM PS-Glu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco) (10%) (milieu de croissance). Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'humidité et 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

2.1.1.2 Protocole de différenciation hypertrophique des chondrocytes murins

Les chondrocytes articulaires sont cultivés pendant 1 semaine en milieu de croissance jusqu'à confluence. Ils sont ensuite cultivés 4 semaines en milieu de différenciation pré-hypertrophique, un milieu chondrogénique basé sur les compositions décrites pour les cultures des cellules ATDC5 et des chondrocytes de plaques de croissance (Jikko, A. et al. 1993, Shukunami, C. et al. 1996). Ce milieu est composé de DMEM-Ham's F-12 Nutrient Mixture (DMEM-HamF12) (Sigma-Aldrich), 4,5 g/L de glucose, SVF (5%), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), L-glutamine (4 mM), insuline (5 µg/mL) - transferrine (5 µg/mL) - sodium sélénite (5 ng/mL) (ITS) (Sigma-Aldrich, 11074547001), hormone tri-iodothyronine (T3) (50 ng/mL) (Sigma-Aldrich, T6397) et extemporanément de l'acide ascorbique (40 µg/mL) (Sigma-Aldrich, A4544). Enfin, les chondrocytes sont cultivés 6 semaines en milieu

de différenciation hypertrophique, basé sur le milieu de différenciation pré-hypertrophique supplémenté en β -glycérophosphate (10 mM) (Sigma-Aldrich, G9422), acide rétinolique (10^{-7} M) (Sigma-Aldrich, R2625) et 1,25-dihydroxyvitamine D3 (10^{-8} M) (Sigma-Aldrich, D1530). La différenciation hypertrophique est réalisée à 37°C en atmosphère 95% d'humidité, 3% de CO₂, pour faciliter la minéralisation des cultures (Shukunami, C. et al. 1996).

2.1.2 Mise en culture d'ostéoblastes murins

Les ostéoblastes sont obtenus à partir de crânes (calvaria) de souris C57BL/6 (élevage Janvier) de 5 à 6 jours (Sanchez, C. et al. 2009). Les prélèvements sont lavés au PBS et soumis à des digestions enzymatiques successives. La première est réalisée par une solution de trypsine (0,5 g/L) - EDTA (0,2 g/L) (Sigma-Aldrich) dans du milieu DMEM-HamF12 contenant 4,5 g/L de glucose, de la pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 μ g/mL) et de la L-glutamine (4 mM), pendant 20 min à 37°C sous agitation afin d'éliminer les tissus mous adhérant aux crânes. Après deux lavages au PBS, les crânes sont soumis à deux digestions successives par la libérase (0,8 U Wünsch/mL) pendant 15 min et 40 min respectivement, à 37°C et sous agitation. Les ostéoblastes en suspension sont isolés des débris matriciels par filtration sur tamis cellulaire (100 μ m) pour être ensuiteensemencés à une densité de 100 000 cellules par puits (plaques 12 puits) dans du milieu DMEM-HamF12 PS-Glu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) (15%). Après une nuit d'incubation, les cellulesensemencées sont lavées trois fois au PBS afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les ostéoblastes sont cultivés pendant 21 jours dans un milieu DMEM-HamF12 PS-Glu enrichi en SVF (10%) et en acide ascorbique (50 μ g/mL) à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'humidité et 5% de CO₂. Après 10 jours de culture, du β -glycérophosphate (5 mM) est ajouté au milieu et ce jusqu'à la fin du protocole. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

2.2 Arrêt des cultures de chondrocytes et d'ostéoblastes murins

Lorsque le stade de différenciation souhaité est atteint ; chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques, hypertrophiques ou ostéoblastes, les cellules sont lavées deux fois au PBS et incubées dans un milieu DMEM (1 g/L de glucose) PS-Glu sans SVF pendant 4 h. Ce milieu n'est pas conservé car il comporte des médiateurs sécrétés en réponse au stress de privation. Il est donc éliminé et remplacé pour 24h par un nouveau milieu DMEM PS-Glu sans SVF, qui va constituer le milieu dit « conditionné ». Ce milieu contenant les médiateurs sécrétés est récupéré, les cellules sont lavées deux fois au PBS avant l'extraction des ARN totaux et des protéines cellulaires et matricielles. Les produits d'extraction et les milieux conditionnés sont

conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Parallèlement, des cultures de chondrocytes sont fixées au PFA (3,7% dans du PBS) pendant 20 min puis sont lavées 3 fois au PBS. Ces échantillons permettent de réaliser des colorations décrites ultérieurement.

2.3 Traitements des cultures primaires de chondrocytes et d'ostéoblastes murins : ABT-510, IL-1 β et IL-34

Les stimulations des chondrocytes ou des ostéoblastes murins par l'ABT-510, l'IL-1 β humaine recombinante et l'IL-34 murine recombinante sont réalisées après 24h de jeun. Les cellules sont lavées deux fois au PBS puis sont stimulées pendant 24h par les composés dilués dans du milieu DMEM (1 g/L de glucose) PS-Glu supplémenté en albumine de sérum bovin (BSA) (0,1%) (Sigma-Aldrich) (Tableau 7). Les milieux conditionnés sont prélevés après 24h de stimulation pour réaliser des dosages et les lysats cellulaires sont récupérés pour effectuer des extractions d'ARN. Ces échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Composés étudiés	Fournisseur (référence)	Concentrations utilisées	Types cellulaires murins stimulés
ABT-510 (peptide mimétique de la TSP-1)	Collaborateurs des laboratoires Servier (Croissy-sur-Seine)	100 nM et 1 μ M (dilutions en série)	Chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques
IL-1β humaine recombinante	Peptotech (200-01B)	1 ng/mL	Chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques
IL-34 murine recombinante	R&D Systems (5195-ML)	3 ng/mL, 30 ng/mL et 100 ng/mL (dilutions en série)	Chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques Ostéoblastes

Tableau 7: Conditions expérimentales des expériences de stimulations cellulaires par l'ABT-510, IL-1 β et l'IL-34.

Sont mentionnés dans le tableau le fournisseur du composé, sa référence, sa concentration utilisée au cours des expériences et les types cellulaires stimulés au cours de cette étude.

2.4 Evaluation de la viabilité cellulaire des chondrocytes murins

2.4.1 Test MTT

Le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) est un substrat chromogène réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Après deux lavages au PBS, des cultures de chondrocytes sont incubées en présence de MTT (0,5 mg/mL dilué dans du PBS) (Sigma-Aldrich) pendant 3h à 37°C pour évaluer leur viabilité au cours du protocole de différenciation hypertrophique. La solution de MTT est ensuite retirée, les puits de cultures sont séchés et les cristaux de formazan formés dans les

chondrocytes sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La réaction colorimétrique est mesurée par spectrophotométrie à 570 nm.

2.4.2 Test LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse la transformation réversible lactate-pyruvate. Au cours d'un processus de mortalité cellulaire, la LDH est libérée dans les surnageants de culture. Les milieux conditionnés obtenus à partir des chondrocytes murins peuvent être utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire en dosant l'activité enzymatique de la LDH par le kit Cytotoxicity Detection – LDH (Roche) grâce à une réaction colorimétrique mesurée par spectrophotométrie à 490 nm. Pour que le dosage soit réussi, il est nécessaire de ne pas congeler les milieux mais de réaliser le dosage rapidement après l'obtention des échantillons, conservés à 4°C.

2.5 Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains

2.5.1 Mise en culture des chondrocytes issus de cartilages arthrosiques

Des explants de cartilages (condyles fémoraux et plateaux tibiaux) sont obtenus à partir des articulations de patients arthrosiques qui ont subi une pose de prothèse totale de genou (PTG). Les explants sont disséqués dans les 24 heures après l'arthroplastie. Seules les zones d'apparence saine du cartilage articulaire sont conservées, émincées en fines coupes, lavées deux fois au PBS puis soumises à deux digestions successives par la libérase (0,52 U Wünsch/mL) dans du milieu DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, de la pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL) et de la L-glutamine (4 mM), pendant 45 min à 37°C sous agitation. La troisième digestion par la libérase (0,13 U Wünsch/mL) se déroule sur la nuit à 37°C, sous agitation. Les chondrocytes articulaires en suspension sont filtrés sur un tamis cellulaire (100 µm), centrifugés à 1600 rpm pendant 6 min puisensemencés à une densité cellulaire de 10⁶ cellules par boîte de Pétri P100, comme l'a décrit l'équipe de Yashito Yahara qui a développé récemment ce modèle (Yahara, Y. et al. 2016) (Figure 52). Ces chondrocytes articulaires humains sont cultivés en milieu chondrogénique DMEM 4,5 g/L de glucose, enrichi en SVF (10%), L-glutamine (4 mM), pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL), insuline - transferrine - sodium sélénite (ITS) en solution (1%) (Sigma-Aldrich, I3146), transforming growth factor beta 1 (TGF-β₁) recombinant humain (10 ng/mL) (Peptotech, 100-21C), dexaméthasone (100 nM) (Sigma-Aldrich, D4902), sodium pyruvate (1 mM) (Sigma-Aldrich) et L(+) acide ascorbique (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich), pendant environ

7 jours jusqu'à confluence à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'humidité et 5% de CO₂.

2.5.2 Protocole de différenciation hypertrophique

Lorsque les chondrocytes humains atteignent la confluence dans les boîtes de Pétri, 5.10⁵ cellules sont transférées dans des tubes en polypropylène de type « falcon » de 15 mL et centrifugées à 500 g pendant 10 min afin de former des culots de chondrocytes (condition basale) (Figure 52). Après quelques jours d'incubation, lorsque les culots sont stables, ils sont transférés dans des puits de plaques 24 puits selon notre protocole (en boîte de Pétri dans le protocole de Yahara, Y. et al. 2016) et incubés dans le milieu chondrogénique pendant 8 semaines. Enfin, le milieu est remplacé par un milieu de différenciation hypertrophique pendant 2 semaines supplémentaires, dans du DMEM 4,5 g/L de glucose, supplémenté en SVF (1%), L-glutamine (4 mM), pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL), ITS (1%), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) recombinante humaine (10 ng/mL) (Peprotech, 120-02C), growth differentiation factor 5 (GDF-5) recombinant humain (10 ng/mL) (Peprotech, 120-01), hormone tri-iodothyronine (T3) (1 µM) (Sigma-Aldrich, T6397), dexaméthasone (10 nM), L(+) acide ascorbique (50 µg/mL) et β-glycérophosphate (10 mM) (Sigma-Aldrich).

2.5.3 Arrêt des cultures de chondrocytes humains

Les cultures de chondrocytes humains sont arrêtées à différents stades de différenciation ; la condition basale, qui correspond au moment de la formation du culot après centrifugation, la condition chondrogénique (8 semaines de culture en milieu de différenciation chondrogénique) et la condition hypertrophique (2 semaines de culture supplémentaires en milieu de différenciation hypertrophique). Lorsque le stade de différenciation souhaité est atteint, les culots de chondrocytes sont lavés deux fois au PBS et incubés dans un milieu DMEM (1 g/L de glucose) PS-Glu sans SVF pendant 4 h. Ce milieu n'est pas conservé car il comporte des médiateurs sécrétés en réponse au stress de privation. Il est donc éliminé et remplacé pour 24h par un nouveau milieu DMEM PS-Glu sans SVF, qui va constituer le milieu dit « conditionné ». Ce milieu contenant les médiateurs sécrétés est récupéré, les cellules sont lavées deux fois au PBS avant l'extraction des ARN totaux et des protéines cellulaires et matricielles. Les produits d'extraction et les milieux conditionnés sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Parallèlement, des culots de chondrocytes sont fixés au PFA (3,7% dans du PBS) pendant 30 min puis sont lavés 3 fois au PBS, pour être inclus en

paraffine et obtenir des coupes histologiques de 5 μm . Ces échantillons permettent de réaliser des colorations au rouge alizarine et von Kossa décrites ultérieurement.

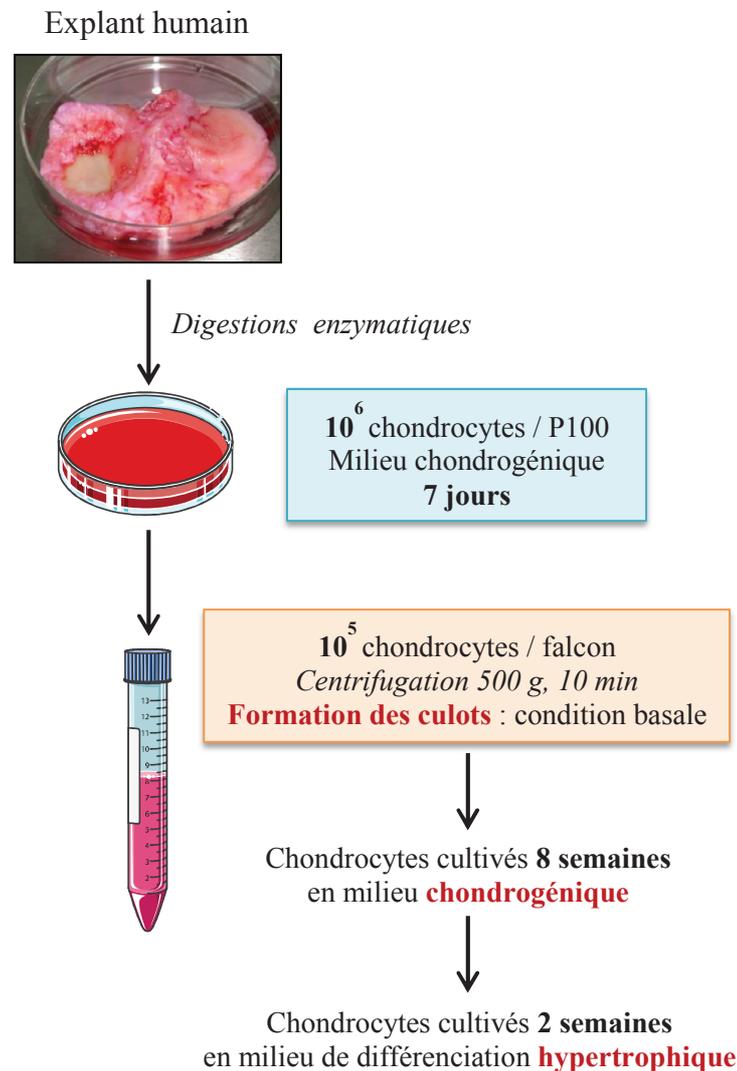


Figure 52: Protocoles de mise en culture de chondrocytes articulaires humains et de leur différenciation hypertrophique.

Des chondrocytes articulaires sont récupérés à partir d'explants de cartilages, obtenus chez des patients arthrosiques opérés pour une pose de prothèse totale de genou. Les explants ont été disséqués dans les zones les moins endommagées du cartilage articulaire des plateaux tibiaux et condyles fémoraux. Après des étapes de digestions enzymatiques, les chondrocytes articulaires isolés ont été mis en culture à une densité cellulaire de 10^6 cellules par boîte de Pétri P100 et cultivés en milieu chondrogénique pendant environ 7 jours jusqu'à confluence. Ensuite, $5 \cdot 10^5$ cellules ont été transférées dans des falcons de 15 mL et centrifugées à 500 g pendant 10 min afin de former des culots de chondrocytes (condition basale). Après quelques jours d'incubation, lorsque les culots sont stables, ils sont transférés dans des puits de plaques 24 puits et incubés dans le milieu chondrogénique pendant 8 semaines. Enfin, le milieu est remplacé par un milieu de différenciation hypertrophique pendant 2 semaines supplémentaires. D'après Yahara, Y. et al. (2016).

2.6 Analyses moléculaires

2.6.1 Chondrocytes et ostéoblastes murins

2.6.1.1 Extractions des ARN totaux et reverse transcription (RT)

La lyse des cellules et l'extraction des ARN totaux sont réalisées selon le protocole ReliaPrepTM RNA Cell Miniprep System de Promega, basé sur l'utilisation d'un tampon BLT: guanidine thiocyanate (4 M), Tris (0,01 M) pH 7,5 et 1-thioglycerol (2%). Un traitement préliminaire à la protéinase K à 20 mg/mL (Qiagen) pendant 10 min à 55°C est effectué afin de dégrader la matrice extracellulaire dense des chondrocytes hypertrophiques. La concentration et la pureté des ARN extraits sont estimées par le spectrophotomètre BioPhotometer d'Eppendorf à 260 nm. Les ARN totaux (500 ng) sont utilisés comme matrice afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) grâce au kit Omniscript de Qiagen: tampon (1X), dNTP (0,5 mM chacun), oligodT (1 µM) et enzyme RT (4 U). Le volume réactionnel final de 20 µL est incubé 50 min à 37°C et 15 min à 70°C. L'ADNc est conservé à -20°C.

2.6.1.2 PCR quantitatives (qPCR)

Les niveaux d'expression des transcrits d'intérêt sont quantifiés par qPCR grâce au kit Go Taq qPCR Master Mix de Promega. Les mesures sont réalisées par le LightCycler Real Time PCR LC480 de Roche selon le programme d'amplification du tableau 8. Les expériences sont réalisées en duplicat pour chaque gène étudié. Les séquences d'amorces utilisées sont référencées dans le tableau 9. L'expression relative des transcrits, normalisée par le niveau d'expression du gène de ménage hypoxanthine phosphoribosyltransférase murin (Hprt), est déterminée par la méthode $\Delta\Delta C_t$.

95°C pendant 5 minutes	Dénaturation (1 cycle)
Dénaturation (10 secondes à 95°C) Hybridation des amorces (15 secondes à 60°C) Elongation (10 secondes à 72°C)	Amplification (40 cycles)
95°C pendant 10 secondes puis 60°C pendant 30 secondes	Fusion (1 cycle)
40°C pendant 30 secondes	Refroidissement (1 cycle)

Tableau 8: Protocole d'amplification par qPCR (LightCycler Real Time PCR LC480).

mRNA	Sens (5'-3')	Anti-sens (5'-3')	T° fusion
Acan	CAGAGTTAGTGGAGGGTGTGA	AGACCCTGGGAAGTTTGT	60°C
Angltl4	GGGACCTTAACTGTGCCAAG	GAATGGCTACAGGTACCAAACC	59°C
Cd36	TTGTACCTATACTGTGGCTAAATGAGA	CTTGTGTTTTGAACATTTCTGCTT	60°C
Cd47	CTGACCAAGGATCAGCCTGT	CATTTGGAGAAAACCACGAAA	60°C
ChM-I	AGAAGCAATTGAAGTCAACGAT	AGCGAGTTCTCTTCGTAGTTAG	60°C
Col10a1	GATGCCGCTTGTCACTG	TAAAGATACCAGATCTTGGGTCG	60°C
Col2a1	GGCAACAGCAGGTTACATA	ATGGGTGCGATGTCAATAAT	60°C
Csf1r	GCTACTGCTGTTGCTGCTCTT	TTGCCTTCGTATCTCTCGATG	60°C
Cxcl12	TGAGAACATGCCTAGATTTACCC	TCATGGCAAGATTCTGGCTTA	60°C
Fgfb	CCTTGCTATGAAGGAAGATGGAC	AGTTTATACTGCCAGTTCG	60°C
Hprt	AGGACCTCTCGAAGTGT	ATTCAAATCCCTGAAGTACTCAT	60°C
Ihh	CACCTTCAGTGATGTGCTTATTT	GGGCTGCTGGTTCTGTA	60°C
Il34	ACAAGAACCGGCTTCAGTACA	CCCTCATAAGGCACAGCAAT	60°C
Il6	GTCACAGAAGGAGTGGCTA	AGAGAACAACATAAGTCAGATACC	60°C
Kc (Il8)	AAACTAATATTTATTGGGAGACCACTAAG	TTTCAAGACATACAAACACAGCC	60°C
MCP1	GATGATCCCAATGAGTAGGCT	TTCTGATCTCATTTGGTTCCGA	60°C
Mmp13	GATGGCACTGCTGACATCAT	TGTAGCCTTTGGAAGTCTT	60°C
Mmp2	GATGCTGCCTTTAACTGGAGTA	GGAGTCTGCGATGAGCTT	60°C
Mmp3	TGAAAATGAAGGGTCTTCCGG	GCAGAAGCTCCATAACCAGCA	60°C
Mmp9	CCTGAAAACCTCCAACCTCA	GGTGTAACCATAGCGGTACAAGT	60°C
mOC	GGTGTCCCCACTTTTCCTCC	GACCACTCCAGCACAACTCC	60°C
Osx	CCTCAGTTCTTCTCTTTGTC	AACGGCAAATAGGATTGGG	60°C
Pedf	GAGGGAAATGCCAGTGC	ATCAGAGTCCAAGCCGTATC	60°C
Ptprz1	CCGGGAGTCTTCACTGACA	TGTCCAGAGAGGTGGATGG	59°C
Rankl	TGAAGACACACTACCTGACTCCTG	CCACAATGTGTTGCAGTTCC	60°C
Runx2	ATTCATCCTGACTCCCTCT	CTACCACACACAAACAATAAATAGC	60°C
Sox9	AACGCACATCAAGACGG	GGCTGTAGTGAGGAAGGTT	60°C
Sphk1	TCCATACCTGGTTCATGTGC	ACAGAAAACACGCCCTCT	60°C
Tgfb1	GCGGTGCTCGCTTTGTA	CTGTGTGAGATGTCTTTGGTT	60°C
Thbs1	GCTGGCAATGCACCTTCTAA	TAAAGGCCGAGTGCTGAC	60°C
Thbs2	ACCAGTGTGACAACAATGAG	GTCTGGGTTGAACACAAGC	60°C
TNAP	GAATCGGAACAACCTGACT	CCTGGTCCATCTCCACT	60°C
Tnfa	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	GGTCTGGCCATAGAACTGA	60°C
Vegf	CTGCTGTGGACTTGTGTTG	ATGGGTTTGTCTGTTTCT	60°C
Vegf ₁₆₅	GCCAGCACATAGGAGAGATGAGC	CAAGGCTCACAGTGATTTTCTGG	60°C

Tableau 9: Séquences des amorces murines (sens et anti-sens) utilisées au cours des qPCR.

2.6.2 Microarray du modèle de différenciation hypertrophiques des chondrocytes murins

Cette étude microarray a été réalisée dans le cadre de notre collaboration avec l'Institut de Recherches Servier (Croissy-sur-Seine), avec le pôle d'expertise Biotechnologie & Recherche Biomarqueurs (BRB).

2.6.2.1 Extractions des ARN totaux et RT

La lyse des cellules et l'extraction des ARN totaux sont réalisées selon le protocole du kit miRNAeasy Mini de Qiagen, basé sur l'utilisation du QIAzol®. La concentration et la pureté des ARN extraits sont estimées par le spectrophotomètre BioPhotometer d'Eppendorf à 260 nm puis vérifiées par nos collaborateurs des laboratoires Servier par LabChip™ sur l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Les ARN totaux (1 µg) sont utilisés comme matrice afin d'obtenir de l'ADN complémentaire grâce au kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor d'Applied Biosystems: tampon (1X), dNTP (1X), random primers (1X), MultiScribe RT (2,5 U/µL) et RNasin (1 U/µL). Le volume réactionnel final de 100 µL est incubé 10 min à 25°C, 2 h à 37°C et 5 min à 85°C. L'ADNc est conservé à -20°C.

2.6.2.2 PCR quantitatives contrôles

Les niveaux d'expression des transcrits sont quantifiés par PCR en temps réel à haut débit, à l'aide de la technologie Fluidigm® 96,96 PCR (Biomark™ HD) dont disposent nos collaborateurs des laboratoires de l'Institut de Recherches Servier. Les transcrits d'intérêt (Tableau 10) ont été amplifiés par une pré-amplification grâce au kit TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) puis par PCR grâce au kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les gènes Hmbs et Ppia ont été sélectionnés parmi les 8 gènes endogènes testés, comme étant statistiquement, d'après le logiciel Qbase plus, les gènes endogènes optimaux pour la normalisation des données. Les résultats présentés seront donc normalisés par rapport à ces deux gènes.

Gène	Nom du gène	Assay ID (Life Technologies)	Séquence contexte
Col2a1	Collagen type II alpha 1	Mm01309565_m1	GGTGACGACGGTGAAGCTGGGAAGCCCGGA
Acan	Aggrecan	Mm00545794_m1	AGTGATCTCAGAAGAAGTTC CAGACCATGA
Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9	Mm00448840_m1	GAGCACTCTGGGCAATCTCAGGGTCCGCCG
ChM-I	Chondromodulin I	Mm01320241_m1	AAGCCCATGTATCCAAAAGAAATCC
Runx2	Runt related transcription factor 2	Mm00501583_m1	TTTTCAGACC CCAGGCAGTT CCCAAGCATT
TNAP	Tissue nonspecific alkaline phosphatase liver/bone/kidney	Mm00475834_m1	GTGGCCCTCTCCAAGACATA TAACACCAAC
Osx	Osterix	Mm04209856_m1	GCGTCCTCTC TGCTTGAGGA AGAAGCTCAC
Oc	Osteocalcin	Mm03413826_mH	AAGCCAGCGGCCCTGAGTC TGACAAAGCC
Ihh	Indian hedgehog	Mm00439613_m1	CTCTGTCAAGTCTGAGCATTCGGCCGCTGC
Pedf	Pigment epithelium-derived factor	Mm00441270_m1	TCTGATCTCA ACTGCAAGAT TGCCCAGCTG
Angptl4	angiopoietin-like 4	Mm00480431_m1	CTTCAGATGGAGGCTGGACA GTGATTGAGA
Rpl30	ribosomal protein L30	Mm01611464_g1	CCGCAAAGAAGACGAAAAAGTCTCT
Tbp	TATA box binding protein	Mm00446973_m1	ATCCCAAGCGATTTGCTGCAGTCAT
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG
Hmbs	hydroxymethylbilane synthase	Mm01143545_m1	AGCCATCTGCAAACGGGAAAACCCT
Gusb	glucuronidase, beta	Mm00446953_m1	CAGCCGCTACGGGAGTCGGGCCAG
Ppia	peptidylprolyl isomerase	Mm02342430_g1	CCAAGACTGAATGGCTGGATGGCAA
Actb	Actin family cytoskeletal protein	Mm00607939_s1	CCAAGACTGAATGGCTGGATGGCAA
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Hs99999901_s1	CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA

Tableau 10: Séquences des amorces murines utilisées au cours des PCR en temps réel à haut débit par Fluidigm®.

2.6.2.3 Puces microarray

L'utilisation des puces à ADN permet d'obtenir une mesure relative du niveau d'expression des gènes dans un échantillon donné par rapport à un échantillon de référence. Dans notre étude, il s'agit de comparer le transcriptome caractéristique d'un stade de différenciation cellulaire (chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques) par rapport à un phénotype cellulaire initial (chondrocytes articulaires).

Les ARN totaux et micro-ARN sont extraits des cultures cellulaires de chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Une transcription inverse est réalisée en présence de nucléotides couplés à un fluorochrome ; des Cyanines 5 (Cy5, rouge) pour les échantillons de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, des Cyanines 3 (Cy3, vert) pour les échantillons contrôles de chondrocytes articulaires (Figure 53). Des cibles d'ADN complémentaires représentatives de l'ensemble des gènes exprimés pour chaque culture sont ainsi obtenues. Les brins d'ADNc marqués s'apparient avec les sondes de séquence complémentaire sur la lame de la puce. La mesure de l'intensité du signal fluorescent émis par chacun des spots permet ainsi d'estimer le taux d'expression différentielle du gène correspondant.

La lame *SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 8x60K Microarray* (Agilent, G4852B) a été utilisée pour étudier le transcriptome des chondrocytes du modèle de différenciation hypertrophique et la lame *Mouse miRNA Microarray Kit v21 8x60K* (Agilent, G4859C) pour étudier le miRnome. L'analyse globale des données du microarray a été réalisée à l'aide du logiciel Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) (Qiagen).

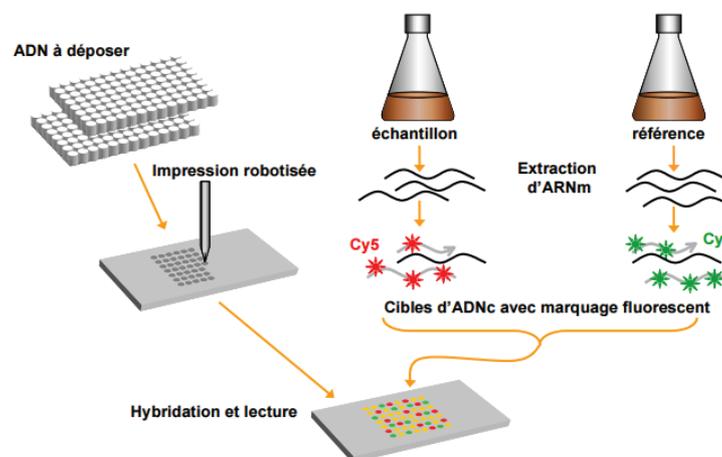


Figure 53: Principe de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce à ADN.

2.6.3 Chondrocytes humains

2.6.3.1 Extractions des ARN totaux et reverse transcription

L'extraction des ARN totaux des chondrocytes humains est effectuée selon le protocole du kit miRNeasy mini de Qiagen. La concentration des ARN extraits est estimée par le spectrophotomètre BioPhotometer d'Eppendorf à 260 nm. Les ARN totaux (500 ng) des échantillons humains sont utilisés comme matrice afin d'obtenir de l'ADN complémentaire grâce au kit Omniscript de Qiagen: tampon (1X), dNTP (0,5 mM chacun), oligodT (1 μ M) et enzyme RT (4 U). Le volume réactionnel final de 20 μ L est incubé 50 min à 37°C et 15 min à 70°C. L'ADNc est conservé à -20°C.

2.6.3.2 PCR quantitatives

Les niveaux d'expression des transcrits d'intérêt sont quantifiés par qPCR grâce au kit Go Taq qPCR Master Mix de Promega. Les mesures sont réalisées par le LightCycler Real Time PCR LC480 de Roche selon le programme d'amplification du tableau 8. Les expériences sont réalisées en duplicat pour chaque gène étudié. Les séquences d'amorces utilisées sont référencées dans le tableau 11. L'expression relative des transcrits, normalisée par le niveau d'expression du gène de ménage ARN ribosomique 18S humain (18S), est déterminée par la méthode $\Delta\Delta$ Ct.

mRNA	Sens (5'-3')	Anti-sens (5'-3')	T° fusion
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC	60°C
ACAN	CGCCTACGAAGCAGGCTAT	GGGCTCACAATGGGGTATC	60°C
COL2A1	TTCTGGAGACCAAGGTGCTT	TTCCATTAGCACCATCTTTGC	60°C
IL-34	CAGTACAGGAGCCGACTTCA	CCCTCGTAAGGCACACTGAT	60°C
MMP13	GCCATTACCAGTCTCCGAGG	TACGGTTGGGAAGTTCTGGC	60°C
OSX	GATGGGGTATCTCTTGATTAGGG	CATAGGACTTGAGGTTTCACAGC	60°C
RUNX2	CACAGCTTTGGTTTTAGATTAGTGG	GAGCAAACGATAGTTAATCTGTTGAG	60°C
SOX9	CTGGGAAACATTGCACTCTT	CTTAAGACTGCAGTGAACAAGCA	60°C
THBS1	ATGCGACTTACCACTGCAAA	ACAGGCATCACCAATTCCAT	60°C
TNAP	CCATCCTGTATGGCAATGG	GCGCCTGGTAGTTGTTGTG	60°C

Tableau 11: Séquences des amorces humaines (sens et anti-sens) utilisées au cours des qPCR.

2.7 Analyses biochimiques

2.7.1 Préparation des lysats cellulaires

2.7.1.1 Chondrocytes murins

Les protéines sont extraites par un tampon de lyse Tris (10 mM) pH 7,5, MgCl₂ (0,5 mM) et Triton-X-100 (0,1%) supplémenté en inhibiteurs de protéases cOmplete™ (1X) (Roche). Les lysats sont centrifugés 10 min à 13 000 rpm afin de récupérer les surnageants.

2.7.1.2 Chondrocytes humains

Les protéines sont extraites par un tampon RIPA Tris HCl (50 mM) pH 8, NaCl (150 mM), EDTA (2 mM), NP-40 (1%), désoxycholate de sodium (0,5%), dodécylsulfate de sodium (SDS) (0,1%), supplémenté en inhibiteurs de protéases cOmplete™ (1X) (Roche).

2.7.2 Dosages protéiques

2.7.2.1 Lysats cellulaires

Les protéines des lysats murins et humains sont dosées à l'aide du kit Pierce™ BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific). La réaction colorimétrique est mesurée par spectrophotométrie à 562 nm. Le dosage est standardisé par rapport à une gamme de BSA.

2.7.2.2 Milieux conditionnés

Les protéines des milieux conditionnés murins et humains sont dosées à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay (Biorad), reposant sur la méthode de Bradford. La réaction colorimétrique est mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. Le dosage est standardisé par rapport à une gamme de BSA.

2.7.3 Western Blot

2.7.3.1 Protocole expérimental

Les protéines sont diluées dans du tampon de Laemmli et dénaturées à 95°C pendant 5 min. Elles sont séparées dans un gel SDS-PAGE 10% ou 12% acrylamide/bis-acrylamide (Tableau 12) puis sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La quantité équivalente de protéines déposées dans chaque puits est vérifiée par une coloration de la membrane au rouge ponceau. Après saturation en lait 5% dans du TBS-T pendant 1h (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM et Tween-20 0,1%), la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (Tableau 12) une nuit à 4°C puis avec l'anticorps

secondaire (1h à température ambiante) couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (dilution au 1/1000^{ème} en lait 5% TBS-T) (Paris Anticorps). La révélation est ensuite réalisée par chimiluminescence grâce au kit Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad), visualisable sur le lecteur FujiFilm LAS-3000 (MultiGauge).

Anticorps primaires	Fournisseur (référence)	Espèce / Isotype	Concentration initiale (dilution)	Gel de séparation acrylamide/bis-acrylamide
Actine-β	Sigma-Aldrich A5441	Souris / Monoclonal IgG ₁ Clone AC-15	1,3 mg/mL (dilué au 1/10000 ^{ème})	10 ou 12 % selon le second anticorps étudié
PEDF	Santa Cruz Biotechnology sc-25594	Lapin / Polyclonal IgG H-125	200 µg/mL (dilué au 1/200 ^{ème})	12 %
TSP-1	Santa Cruz Biotechnology sc-59887	Souris / Monoclonal IgG ₁ A6.1	200 µg/mL (dilué au 1/1000 ^{ème})	10 %

Tableau 12: Conditions expérimentales des Western Blot (Actine-β, PEDF et TSP-1).

Sont mentionnés dans le tableau le fournisseur de l'anticorps primaire, sa référence, l'espèce chez laquelle l'anticorps a été produit, son isotype, sa concentration initiale, la dilution utilisée au cours des expériences et la concentration du gel de séparation en acrylamide/bis-acrylamide.

2.7.3.2 Quantifications des Western Blot

La quantité de protéine d'intérêt est évaluée dans chaque puits des membranes par densitométrie, qui permet de mesurer l'intensité et la taille du signal (valeurs des pixels) de la bande protéique révélée par chimiluminescence. Ces mesures ont été réalisées sur le logiciel ImageJ (National Institutes of Health). Pour chaque puits, la quantité de protéine d'intérêt a été rapportée à la quantité d'actine-β présente dans le même puits.

2.7.4 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Les concentrations des facteurs pro-angiogéniques VEGF et bFGF, produits par les chondrocytes murins dans les milieux conditionnés et les lysats cellulaires au cours de la différenciation hypertrophique ont été dosées par les kits ELISA Mouse de R&D Systems. Le SDF-1α a été quantifié par le kit ELISA de RayBiotech. L'IL-34 a été dosée dans les milieux conditionnés et les lysats cellulaires des chondrocytes murins et humains par les kits ELISA Mouse et Human respectivement, de R&D Systems. Les concentrations de MMP-3 et MCP-1 sécrétées dans les milieux conditionnés des chondrocytes et des ostéoblastes murins en réponse à la stimulation par l'IL-34 ont été dosées par les kits Mouse de R&D Systems. La MMP-13 a été quantifiée par le kit ELISA de Cloud-Clone Corp.

2.8 Détection de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) par cytochimie

L'activité enzymatique de la PAL est révélée par une incubation des cultures fixées dans une solution de Tris-HCl (36 mM pH 8,3), Naphtol-AS-MX Phosphate (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich) et FAST RED TR (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich) pendant 15 min à l'abri de la lumière. Une contre-coloration à l'hématoxyline est réalisée (5 min).

2.8.1 Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline

Dans les lysats cellulaires des chondrocytes, l'activité de la PAL est mesurée grâce au kit Colorimetric Alkaline Phosphatase Assay, Yellow Color (FluoProbes) (Interchim). L'apport du para-nitrophenylphosphate (pNPP) (substrat de la PAL) entraîne l'apparition d'un produit jaune qui absorbe à 405 nm. La réaction (30 min) est effectuée à l'abri de la lumière. Le dosage est standardisé par rapport à une gamme d'activité de la PAL.

2.9 Colorations des calcifications des matrices extracellulaires

2.9.1 Rouge alizarine

Les calcifications des cultures de chondrocytes murins et des coupes de culots de chondrocytes humains sont colorées au rouge alizarine (1%) dans de l'eau distillée, ajustée à un pH de 4,2 avec du NH₄OH (0,5%), pendant 20 min à l'abri de la lumière, sous agitation.

Le dosage de la coloration obtenue est basé sur le protocole développé par Gregory, C. A. et al. (2004). Après 4 lavages à l'eau distillée, les puits sont séchés et incubés avec 400 µL d'acide acétique (10%) (en plaque 12 puits) pendant 30 sec sous agitation. Les cellules et le surnageant sont récupérés dans un tube eppendorf de 1,5 mL et vortexés 30 sec. Les tubes sont chauffés 10 min à 85°C, puis sont refroidis sur glace quelques minutes avant d'être centrifugés 15 min à 20 000 g. 250 µL de surnageant sont récupérés dans un nouveau tube de 1,5 mL, dans lequel sont ajoutés 100 µL d'hydroxyde d'ammonium (10%). Enfin, 100 µL de solution sont transférés en triplicat dans des puits de plaque 96 puits pour mesurer la densité optique à 405 nm.

2.9.2 Von Kossa

Les coupes de culots de chondrocytes humains sont déparaffinées et réhydratées dans de l'eau distillée. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, les coupes sont incubées dans une solution de nitrate d'argent (1%), placées sous la lampe ultra-violette (UV) du poste de sécurité microbiologique de type 2 de la salle de culture pendant 2h. Les coupes sont ensuite

lavées plusieurs fois dans l'eau distillée et incubées avec une solution de thiosulfate de sodium (5%) pendant 5 min pour éliminer les sels d'argent qui n'ont pas réagi. Les coupes sont une nouvelle fois rincées dans l'eau distillée et contre-colorées par le Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich) pendant 5 min. Après des lavages dans l'eau distillée, les coupes sont déshydratées par des bains successifs d'alcool et de xylène puis montées entre lame et lamelle en résine Eukitt®.

3. Expériences *in vivo*

3.1 Souris TSP-1^{-/-}

L'ensemble des expériences réalisées sur les souris de cette étude est effectué selon des protocoles approuvés par le Comité d'Ethique en expérimentation animale n°5 Charles Darwin de la région Ile de France.

3.1.1 Etablissement de la lignée TSP-1^{-/-}

L'équipe de Lawler a développé en 1998 un modèle de souris C57BL/6 déficientes en TSP-1 (TSP-1^{-/-}) (Lawler, J. et al. 1998). Elles ont été générées suite à la suppression des exons 2 et 3 et de l'intron 3 du gène *Thbs1*, remplacés par un gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycerate kinase (PGK). Lawler et al. décrivent à cette époque une lordose chez les souris TSP-1^{-/-}, actuellement non observée chez nos souris. Leur phénotype apparaît normal.

3.1.2 Conditions d'élevage

Après un processus de décontamination par transferts d'embryons, des souris sauvages WT (Wild Type), hétérozygotes TSP-1^{+/-} et homozygotes TSP-1^{-/-} sont actuellement élevées dans des conditions exemptes d'agents pathogènes spécifiques (EOPS) au sein de la plateforme d'hébergement et d'expérimentation animale (PHEA) de notre centre de recherche Saint-Antoine (autoclave et sas chimique en barrière). L'hébergement des animaux respecte les conditions suivantes :

- Hébergement en portoirs ventilés en pression positive
- Salle d'hébergement en surpression
- Cycle nyctémère de 12h (8h-20h jour / 20h-8h nuit)
- Hygrométrie de 55% (+/- 10%)
- Température comprise entre 20°C et 24°C

- Change litière/abreuvement/nourriture 1 fois par semaine et vérification quotidienne par les techniciens de la PHEA
- Enrichissement du milieu : coton de nidification pour les cages d'accouplements

3.1.3 Génotypage des souris

Le choix de la méthode d'identification s'est porté sur le prélèvement d'ébauches digitales au cours des premiers jours de vie (3-5 jours) avec des ciseaux stériles très fins. Il s'agit d'une procédure d'identification classique, validée auprès des autorités (Direction Départementale de la Protection des Populations). Les biopsies ainsi recueillies sont utilisées pour le génotypage des souris.

L'extraction d'ADN est réalisée à partir des ébauches digitales par un tampon Tris HCl (100 mM) pH 7,5, NaOH (45 mM) chauffé à 95°C pendant 10 min. L'ADN extrait est ensuite amplifié par PCR classique (Tableau 13) dans un thermocycleur Mastercycler Gradient (Eppendorf) grâce au kit Taq PCR Master Mix de Qiagen et des amorces oligonucléotidiques suivantes :

Amorce sens (commune) : 5'- AGGGCTATGTGGAATTAATATCGG -3'

Amorce anti-sens (gène WT) 5'- GAGTTTGCTTGTGGTGAACGCTCAG -3'

Amorce anti-sens (cassette néomycine KO) 5'- TGCTGTCCATCTGCACGAGACTAG -3'

94°C pendant 3 minutes	Dénaturation (1 cycle)
Dénaturation (1 minute à 94°C) Hybridation des amorces (1 minute à 60°C) Elongation (1 minute à 72°C)	Amplification (35 cycles)
72°C pendant 3 minutes	Refroidissement (1 cycle)
4°C	Jusqu'à l'arrêt du programme

Tableau 13: Protocole d'amplification par PCR classique du génotypage des souris TSP-1.

Les amplicons de PCR sont ensuite détectés par une migration électrophorétique (100 V pendant 20 min) dans un gel d'agarose (1,5%), visualisés grâce à l'utilisation d'un intercalant de l'ADN (Safe-Red™) (1X) détecté sous une lampe UV (Figure 54).

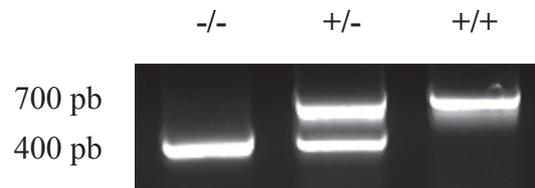


Figure 54: Profil électrophorétique des amplicons de PCR du génotypage des souris TSP-1.

-/- : souris homozygotes knock-out TSP-1^{-/-}, +/- souris hétérozygotes et +/+ : souris WT.

3.2 Modèle de déstabilisation du ménisque médial (DMM)

3.2.1 Chirurgie, protocoles d'anesthésie et d'analgésie

Le modèle de déstabilisation du ménisque médial (DMM) est le modèle d'arthrose mécanique de référence (Glasson, S. S. et al. 2007). Il consiste à déstabiliser le ménisque médial en sectionnant le ligament ménisco-tibial médial (MMTL) (Figure 55A). L'opération est réalisée sur les genoux droits de souris mâles de 10 à 12 semaines. L'utilisation des souris mâles permet d'éviter les interférences avec les hormones féminines. De plus dans ce modèle, les mâles développent une pathologie plus sévère.

L'intervention est pratiquée par une personne habilitée à pratiquer la chirurgie sur le petit animal. Les animaux reçoivent une injection intra-péritonéale d'antalgique, la buprénorphine (0,05 mg/kg) puis sont anesthésiés par de l'isoflurane gazeux à 4% pour induire l'anesthésie puis à 1,5% pour maintenir l'endormissement. L'efficacité de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de réflexe de retrait de la patte suite au pincement des coussinets plantaires. La zone interne du genou droit est rasée, désinfectée à l'alcool puis à la bétadine. Une incision cutanée est réalisée, suivie de l'ouverture de la capsule articulaire pour sectionner le ligament ménisco-tibial médial et ainsi provoquer une déstabilisation du ménisque médial. L'intervention « SHAM » correspond à une incision cutanée puis une ouverture de la capsule articulaire sans déstabilisation méniscale. La peau est refermée par des points de suture, la capsule articulaire cicatrisant spontanément. Cette intervention dure moins de 5 minutes par animal.

En période post-opératoire, les animaux sont suivis par l'équipe de la PHEA une fois par jour avec une observation de leur comportement physique et de leur évolution pondérale. Un

traitement antalgique est mis en place par injection intra-péritonéale de buprénorphine (0,05 mg/kg) : une injection en péri-opératoire, renouvelée 12h et 24h post-opératoire, puis en cas de signes d'inconfort toutes les 12h-24h. Les critères d'arrêt en cours d'expérimentation ou points limites ont été définis dans les cas où un animal montre des signes de douleurs, ne pouvant pas être soulagés par des analgésiques, si un animal présente des signes de troubles respiratoires, un aspect général dégradé (tête penchée, poils hérissés, dos voûté...) ou un comportement anormal (isolement, agressivité, troubles de la marche...).

Des lésions d'arthrose post-traumatique précoce sont généralement observées dès 4 semaines après l'opération et des lésions tardives à partir de 8 semaines, caractérisées par une forte érosion du cartilage et une sclérose de l'os sans inflammation de la membrane synoviale (Figure 55B). Les lésions du cartilage induites par DMM ont été évaluées sur des coupes histologiques de genoux colorées à la safranine O et au vert-lumière selon des critères établis par le score OARSI, détaillé dans le tableau 14 (Glasson, S. S. et al. 2010). En parallèle, une étude par nano-CT (nano-computed tomography) de la morphologie osseuse et du réseau vasculaire sous-chondral a été réalisée.

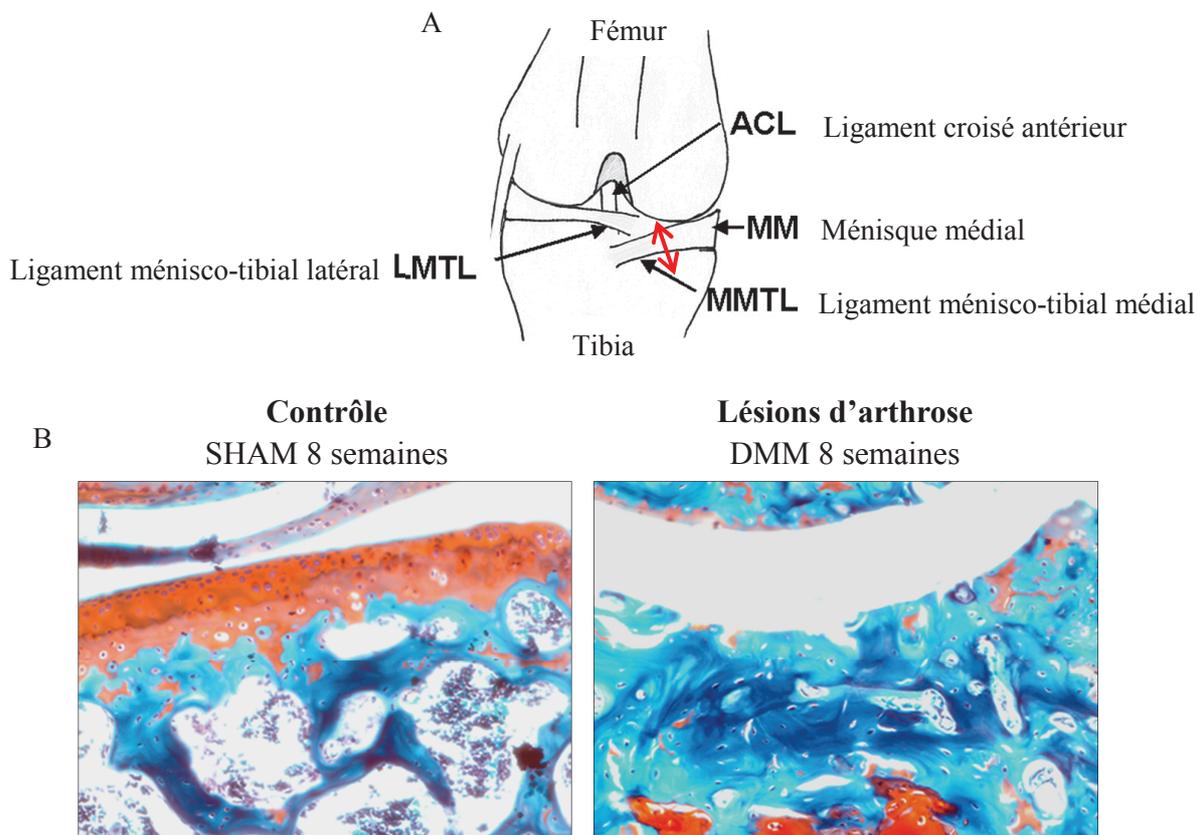


Figure 55: Description du modèle murin d'arthrose par déstabilisation du ménisque médial (DMM).

(A) Ce modèle repose sur la section du ligament ménisco-tibial médial chez la souris,

matérialisée par la flèche rouge. Schéma de l'articulation du genou droit de souris adapté des travaux de Glasson, S. S. et al. (2007). (B) Coupes histologiques d'articulations de genoux de souris, colorées à la safranine O et au vert-lumière (collection personnelle). La photographie de gauche représente une coupe d'articulation contrôle de souris SHAM 8 semaines post-opératoires, montrant un surface articulaire intacte, colorée à la safranine O. La photographie de droite représente une coupe d'articulation de souris 8 semaines post-DMM, montrant une érosion totale du cartilage articulaire.

Score OARSI	Atteintes arthrosiques
0	Cartilage normal
0,5	Perte de la coloration safranine O sans changement structural du cartilage
1	Petites fibrillations, sans perte de cartilage
2	Fissures verticales jusqu'à la couche immédiatement en-dessous de la couche superficielle du cartilage et perte des premières épaisseurs de cartilage
3	Fissures verticales/érosion vers le cartilage calcifié, qui s'étendent jusqu'à moins de 25% du cartilage articulaire
4	Fissures verticales/érosion vers le cartilage calcifié, qui s'étendent entre 25% - 50% du cartilage articulaire
5	Fissures verticales/érosion vers le cartilage calcifié, qui s'étendent entre 50% - 75% du cartilage articulaire
6	Fissures verticales/érosion vers le cartilage calcifié, qui s'étendent jusqu'à plus de 75% du cartilage articulaire

Tableau 14: Score semi-quantitatif OARSI.

Ce score, proposé par Glasson, S. S. et al. (2010), permet d'évaluer les lésions du cartilage articulaire sur des coupes histologiques de genoux de souris.

3.2.2 Sacrifices des animaux et perfusions intracardiaques de sulfate de baryum

A 8 semaines post-DMM, les souris sont sacrifiées par élongation cervicale. Une thoracotomie est réalisée (ouverture de l'abdomen et du diaphragme), une aiguille de perfusion est insérée dans l'apex du ventricule gauche du cœur et l'oreillette droite est incisée quelques instants après le démarrage de la perfusion (8 mL/min) (Pompe Masterflex Easy Load II, Cole Parmer) de solution de sulfate de baryum (50%) et de gélatine (1,5%), chauffées à 37°C dans un bain-marie. Cette perfusion permet de remplir le réseau vasculaire de produit radio-opaque. A la fin de la procédure, les pattes postérieures sont prélevées pour réaliser la dissection des genoux pour les analyses en nano-CT de la morphologie osseuse et du réseau vasculaire ostéocondral.

3.2.3 Analyses nano-CT et quantifications

Différents paramètres morphologiques de l'os trabéculaire de l'épiphyse tibiale interne des 4 groupes de souris (WT SHAM, WT DMM, KO TSP-1 SHAM, KO TSP-1 DMM) ont été mesurés par notre équipe partenaire de Saint-Etienne (Laboratoire Sainbiose - INSERM

U1059 - Equipe "Biologie du Tissu Ostéoarticulaire", Pr. Marie-Hélène Lafage Proust et Damien Cleret). Les échantillons des pattes postérieures sont inclus en résine méthylmétacrylate (MMA) et passés au nano-CT (GE nanotom) en respectant les paramètres d'acquisition suivants : résolution de 3 μm , énergie de 90 KeV, intensité de 120 μA , temps d'exposition par image de 750 ms, nombre d'images de 2400, durée totale d'une acquisition de 2h05. Les images obtenues sont exportées en format TIFF 16 bit en orientation XY (transversale) dans imageJ où elles sont réorientées en XZ (frontale). Grâce à l'imagerie nano-CT, la vascularisation ostéochondrale, le volume minéral osseux (BV/TV), correspondant au ratio entre le volume des travées et le volume total du tissu, le nombre de travées (Tb.N), l'espacement entre les travées (Td.Sp) et enfin l'épaisseur des travées (Tb.Th) ont été évalués 8 semaines post-opératoires, avec le logiciel CTAn sur l'épiphyse tibiale interne (Figure 56) avec une épaisseur d'analyse de 250 coupes, soit 750 μm .

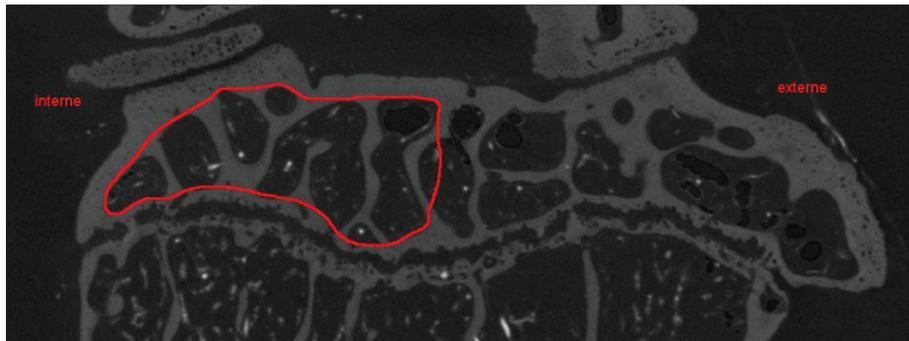


Figure 56: Délimitation de la zone d'intérêt pour les mesures des paramètres morphologiques osseux et vasculaires de l'épiphyse tibiale interne.

Les analyses sont effectuées sur le logiciel CTAn sur une épaisseur de 250 coupes, représentant 750 μm de tissu.

4. Analyses statistiques

4.1 Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5.0. Des tests non paramétriques Mann-Whitney ont été effectués pour comparer les données des différents groupes de patients arthrosiques ou de souris (ex : marquages histologiques de l'ostéocalcine, de la TSP-1, des chenaux vasculaires, quantifications des paramètres osseux et vasculaires entre les différents groupes de souris). Les corrélations ont été établies par le test non paramétrique de rang de Spearman. Des tests non paramétriques de rang de Wilcoxon ont été effectués pour comparer deux variables dépendantes (ex : comparaison de l'expression d'un gène d'intérêt dans des chondrocytes issus d'une même mise en culture à des stades de

différenciation différents ou stimulés par un composé à des doses différentes). Les données sont considérées comme statistiquement significatives pour des valeurs de p inférieures à 0,05.

4.2 Analyses statistiques du microarray

Les analyses statistiques du microarray ont été réalisées par nos collaborateurs des équipes de biostatistique et de bioinformatique de l'Institut de Recherches Servier. Une synthèse simplifiée de ces analyses sera décrite dans les résultats de ce manuscrit.

Résultats

1. Etude du remodelage de la jonction ostéochondrale chez les patients arthrosiques

Au cours de l'arthrose (OA), les stimuli et mécanismes moléculaires responsables du remodelage de la jonction ostéochondrale, et particulièrement du développement d'une angiogenèse, restent inconnus. En se basant sur les événements du processus d'ossification endochondrale, nous posons l'hypothèse que la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le cartilage arthrosique jouerait un rôle essentiel dans l'angiogenèse ostéochondrale. Le premier objectif de cette thèse a été de mettre en évidence le lien entre la différenciation hypertrophique et la vascularisation ostéochondrale dans le cartilage arthrosique humain.

1.1 Evaluation histologique de la sévérité de l'arthrose

L'évaluation histologique de l'arthrose a été réalisée selon un score dérivé de celui établi par Mankin (Mankin, H. et al. 1971) sur des coupes de genoux arthrosiques humains (n=90, 5 µm) de patients opérés à l'hôpital Saint-Antoine (AP-HP) pour une arthroplastie totale de genou. Le score de Mankin analyse sur des coupes colorées à la safranine O (marquage des protéoglycanes), au vert-lumière (collagènes) et à l'hématoxyline (noyaux cellulaires), la structure du cartilage, sa cellularité, son contenu en protéoglycanes et l'intégrité de la tidemark.

Au cours de la progression de l'arthrose, le cartilage articulaire va subir une désorganisation, caractérisée par des fibrillations et des fissurations. La densité cellulaire va également être modulée avec l'apparition d'une hypercellularité, puis d'une prolifération excessive entraînant la formation de clones, et enfin d'une hypocellularité, faisant suite à des processus d'apoptose des chondrocytes. Les protéoglycanes de la matrice extracellulaire du cartilage vont progressivement être dégradés avec le développement de l'arthrose et l'intégrité de la tidemark va être altérée par la présence de chenaux vasculaires qui la traversent. Ce dernier paramètre a été analysé séparément du score de Mankin par le comptage du nombre de chenaux vasculaires qui atteignent la tidemark (score de Mankin modifié).

L'analyse histologique de 90 coupes de cartilages arthrosiques (Figure 57) montre une corrélation positive et significative ($r = 0,249$, $p = 0,018$) entre la dégradation du cartilage, traduite par le score de Mankin modifié (SMm) et le nombre de chenaux vasculaires atteignant la tidemark (Figure 58).

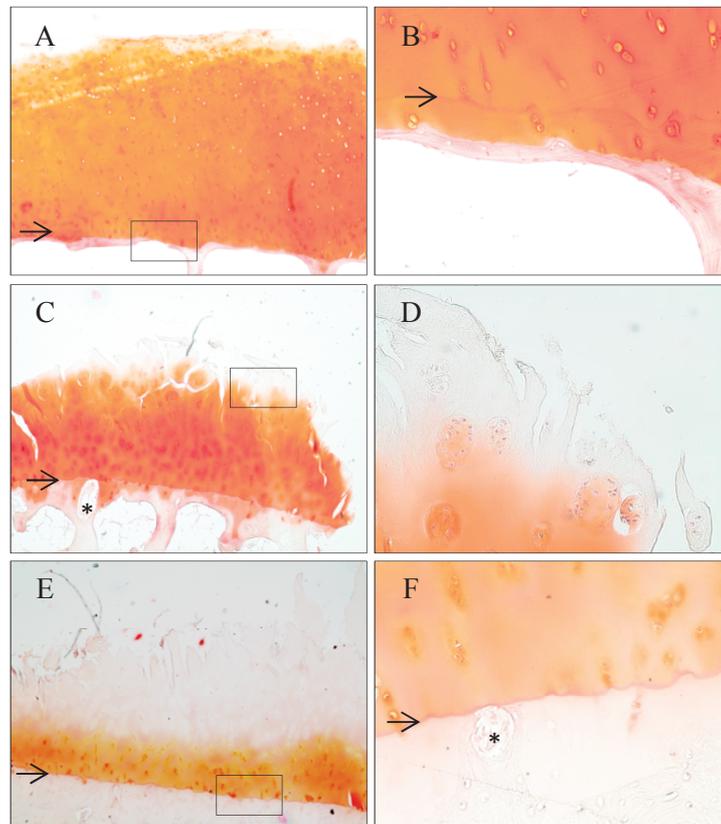


Figure 57: Photographies représentatives de l'aspect du cartilage articulaire selon le score de Mankin modifié (SMm).

(A-B) SMm = 2, (C-D) SMm = 7 et (E-F) SMm = 11. (A) Cartilage articulaire observé au grossissement x 40 : surface articulaire régulière, hypercellularité diffuse et légère diminution de la coloration à la safranine O. (B) Agrandissement (x 200) au niveau des couches profondes du cartilage de la coupe A : intégrité de la tidemark (→) observée. (C) Fissures jusqu'à la zone intermédiaire du cartilage, organisation cellulaire en clones et diminution modérée du marquage à la safranine O (x 40). Des chenaux vasculaires (*) traversant la tidemark sont également observés. (D) Agrandissement (x 200) au niveau des clones cellulaires de la surface articulaire de la coupe C. (E) Fissures jusqu'à la zone calcifiée du cartilage, hypocellularité et diminution sévère du marquage à la safranine O (x 40). (F) Agrandissement (x 200) au niveau de la tidemark de la coupe E traversée ici par une structure vasculaire (*).

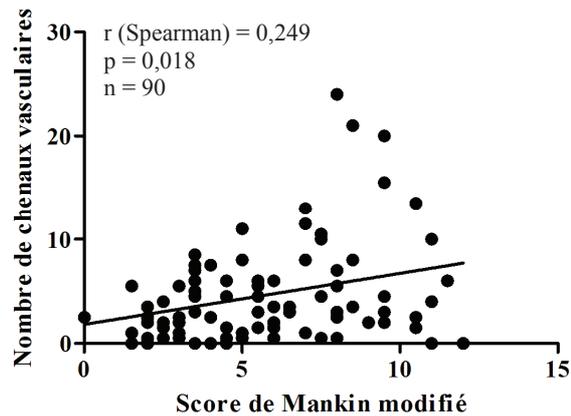


Figure 58: Corrélation entre le nombre de chenaux vasculaires à la jonction ostéocondrale et la sévérité de l’arthrose chez des patients ayant subi une arthroplastie totale de genou.

La sévérité de l’arthrose est représentée par le score de Mankin modifié (SMm), évalué sur des coupes histologiques de cartilages articulaires OA (n=90).

1.2 Evaluation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes

La présence des chondrocytes hypertrophiques dans le cartilage a été déterminée par un immunomarquage de l’ostéocalcine (OC). L’intensité et la répartition du marquage OC ont été définies par un score de 0 à 4 sur les coupes de cartilages arthrosiques, par comparaison à un contrôle négatif (IgG isotype) (Figure 59).

Un marquage positif est détecté dans l’os, au niveau des ostéoblastes/ostéocytes qui expriment physiologiquement l’OC. Dans un cartilage articulaire présentant un stade précoce d’arthrose (SMm = 2), l’immunomarquage OC se révèle faible (score = 1), principalement concentré dans les couches les plus profondes du cartilage articulaire calcifié et non calcifié (Figure 59D). A l’inverse, dans un cartilage présentant une arthrose modérée (SMm = 7), un marquage OC intense (score = 4) est observé dans l’ensemble du cartilage, dans les chondrocytes des couches superficielles formant des clusters, ainsi que dans les couches intermédiaires et profondes (Figure 59E). A un stade d’arthrose plus avancé (SMm = 9), un immunomarquage OC plus faible (score = 1,5) est mis en évidence, associé aux chondrocytes hypertrophiques du cartilage calcifié mais aussi aux chondrocytes en surface et en profondeur du cartilage articulaire (Figure 59F).

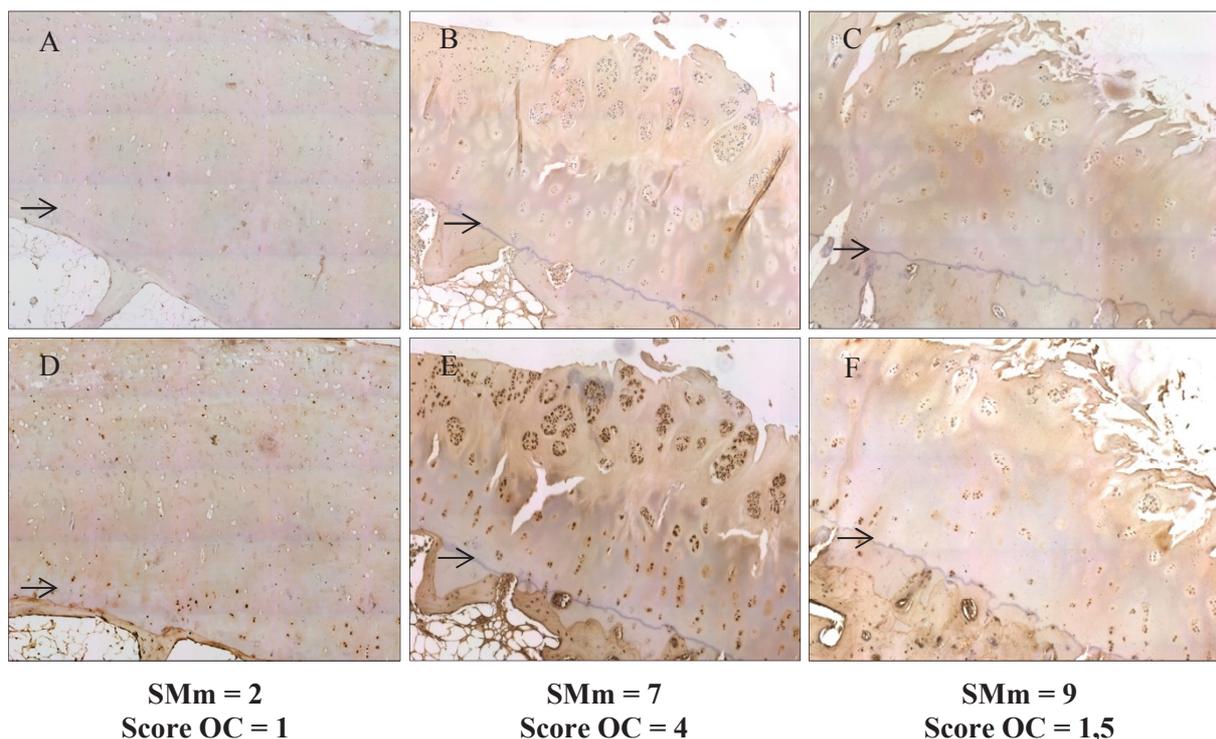


Figure 59: Evaluation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes à des stades évolutifs d'arthrose.

Immunohistochimie de l'OC sur des coupes de cartilages OA à différents stades d'arthrose : arthrose légère (SMm = 2), modérée (SMm = 7) et sévère (SMm = 9). (A-B-C) correspondent au marquage par l'IgG isotype (IgG1 de souris) et (D-E-F) au marquage OC sur des coupes de cartilages de patients à différents stades d'OA. Le score de marquage OC attribué à chaque coupe de cartilage (n=33) correspond à la moyenne du score déterminé par deux observateurs indépendamment. (D) SMm de 2 et score OC de 1. Le marquage OC est principalement localisé dans les couches profondes du cartilage calcifié et non calcifié, délimitées par la tidemark (→). (E) SMm de 7 et score OC de 4. Un marquage OC intense est présent dans les chondrocytes organisés en clusters à la surface du cartilage articulaire et dans les couches intermédiaires et profondes du cartilage non calcifié et calcifié. (F) SMm de 9 et score OC de 1,5. Un marquage modéré est observé dans les chondrocytes du cartilage calcifié ainsi que dans les chondrocytes en surface et en profondeur du cartilage articulaire. Ces photographies ont été prises au grossissement x40.

De manière intéressante, nous constatons que l'intensité du marquage de l'OC sur les coupes (n=33) est corrélée positivement au niveau de dégradation du cartilage chez ces patients arthrosiques ($r = 0,372$, $p = 0,033$) (Figure 60A).

En regroupant les patients selon leur stade d'arthrose (Figure 60B), en l'occurrence une arthrose légère (Score de Mankin modifié compris entre 1 et 4), modérée (SMm compris entre 4 et 8) et sévère (SMm supérieur à 8), nous observons une augmentation significative du marquage OC dans les chondrocytes des patients présentant une arthrose modérée par rapport

à une arthrose légère. En revanche, nous n'observons pas de différence significative pour le marquage OC entre les patients souffrant d'une arthrose modérée à sévère, avec une tendance à la diminution chez les patients à un stade d'arthrose plus avancé.

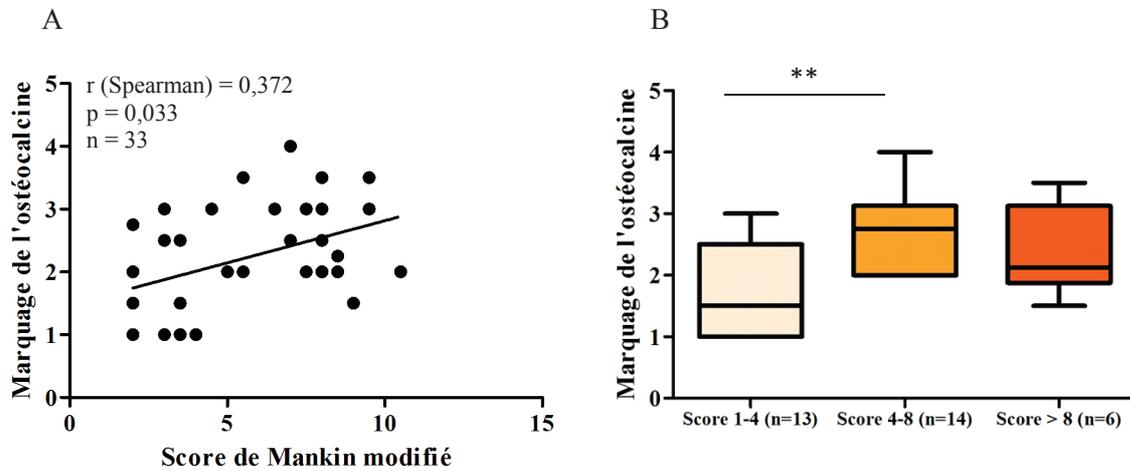


Figure 60: Corrélation entre la densité de chondrocytes hypertrophiques et la sévérité de l'arthrose sur les coupes de cartilages OA.

(A) La densité des chondrocytes hypertrophiques est évaluée par l'intensité de l'immunomarquage de l'OC et la sévérité de l'arthrose par le Score de Mankin modifié. (B) Quantification du marquage de l'ostéocalcine sur des coupes de cartilages, réparties en 3 groupes selon le stade d'arthrose : arthrose légère (SMm de 1 à 4), modérée (SMm de 4 à 8) et sévère (SMm supérieur à 8). La quantification a été réalisée sur un nombre total de 33 coupes de cartilages arthrosiques. Le score de marquage OC attribué à chaque coupe correspond à la moyenne du score déterminé par deux observateurs indépendamment. ** $p < 0,01$.

Ces résultats suggèrent donc un lien entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes du cartilage articulaire et la progression de l'arthrose chez les patients.

1.3 Evaluation de la vascularisation ostéochondrale

Le nombre de chenaux vasculaires dépassant la tidemark et envahissant le cartilage non calcifié a été déterminé par un immunomarquage de CD34 sur les coupes de cartilages arthrosiques (Figure 61), utilisées précédemment pour l'immunomarquage de l'OC.

La corrélation positive entre la dégradation du cartilage et le nombre de chenaux vasculaires qui atteignent la tidemark (Figure 58, $n=90$) est toujours observée pour ces 33 coupes analysées ($r = 0,343$, $p = 0,050$, $n=33$). Nous constatons une tendance à l'augmentation du nombre de chenaux vasculaires dépassant la tidemark sur les coupes de cartilages des patients atteints d'une arthrose modérée à sévère (SmM supérieur à 4) par rapport à celles des patients atteints d'une arthrose légère. Ces résultats n'atteignent pas la

significativité statistique en raison de la grande variabilité entre les patients OA (Figure 61). Dans un cartilage articulaire peu dégradé et peu vascularisé (SMm compris entre 1 et 4), l'immunomarquage OC reste relativement faible (Figures 60B et 61B). A l'inverse, dans un cartilage présentant une arthrose plus avancée et une vascularisation plus développée (SMm supérieur à 4), l'immunomarquage OC augmente significativement. Néanmoins, nous ne démontrons pas de corrélation directe entre la vascularisation ostéochondrale et l'intensité de l'immunomarquage OC (Figure 62).

L'ensemble de ces résultats suggère donc un lien entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes, la vascularisation de la jonction ostéochondrale et la progression de l'arthrose chez les patients OA.

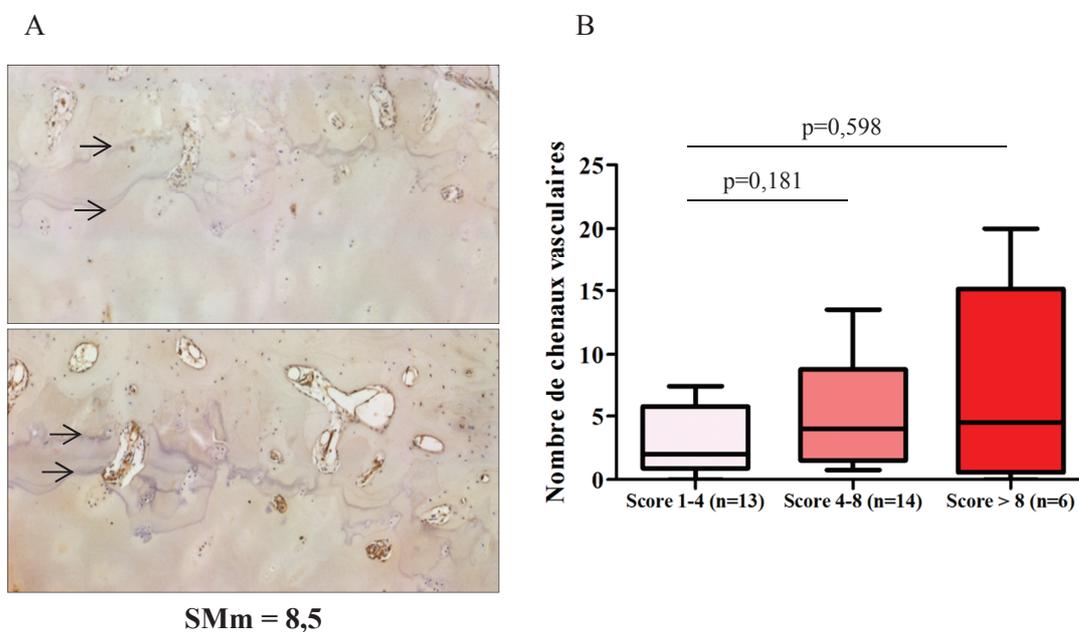


Figure 61: Evaluation de la vascularisation ostéochondrale à des stades évolutifs d'arthrose.

(A) Immunohistochimie de CD34 sur une coupe de cartilage OA à un stade d'arthrose sévère (SMm = 8,5). La photographie du haut correspond au marquage par l'IgG isotype (IgG1 de souris) et celle du bas au marquage CD34 à la jonction ostéochondrale. Une duplication de la tidemark (→) est nettement observée sur cette coupe de cartilage OA. Le nombre total de chenaux vasculaires identifiés par leur marquage CD34 a été déterminé sur chaque coupe de cartilage (n=33). Les résultats représentés correspondent à la moyenne du comptage de deux observateurs indépendamment. (B) Quantification du nombre de chenaux vasculaires à la jonction ostéochondrale dans les coupes de patients arthrosiques, réparties en 3 groupes selon le stade d'arthrose : arthrose légère (SMm de 1 à 4), modérée (SMm de 4 à 8) et sévère (SMm supérieur à 8).

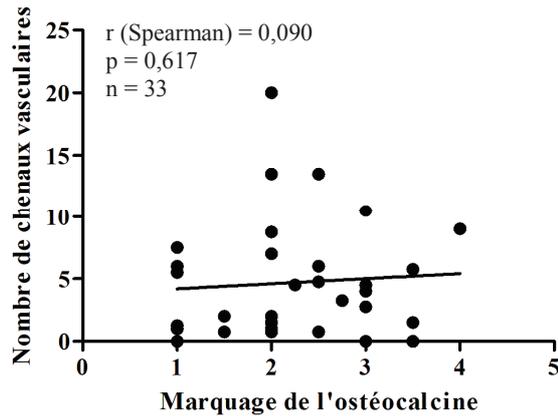


Figure 62: Corrélation entre le nombre de chenaux vasculaires à la jonction ostéochondrale et la densité de chondrocytes hypertrophiques sur des coupes histologiques de cartilages OA.

La quantification a été réalisée sur un nombre total de 33 coupes de cartilages arthrosiques.

1.4 Discussion

Ces résultats sont en accord avec des travaux de la littérature, qui ont décrit la présence de chondrocytes hypertrophiques chez les patients arthrosiques (Von der Mark, K. et al. 1992, Kirsch, T. et al. 2000, Pullig, O. et al. 2000a) et la mise en évidence d'une vascularisation ostéochondrale, associée à la sévérité de l'arthrose et au score clinique de la pathologie (Shibakawa, A. et al. 2005, Walsh, D. A. et al. 2007).

Hormis les travaux de l'équipe d'Yves Henrotin, peu d'études se sont intéressées au lien pouvant exister entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques et l'angiogenèse ostéochondrale accrue au cours de la pathologie (Pesesse, L. et al. 2011, 2013 et 2014). Au vu de nos résultats, nous pouvons penser que la différenciation hypertrophique, intensifiée dans les stades d'arthrose modérée (SMm entre 4 et 8), accélérerait la progression de l'arthrose vers des stades plus sévères en accroissant la vascularisation ostéochondrale. Cependant, nous n'observons pas de différence significative dans la quantification de la densité de chondrocytes hypertrophiques entre les stades d'arthrose modérée (SMm entre 4 et 8) et sévère (SMm supérieur à 8). Ceci pourrait être expliqué d'une part, par la diminution du nombre de cellules par apoptose dans les stades les plus sévères de la pathologie et d'autre part, par la réduction de la surface de cartilage articulaire, rendant la détection du marquage OC plus rare sur les coupes. Néanmoins, ces observations nous indiquent que la différenciation hypertrophique des chondrocytes est un mécanisme qui apparaît précocement au cours de l'arthrose, pouvant ainsi constituer un processus inducteur d'une angiogenèse ostéochondrale.

Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation directe entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes et la vascularisation ostéochondrale chez ces patients arthrosiques, ce qui nous suggère que ces mécanismes pourraient apparaître à des fenêtres de temps différentes. Roach et al. ont discuté de l'existence d'un tel découplage au cours de la formation du centre d'ossification secondaire dans l'épiphyse de lapin, où ils ont montré un processus d'angiogenèse réactionnaire à la présence de chondrocytes hypertrophiques (Roach, H. I. et al. 1998).

L'administration de molécules aux propriétés anti-angiogéniques dans des modèles animaux d'arthrose induite expérimentalement a démontré une amélioration de la sévérité de la pathologie (Nagai, T. et al. 2014, Zhang, X. et al. 2016a). Cependant, les acteurs moléculaires impliqués dans l'angiogenèse ostéochondrale restent encore mal connus. Des études *in vitro* sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes de différenciation hypertrophique des chondrocytes et la dérégulation de molécules potentiellement impliquées dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale.

2. Développement de modèles *in vitro* de différenciation hypertrophique de chondrocytes

De nombreux modèles *in vitro* de chondrocytes hypertrophiques ont été développés ces dernières décennies dans le but de créer des systèmes expérimentaux simplifiés permettant d'étudier les bases moléculaires de la minéralisation du cartilage au cours du processus d'ossification endochondrale. Toutefois, les modèles cellulaires disponibles pour étudier cette différenciation hypertrophique ne sont que partiellement appropriés car certains conduisent à une rapide dédifférenciation des chondrocytes vers un phénotype fibroblastique, d'autres sont plutôt éloignés des conditions physiologiques et/ou n'aboutissent pas à la calcification des cultures.

➤ Chondrocytes de plaques de croissance

Les premiers modèles ont été développés à partir de cultures primaires de chondrocytes de plaques de croissance d'épiphyses ou de côtes de rat, de lapin ou encore de poulet (Shimomura, Y. et al. 1975, Wu, L. N. 1989, Jikko, A. et al. 1993). Le phénotype hypertrophique de ces chondrocytes a été déterminé par la minéralisation des cultures et l'expression de marqueurs moléculaires, comme le collagène de type II et l'aggrécane diminués avec la différenciation, alors que le collagène de type X était augmenté. Dans ce type de culture la population cellulaire initiale est hétérogène, présentant différents stades de différenciation, selon les zones isolées de la plaque de croissance. Ce modèle rend ainsi difficile la caractérisation précise de chaque phénotype chondrocytaire.

➤ Lignées cellulaires chondrogéniques

Il y a 20 ans, le premier modèle de chondrocytes hypertrophiques obtenus à partir d'une lignée cellulaire chondrogénique murine ATDC5 est décrit (Shukunami, C. et al. 1997). Il s'agit d'une lignée issue d'un tératocarcinome (lignée AT805) (Atsumi, T. et al. 1990). Sous des conditions de culture appropriées, notamment un air ambiant contenant 3% de CO₂ et un milieu enrichi en insuline, transferrine, sodium sélénite (ITS), les cellules ATDC5 initient la minéralisation de leur matrice extracellulaire (MEC). Le β -glycérophosphate (entre 4 et 20 mM), habituellement ajouté dans les milieux de culture pour stimuler le mécanisme de minéralisation (Leboy, P. S. et al. 1989) n'est pas nécessaire pour les cellules ATDC5, qui ont la capacité de minéraliser leur MEC sans apport exogène de β -glycérophosphate. Cette lignée cellulaire permet d'étudier alternativement les caractéristiques des chondrocytes à des phases

précoces et tardives de différenciation, contrairement aux chondrocytes isolés de plaques de croissance. Cette particularité fait de la lignée chondrogénique ATDC5 un modèle d'intérêt pour l'étude des mécanismes moléculaires de la différenciation hypertrophique et plus généralement, de l'ossification endochondrale. Toutefois, son identité de lignée l'éloigne par définition des conditions physiologiques.

➤ **Effet d'un stress inflammatoire sur l'hypertrophie des chondrocytes**

Il existe des modèles de chondrocytes primaires stimulés par le TNF- α (Loeser, R. F. 2010, Goldring, M. B. et al. 2011), dans lesquels les chondrocytes acquièrent un phénotype « hypertrophic-like », traduit par une induction de l'expression de MMP-13, de la phosphatase alcaline, du collagène de type X et une inhibition de l'expression du collagène de type II et de l'aggrecane. Ces chondrocytes ne sont pas réellement engagés dans une voie de différenciation, ne minéralisent pas leur matrice, mais modulent l'expression de certains marqueurs de l'hypertrophie en réponse aigüe à un stress inflammatoire.

➤ **Culture de chondrocytes en 3D**

Des modèles de cultures de chondrocytes dans des gels d'agarose (Hunter, G. K. et al. 1993), de collagène (Chaipinyo, K. et al. 2002), sur des billes d'alginate (Pesesse, L. et al. 2013) ou encore dans des matrices synthétiques, appelées « scaffolds » (Sun, L. et al. 2011) sont également décrits. Il s'agit de modèles intéressants qui recréent un environnement tridimensionnel pour les chondrocytes, facilitant leur différenciation. Enfin, des modèles de culture de chondrocytes en culots ont été développés (Kato, Y. et al. 1988, Ballock, R. T. & Reddi, A. H. 1994, Yahara, Y. et al. 2016). Ces systèmes présentent l'avantage de maintenir à long terme les chondrocytes dans un état différencié et de favoriser la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines en chondrocytes (Mueller, M. B. & Tuan, R. S. 2008).

➤ **Chondrocytes articulaires en culture primaire**

Récemment, un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes articulaires de jeunes rats a été développé (Filip, A. et al. 2015) grâce à un milieu de culture contenant de l'insuline et de l'acide ascorbique. Malgré l'avantage certain d'utiliser des chondrocytes en culture primaire, ce modèle définit le stade de différenciation hypertrophique par l'expression de marqueurs de différenciation, sans étape de minéralisation.

Tous ces modèles ont permis une meilleure compréhension des évènements cellulaires et moléculaires, qui régulent la différenciation des chondrocytes au cours du processus d'ossification endochondrale. Ultérieurement, ces modèles ont initié l'étude du mécanisme de différenciation hypertrophique observé dans des conditions pathologiques, telles que l'arthrose. Cependant, par leurs limites et leurs inconvénients présentés précédemment, aucun modèle n'est actuellement en mesure de permettre une caractérisation fine des phénotypes de chondrocytes retrouvés physiologiquement dans la plaque de croissance et dans le cartilage articulaire. Par une meilleure compréhension des différentes étapes de différenciation, à l'aide d'une caractérisation précise des phénotypes, il serait alors possible de mettre en évidence des acteurs moléculaires jouant des rôles essentiels dans la transition phénotypique des chondrocytes.

Dans ce but, notre équipe de recherche a souhaité développer son modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes articulaires murins en culture primaire. Ces chondrocytes devraient être capables de synthétiser leur matrice extracellulaire afin de recréer un environnement interactif entre les cellules et leur MEC, nécessaire à la physiologie du cartilage *in vivo*.

2.1 Développement d'un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes murins en culture primaire

2.1.1 Optimisation du protocole expérimental

La mise en place de notre protocole de différenciation hypertrophique sur différentes cultures a révélé une diminution de l'expression des marqueurs chondrocytaires et une augmentation de ceux liés à l'hypertrophie. Cependant des résultats peu reproductibles, notamment sur le degré de calcification des matrices extracellulaires des chondrocytes hypertrophiques ont été constatés. De ce fait, notre premier objectif a été d'assurer la reproductibilité de ce modèle pour ensuite affiner la caractérisation des différents phénotypes de chondrocytes.

Nous souhaitons tout d'abord modifier le protocole afin d'obtenir un état de calcification homogène et reproductible parmi les cultures de chondrocytes hypertrophiques. Dans ce but, nous avons cherché à déterminer le meilleur composé phosphate à incorporer dans le milieu de différenciation pour induire une calcification optimale des cultures. Nous avons donc réalisé une gamme de concentrations de phosphate inorganique et de β -glycérophosphate à 2,5, 5, 7,5 et 10 mM. Nous avons ensuite évalué les capacités de minéralisation des matrices extracellulaires des chondrocytes après 2 semaines de culture dans les différentes conditions testées (Figure 63).

Grâce à une coloration au rouge alizarine, nous observons davantage de calcifications dans les matrices extracellulaires des chondrocytes cultivés dans un milieu de différenciation hypertrophique comprenant du β -glycérophosphate à 7,5 et 10 mM par rapport au phosphate inorganique (Figure 63A). Ces résultats sont confirmés par le dosage de la coloration par spectrophotométrie (Figure 63B). Nous constatons que la dose de 5 mM de β -glycérophosphate utilisée jusqu'à présent n'est pas suffisante pour induire une calcification après 2 semaines de culture dans ces conditions expérimentales.

De manière intéressante, nous constatons une diminution dose dépendante de la synthèse de thrombospondine 1 (TSP-1) dans les chondrocytes cultivés en présence de β -glycérophosphate (Figure 63C). La TSP-1 est un facteur aux propriétés anti-angiogéniques qui est reconnu pour diminuer au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans la plaque de croissance et dans le cartilage arthrosique (Tooney, P. A. et al. 1998, Pfander, D. et al. 2000). Dans cette culture, la synthèse de TSP-1 diminue simultanément avec l'augmentation de la calcification, induite par des doses croissantes de β -glycérophosphate.

Cette observation traduit donc l'influence du degré de calcification des chondrocytes sur leur phénotype.

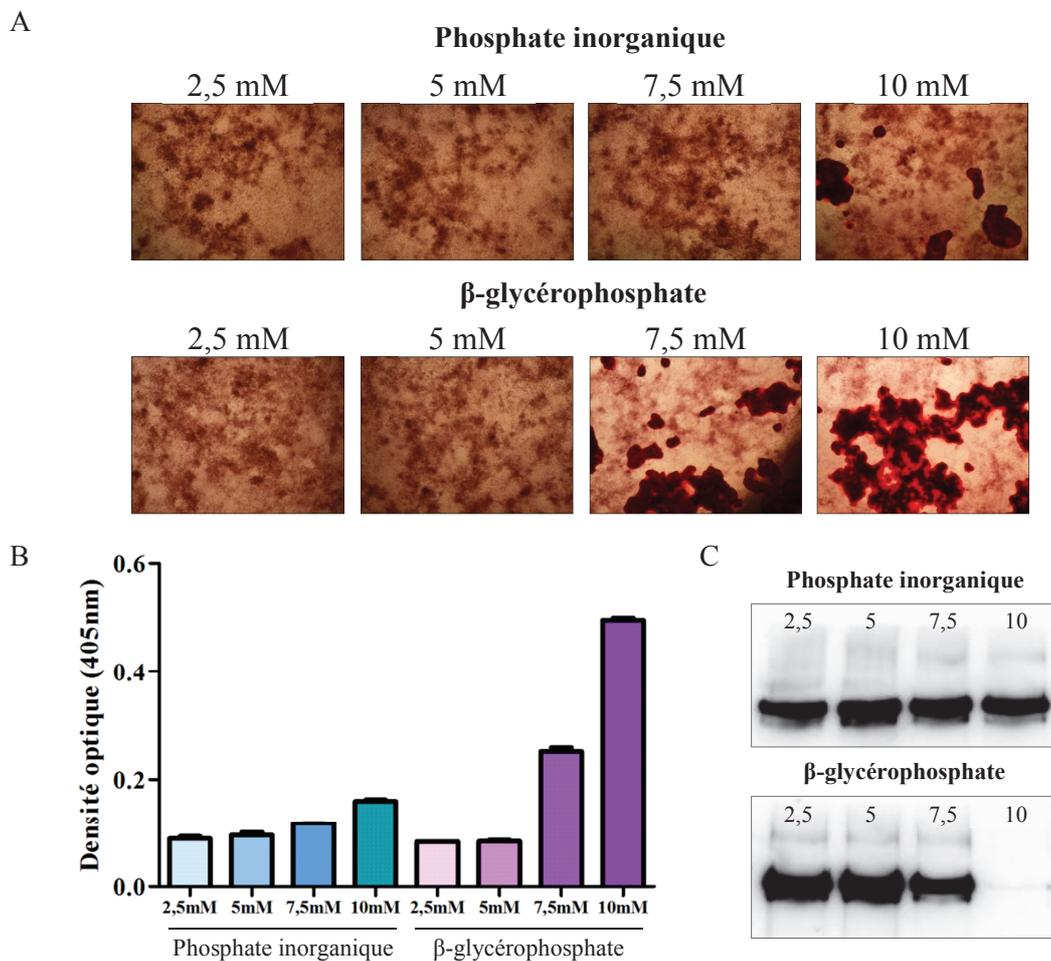


Figure 63: Comparaison des niveaux de calcifications des cultures par des doses croissantes de phosphate inorganique et de β -glycérophosphate.

(A) Photographies des calcifications colorées au rouge alizarine dans les MEC des chondrocytes murins cultivés en milieu de différenciation hypertrophique, comprenant du phosphate inorganique ou du β -glycérophosphate à 2,5, 5, 7,5 ou 10 mM. Photographies représentatives des calcifications observées dans 2 cultures indépendantes. (B) Dosage de la coloration au rouge alizarine pour chaque condition testée (n=1). La densité optique représentée est la moyenne de 3 mesures \pm SD pour une condition donnée. (C) Détection de la thrombospondine 1 (TSP-1) par Western blot dans les lysats cellulaires des chondrocytes cultivés dans le milieu de différenciation hypertrophique, contenant du phosphate inorganique ou du β -glycérophosphate aux doses croissantes étudiées (n=1).

Suite à ces résultats, nous avons étudié les effets à long terme sur la viabilité et la calcification de nouvelles cultures de chondrocytes (n=3), différenciés dans un milieu contenant du phosphate inorganique ou du β -glycérophosphate à 10 mM, sur une cinétique de 48 jours (Figure 64).

En dosant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les milieux des chondrocytes, prélevés tous les 6 jours, nous avons pu évaluer l'évolution de la mortalité au cours du protocole de différenciation hypertrophique (Figure 64A). A J0, correspondant à l'arrêt des chondrocytes pré-hypertrophiques et au passage en milieu de différenciation hypertrophique, nous détectons une activité basale de la LDH d'environ 0,52, ce qui est relativement faible par rapport à l'activité détectée en cas de mortalité cellulaire massive en présence de triton 2%, où la DO est proche de 3,7 (donnée non montrée). Après 6 jours de culture en milieu de différenciation hypertrophique, en présence de phosphate inorganique ou de β -glycérophosphate, nous constatons un pic d'activité de la LDH dans les milieux des 3 cultures de chondrocytes. Parallèlement à ce processus de mortalité cellulaire, une initiation de la calcification est observée par une augmentation du dosage de la coloration au rouge alizarine (Figure 64B). De manière intéressante, nous constatons une calcification graduelle dans les cultures en présence de phosphate inorganique et de β -glycérophosphate. Notons que les calcifications dans le protocole de différenciation contenant le phosphate inorganique semblent moins régulières et homogènes que celles obtenues en présence de β -glycérophosphate (Figure 64C), comme le suggèrent les pics de DO du dosage de la coloration au rouge alizarine (Figure 64B). Les photographies sont représentatives de l'existence d'un niveau de calcification hétérogène en présence de phosphate inorganique, selon le puits de culture. Ces calcifications ne résulteraient pas de mécanismes biologiques mais plutôt d'un phénomène de précipitation de minéraux (Suzuki, F. et al. 1991) dû à l'utilisation d'une concentration supra-physiologique de phosphate inorganique (Pucci, B. et al. 2007).

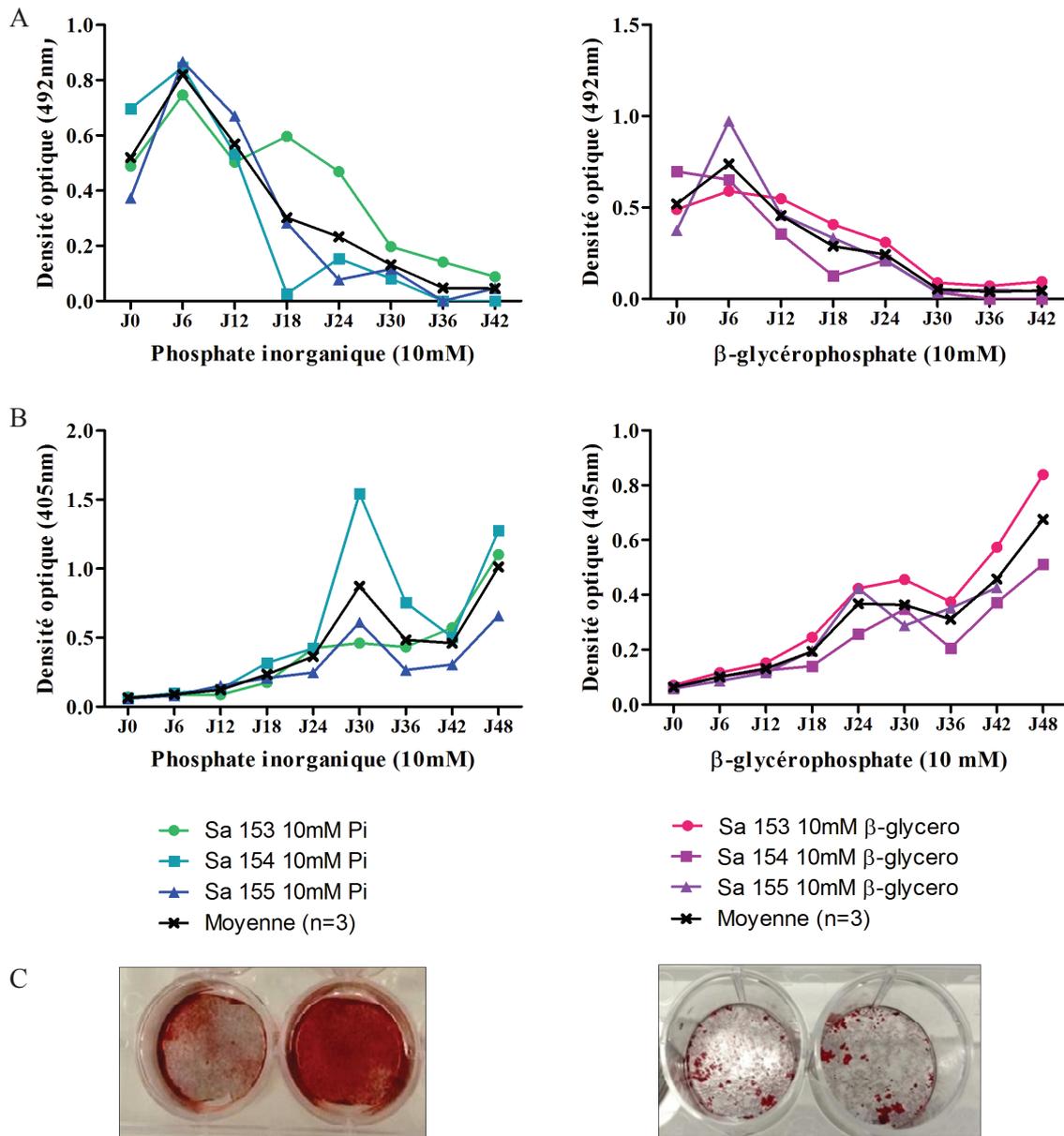


Figure 64: Cinétiques de mortalité des chondrocytes et de leur minéralisation en présence de 10 mM de phosphate inorganique ou de β -glycérophosphate pendant 48 jours.

(A) Evaluation de la mortalité des chondrocytes par un dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les milieux prélevés tous les 6 jours au cours du processus de différenciation hypertrophique en présence de phosphate inorganique à gauche et de β -glycérophosphate à droite (test LDH, densité optique mesurée à 492 nm). Chaque point représente la moyenne de 2 mesures. (B) Evaluation de la calcification des MEC des chondrocytes par un dosage de la coloration au rouge alizarine, réalisé tous les 6 jours au cours du processus de différenciation en présence de phosphate inorganique à gauche et de β -glycérophosphate à droite (densité optique mesurée à 405 nm). Chaque point représente la moyenne de 6 mesures (3 mesures par duplicat biologique (2 puits de culture)). (C) Photographies représentatives de la coloration au rouge alizarine des puits de culture de

chondrocytes en fin de différenciation hypertrophique en présence de phosphate inorganique à gauche et de β -glycérophosphate à droite.

Comme il est décrit dans la littérature (Mansfield, K. et al. 1999, Magne, D. et al. 2003), un phénomène de mortalité des chondrocytes participerait à l'initiation de la calcification des cultures de notre modèle. Le protocole de différenciation hypertrophique comportant du β -glycérophosphate apparait le plus adapté pour apporter une calcification graduelle et homogène des cultures en cours de différenciation. Parallèlement au critère de calcification, nous avons étudié le phénotype des chondrocytes en cours de différenciation en se basant, comme précédemment, sur la synthèse de TSP-1 dans les lysats cellulaires (Figure 65).

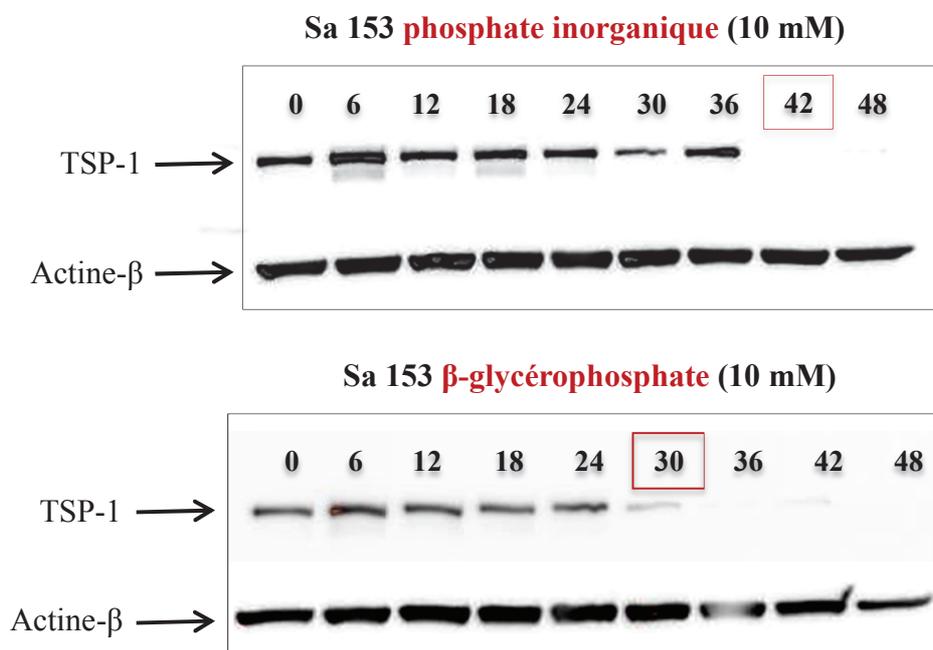


Figure 65: Synthèse de TSP-1 dans les chondrocytes en cours de différenciation hypertrophique en présence de phosphate inorganique et de β -glycérophosphate.

Détection de la TSP-1 par Western Blot à partir des lysats cellulaires des chondrocytes de J0, correspondant à l'arrêt des chondrocytes pré-hypertrophiques et du passage au milieu de différenciation hypertrophique, jusqu'à J48, correspondant à la fin du protocole. Ce Western Blot est représentatif des résultats obtenus pour les 3 cultures de chondrocytes réalisées simultanément. L'actine- β est utilisée comme témoin de charge.

Nous remarquons une nette diminution de la synthèse de TSP-1 à partir de J42 dans les lysats des chondrocytes cultivés en présence de 10 mM de phosphate inorganique et à partir de J30 en présence de β -glycérophosphate. Le milieu enrichi en β -glycérophosphate semble donc induire plus efficacement un phénotype hypertrophique dans ces cultures de chondrocytes, caractérisé dans cette étude par une minéralisation homogène des MEC et une diminution de la synthèse de TSP-1.

Afin de maximiser les chances de reproductibilité de notre protocole, nous avons opté pour une durée de différenciation hypertrophique de 42 jours, avec un milieu supplémenté en β -glycérophosphate, renouvelé tous les deux jours (Figure 66). La composition finale de ce milieu de différenciation est donc un milieu Ham's F-12 Nutrient Mixture (DMEM-HamF12), 4,5 g/L de glucose, SVF (5%), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 μ g/mL), L-glutamine (4 mM), insuline (5 μ g/mL) - transferrine (5 μ g/mL) - sodium sélénite (5 ng/mL) (ITS), hormone tri-iodothyronine (T3) (50 ng/mL) et extemporanément de l'acide ascorbique (vitamine C) (40 μ g/mL), acide rétinoïque (vitamine A) (10^{-7} M), 1,25-dihydroxyvitamine D3 (10^{-8} M) et du β -glycérophosphate (10 mM), en atmosphère 95% d'humidité et 3% de CO₂.

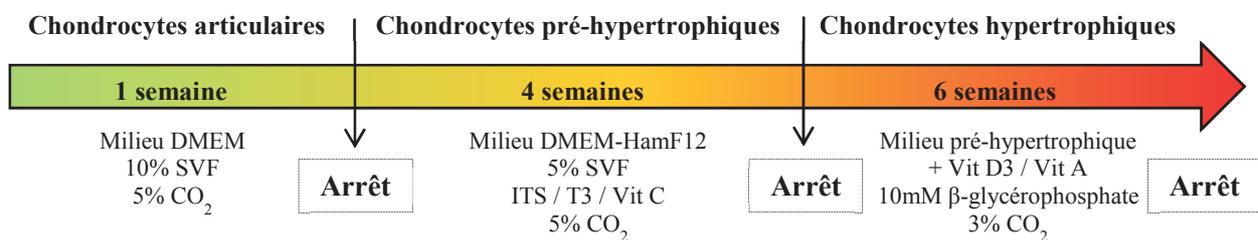


Figure 66: Schéma récapitulatif du protocole expérimental final (milieux de culture utilisés et durées d'incubation) du modèle de différenciation hypertrophique des chondrocytes articularies murins.

Notons une modification du temps d'incubation de 4 semaines (protocole initial) à 6 semaines (protocole final) en milieu de différenciation hypertrophique. La concentration en β -glycérophosphate a également été réhaussée de 5 mM à 10 mM.

2.1.2 Evaluation de la minéralisation de la matrice extracellulaire

La capacité de minéralisation des cultures (n=6) a été évaluée afin de vérifier l'état de différenciation des chondrocytes hypertrophiques à la fin du nouveau protocole expérimental. L'activité enzymatique basale de la phosphatase alcaline (PAL) mesurée dans les lysats des chondrocytes articularies est très faible, à la limite du seuil de détection (60,9 U/g de protéines) (Figure 67A). Ce défaut d'activité enzymatique est confirmé par cytochimie. Comme attendu, aucune calcification associée aux matrices extracellulaires des chondrocytes articularies n'est révélée par coloration au rouge alizarine (Figure 67B).

Dans les lysats des chondrocytes pré-hypertrophiques, une activité enzymatique très élevée de la PAL est mesurée, amplifiée de près de 100 fois par rapport à son activité basale. Cette activité est confirmée par cytochimie. Toutefois, aucune calcification n'est observée par coloration au rouge alizarine.

A l'inverse, dans les lysats des chondrocytes hypertrophiques, présentant une activité enzymatique de la PAL similaire à celle détectée dans les chondrocytes pré-hypertrophiques, une minéralisation des cultures est mise en évidence par une coloration intense au rouge alizarine, révélant les cristaux de phosphate de calcium.

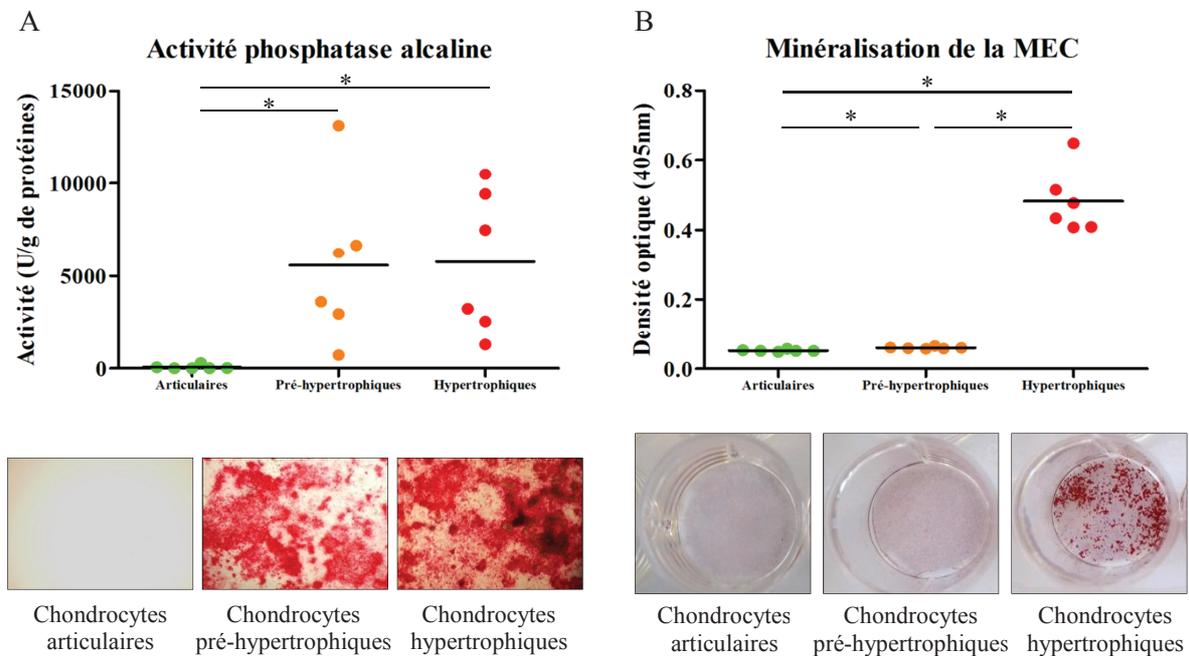


Figure 67: Evaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et du potentiel de minéralisation des matrices extracellulaires des chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

(A) L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline a été dosée dans les lysats cellulaires des chondrocytes (n=6). Cette activité est visualisée par cytochimie sur les matrices extracellulaires préalablement fixées au paraformaldéhyde (PFA) 3,7%. Photographies représentatives de 4 expériences indépendantes. (B) Dosage du degré de minéralisation des matrices des chondrocytes après coloration au rouge alizarine, visualisée sur les photographies des puits de culture (n=6). Photographies représentatives de 6 expériences indépendantes.* p<0,05.

2.1.3 Caractérisation des profils d'expression génique des chondrocytes murins

Nous avons réalisé une analyse moléculaire par PCR quantitative de l'expression de gènes reconnus comme étant des marqueurs chondrocytaires et des marqueurs de l'hypertrophie. Les chondrocytes articulaires cultivés dans le milieu de croissance présentent une forte expression des gènes codant le facteur de transcription Sox9, le collagène de type II (Col2a1), l'aggrécane (Acan) et la chondromoduline I (ChM-I), qui sont des marqueurs caractéristiques des chondrocytes articulaires (Figure 68 & Tableau 15). Au cours de la différenciation hypertrophique, ces gènes voient leur expression s'effondrer au profit de

l'expression de gènes de l'hypertrophie, initialement peu exprimés (Figure 69 & Tableau 16), tels que l'indian hedgehog (Ihh), le facteur de transcription Runx2, le collagène de type X (Col10), l'ostéocalcine (mOC), la métalloprotéase matricielle 13 (Mmp13), l'ostérix (Osx) et la phosphatase alcaline (TNAP).

Les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques présentent des profils d'expression significativement différents pour les gènes codant le collagène de type II et la chondromoduline I, dont les expressions sont davantage inhibées au stade de différenciation hypertrophique, respectivement d'environ 9,2 et 3,4 fois. L'expression de l'aggrécane présente également une tendance à la diminution au cours de l'hypertrophie. A l'inverse, les gènes codant Runx2, le collagène de type X et l'ostéocalcine ont une expression significativement augmentée, respectivement d'en moyenne 1,5, 2,4 et 10,9 fois dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux pré-hypertrophiques (Figure 69).

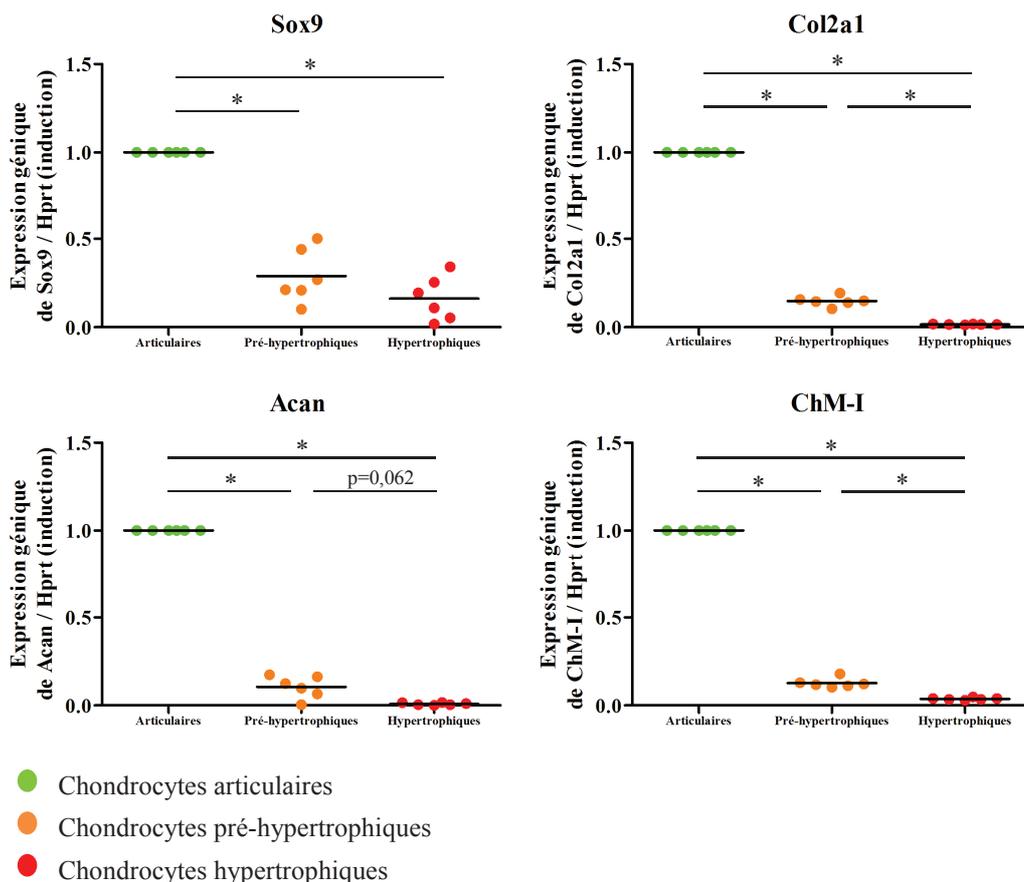


Figure 68: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs chondrocytaires dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes murins arrêtés à trois stades de différenciation, les chondrocytes articulaires (●) (1 semaine de culture jusqu'à confluence), les chondrocytes pré-hypertrophiques (●) (4 semaines supplémentaires de culture) et les chondrocytes hypertrophiques (●) (6 semaines supplémentaires de culture). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport aux chondrocytes articulaires, dont l'expression basale est normalisée à 1. Le gène Hprt est le gène de référence de ces expériences. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

ARNm	Sox9	Col2a1	Acan	ChM-I
Ct articulaires	24,4	15,5	22,4	18,8

Tableau 15: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).

Ces valeurs correspondent au nombre de cycles de PCR quantitative à partir duquel l'expression des gènes est détectée dans les échantillons. Ces données permettent d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les chondrocytes articulaires, qui nous servent de condition contrôle, dont l'expression est normalisée à 1 dans cette étude.

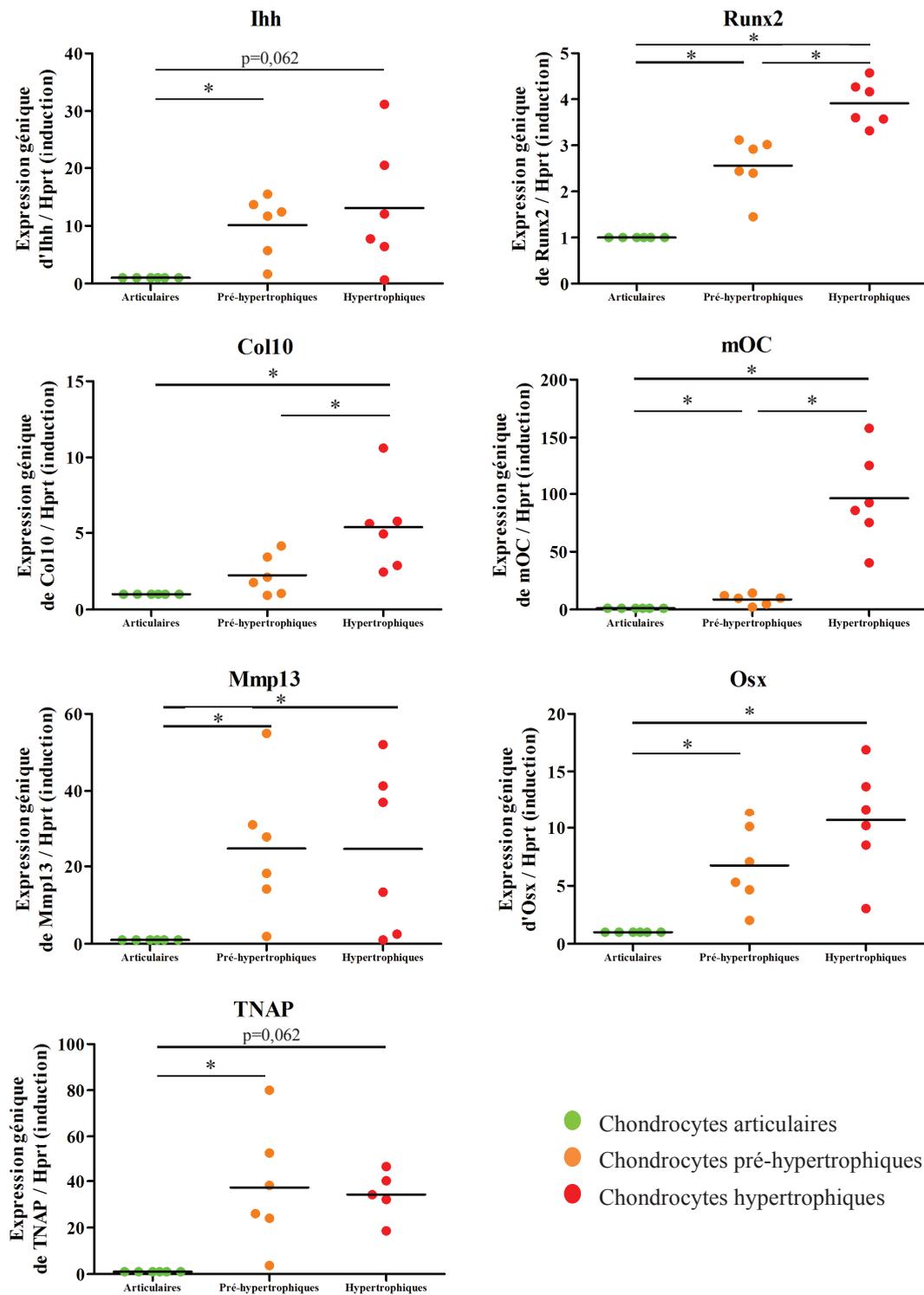


Figure 69: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs de la différenciation hypertrophique dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes murins arrêtés à trois stades de différenciation, les chondrocytes articulaires (●), pré-hypertrophiques (●) et hypertrophiques (●). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport aux chondrocytes articulaires, dont l'expression basale est normalisée à 1. Le gène Hprt est le gène de référence de ces expériences. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

ARNm	Ihh	Runx2	Col10	mOC	Mmp13	Osx	TNAP
Ct articulaires	34,1	25,3	31,4	34,9	25,2	27,5	26,3

Tableau 16: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).

Ces valeurs correspondent au nombre de cycles de PCR quantitative à partir duquel l'expression des gènes est détectée dans les échantillons. Ces données permettent d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les chondrocytes articulaires, qui nous servent de condition contrôle, dont l'expression est normalisée à 1 dans cette étude.

En conclusion, ces résultats montrent que les chondrocytes cultivés dans le milieu de différenciation hypertrophique présentent un phénotype hypertrophique, d'une part, par leur capacité de minéraliser leur MEC et d'autre part, par leur profil d'expression génique de marqueurs de l'hypertrophie. Notre modèle permet donc d'obtenir des chondrocytes à 3 stades distincts de différenciation : des chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

Ainsi, ce modèle cellulaire murin constitue un outil intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la transition phénotypique des chondrocytes articulaires vers des chondrocytes hypertrophiques. Grâce à ce modèle, nous pouvons rechercher des cibles impliquées dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes, qui pourraient jouer un rôle essentiel dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale.

2.2 Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains

Récemment, un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains a été développé par l'équipe de Yasuhito Yahara (Yahara, Y. et al. 2016). Il s'agit d'un modèle de culture en culots de chondrocytes articulaires humains, capables de minéraliser leur MEC au cours de leur hypertrophie. Nos nouveaux objectifs étaient donc de reproduire ce modèle au laboratoire, de le maîtriser et de l'utiliser afin de valider les cibles mises en évidence dans notre modèle murin.

2.2.1 Profil d'expression génique des chondrocytes humains

Dans leur étude, Yahara et al. n'ont pas évalué la régulation de l'expression des marqueurs de différenciation entre les chondrocytes en condition basale, au moment de la formation du culot et les chondrocytes cultivés en milieu chondrogénique et en milieu de

différenciation hypertrophique. Nous avons de ce fait étudié le profil d'expression génique de ces chondrocytes au cours de leur différenciation.

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt en condition basale reflètent la signature moléculaire des chondrocytes de chaque patient de l'étude avant la mise en place du protocole de différenciation hypertrophique. Initialement, ces chondrocytes présentent une forte expression des gènes codant le facteur de transcription SOX9, l'aggrécane (ACAN) et le collagène de type II (COL2A1) (Figure 70 & Tableau 17), mais montrent également une expression importante d'OSX et MMP13 (Figure 71 & Tableau 18). Rappelons que ces chondrocytes humains sont issus de cartilages arthrosiques, isolés à partir des zones articulaires d'apparence saine. Le contexte arthrosique pourrait donc expliquer les expressions basales d'OSX et MMP13 relativement élevées dans ces chondrocytes. Néanmoins, nous observons une variation de l'expression de ces gènes au cours de la différenciation hypertrophique.

En effet, les gènes caractéristiques des chondrocytes articulaires (SOX9, ACAN et COL2A1) voient leur expression s'effondrer au cours de leur différenciation (Figure 70). Après 2 semaines de culture en milieu de différenciation hypertrophique, les expressions de SOX9, d'ACAN et COL2A1 sont davantage diminuées, respectivement de près de 3, 2,5 et 1,4 fois par rapport au milieu chondrogénique (peu visualisables d'après l'échelle du graphique).

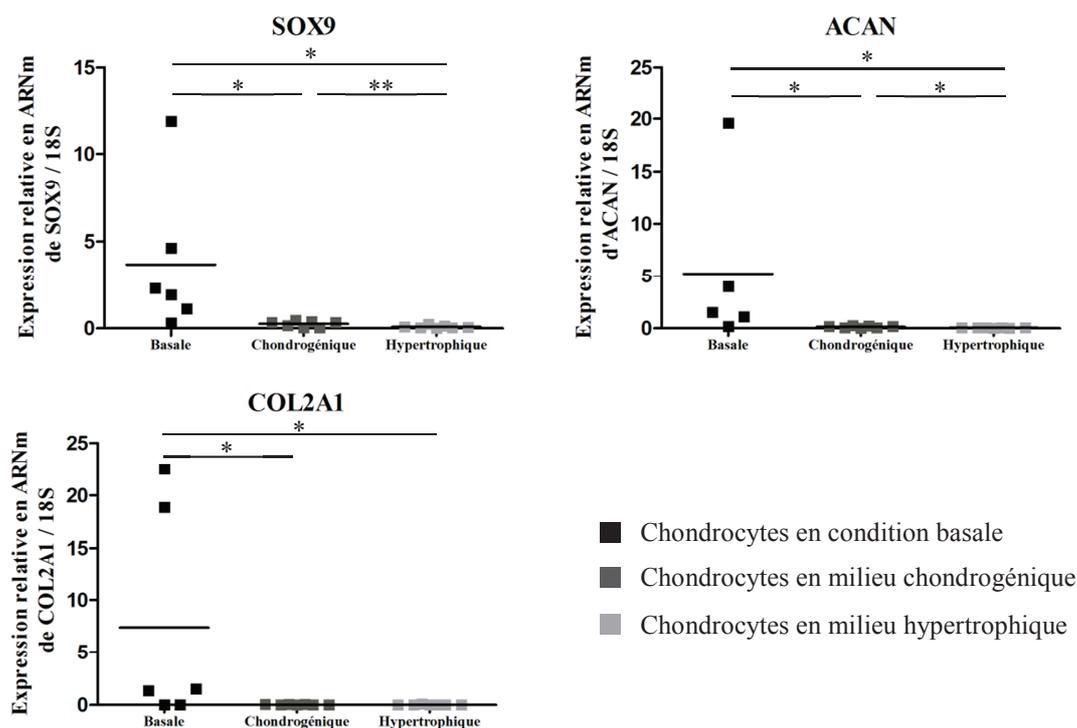


Figure 70: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs chondrocytaires dans les chondrocytes humains cultivés en milieu de différenciation chondrogénique et hypertrophique.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes articulaires humains cultivés en culots, arrêtés à trois stades de culture. Tout d'abord au moment de la formation du culot cellulaire, reflétant l'expression des gènes d'intérêt chez chaque patient avant la mise en place du protocole de différenciation hypertrophique, soit la condition dite basale (■). Ces culots sont ensuite cultivés en milieu chondrogénique (■) pendant 6 semaines puis en milieu de différenciation hypertrophique (■) pendant 2 semaines supplémentaires. L'expression des gènes est rapportée à l'expression du gène de référence 18S. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6 en condition basale, n=7 en milieu chondrogénique et hypertrophique). * p<0,05 et **p<0,001.

ARNm	SOX9	ACAN	COL2A1
Ct condition basale	25,4	24,9	27,5

Tableau 17: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).

Ces valeurs correspondent au nombre de cycles de PCR quantitative à partir duquel l'expression des gènes est détectée dans les échantillons. Ces données permettent d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les chondrocytes humains en condition basale.

A l'inverse, malgré une expression basale notable, les marqueurs de l'hypertrophie, tels que MMP13 et TNAP, voient leur expression significativement augmentée entre les chondrocytes cultivés en milieu chondrogénique et ceux cultivés en milieu de différenciation hypertrophique (Figure 71). En revanche, les gènes codant le facteur de transcription RUNX2 et l'ostérix (OSX) ne présentent pas de régulation particulière au cours de la différenciation hypertrophique. Notons l'augmentation significative de l'expression de la phosphatase alcaline (TNAP) dans les chondrocytes cultivés en milieu de différenciation hypertrophique. La capacité de minéralisation des culots a donc été évaluée afin de vérifier l'état de différenciation des chondrocytes.

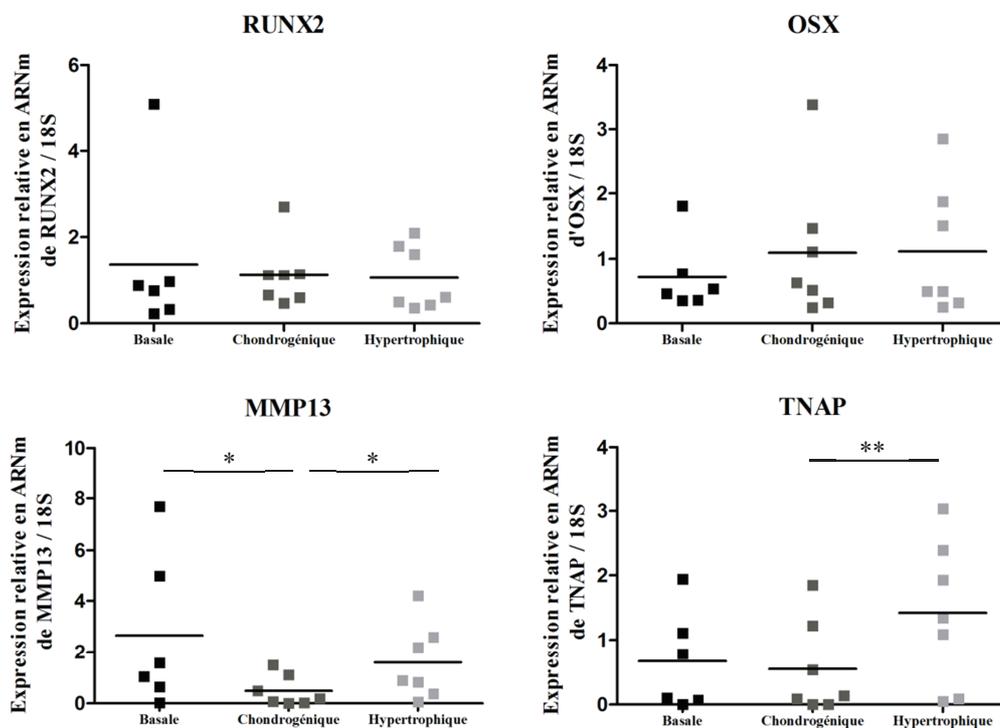


Figure 71: Caractérisation du profil d'expression génique des marqueurs de l'hypertrophie dans les chondrocytes humains cultivés en milieu de différenciation chondrogénique et hypertrophique.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes articulaires humains cultivés en culots, arrêtés à trois stades de culture. Tout d'abord au moment de la formation du culot cellulaire, reflétant l'expression des gènes d'intérêt chez chaque patient avant la mise en place du protocole de différenciation hypertrophique, soit la condition dite basale (■). Ces culots sont ensuite cultivés en milieu chondrogénique (■) pendant 6 semaines puis en milieu de différenciation hypertrophique (■) pendant 2 semaines supplémentaires. L'expression des gènes est rapportée à l'expression du gène de référence 18S. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6 en condition basale, n=7 en milieu chondrogénique et hypertrophique). * p<0,05 et **p<0,001.

ARNm	RUNX2	OSX	MMP13	TNAP
Ct condition basale	33,1	24,8	24,7	32,6

Tableau 18: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).

Ces valeurs correspondent au nombre de cycles de PCR quantitative à partir duquel l'expression des gènes est détectée dans les échantillons. Ces données permettent d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les chondrocytes humains en condition basale.

2.2.2 Evaluation de la minéralisation des matrices extracellulaires des culots

Deux techniques ont été utilisées pour mettre en évidence les calcifications dans les culots de chondrocytes humains ; une coloration au rouge alizarine et une coloration von Kossa (Figure 72).

Nous n'observons aucune calcification dans la matrice des chondrocytes cultivés en milieu chondrogénique, quel que soit le type de coloration utilisée (Figure 72A-B). La coloration au rouge alizarine présente l'inconvénient de créer un effet de bruit de fond par une coloration non spécifique des noyaux des chondrocytes et de certains composés de la matrice.

Dans un culot de chondrocytes cultivés en milieu de différenciation hypertrophique, nous constatons des zones marquées en noir par la coloration von Kossa, révélant la présence de dépôts de calcium (Figure 72C). Nous obtenons un résultat similaire à ce qui a été présenté par l'équipe qui a développé ce modèle (Yahara, Y. et al. 2016). La coloration au rouge alizarine reste à nouveau difficile à interpréter en raison du bruit de fond important engendré par la technique (Figure 72D).

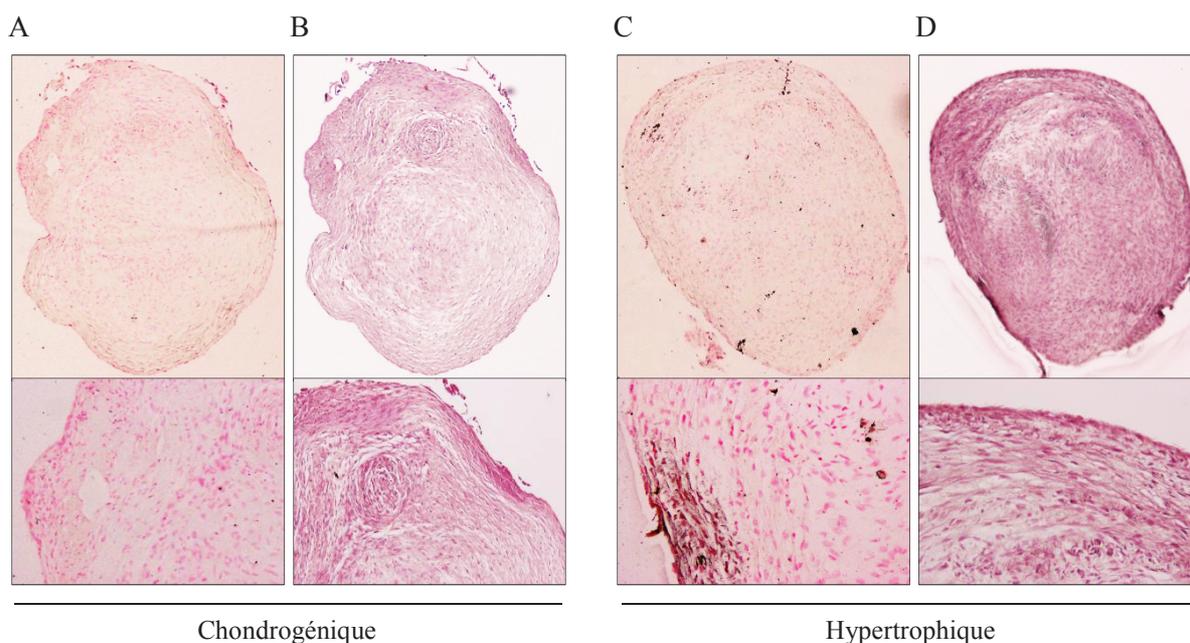


Figure 72: Evaluation du potentiel de minéralisation de la matrice extracellulaire d'un culot de chondrocytes humains cultivés en milieu chondrogénique puis en milieu de différenciation hypertrophique.

Photographie représentative d'un culot de chondrocytes humains cultivés en milieu chondrogénique coloré (A) au von Kossa (contre-coloration au nuclear fast red) et (B) au rouge alizarine (grossissement x40). La partie inférieure de la figure est une photographie du culot observé à un grossissement supérieur (x200). Photographie représentative de l'évolution du culot cultivé en milieu de différenciation hypertrophique coloré (C) au von Kossa (contre-coloration au nuclear fast red) et (D) au rouge alizarine. Les colorations ont été réalisées sur des culots de chondrocytes préalablement fixés au PFA 3,7%, provenant d'un même patient OA, cultivés en milieu chondrogénique puis en milieu de différenciation hypertrophique (n=1).

En conclusion, ces résultats montrent que les chondrocytes humains cultivés dans le milieu de différenciation hypertrophique présentent des caractéristiques de chondrocytes hypertrophiques, en exprimant d'une part des marqueurs de l'hypertrophie et en calcifiant d'autre part leur matrice. Ce modèle cellulaire humain constitue donc un outil intéressant pour valider nos études réalisées dans notre modèle murin.

2.3 Discussion des modèles

2.3.1 Modèle murin

L'hypertrophie des chondrocytes est un processus physiologique observé au cours de l'ossification endochondrale pendant le développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte chez l'Homme. Ce mécanisme peut également être réactivé au cours de conditions pathologiques, telles que l'arthrose. Dans le but de mieux comprendre les différentes étapes

de différenciation des chondrocytes, nous avons développé au laboratoire un modèle original de différenciation hypertrophique à partir de cultures primaires de chondrocytes articulaires de souriceaux. Ainsi, ce modèle permet l'obtention de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques à partir de chondrocytes articulaires.

L'originalité de notre modèle relève de la capacité des chondrocytes hypertrophiques, différenciés à partir de chondrocytes articulaires, à calcifier leur matrice extracellulaire en culture primaire. De plus, le stade pré-hypertrophique n'a jamais été décrit dans d'autres modèles *in vitro* à ce jour. Le milieu de culture de différenciation pré-hypertrophique (DMEM-HamF12, SVF (5%), ITS et acide ascorbique) est le milieu de culture utilisé pour la lignée chondrogénique ATDC5, qui a la capacité de récapituler l'ensemble des phénotypes chondrocytaires des phases précoce et tardive de différenciation (Shukunami, C. et al. 1997). L'insuline permet de maintenir le phénotype hypertrophique des cellules en culture. Les hormones thyroïdiennes et notamment l'hormone tri-iodothyronine (T3), inhibent la prolifération des chondrocytes, favorisent la différenciation hypertrophique des chondrocytes de la plaque de croissance, stimulent l'activité de la phosphatase alcaline et l'expression du collagène de type X (Makihira, S. et al. 2003). L'acide ascorbique induit également l'expression de marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire (Altaf, F. M. et al. 2006). Nos résultats montrent que les chondrocytes cultivés dans ce milieu diminuent leur expression des marqueurs chondrocytaires au profit de celle des marqueurs de la différenciation hypertrophique. Ce milieu ne permet pas la minéralisation de la matrice ; les chondrocytes ne sont donc pas hypertrophiques mais pré-hypertrophiques.

Cette étape de différenciation pré-hypertrophique est essentielle dans notre modèle. Si les chondrocytes articulaires, à confluence en milieu de croissance, sont directement cultivés en milieu de différenciation hypertrophique, la différenciation hypertrophique et la minéralisation des matrices ne sont pas observées. Le milieu de différenciation pré-hypertrophique permet durant 4 semaines la prolifération cellulaire et la formation d'amas de chondrocytes, ainsi que la synthèse d'une épaisse matrice extracellulaire. Dans ces chondrocytes pré-hypertrophiques, les amas cellulaires observés deviendront des zones minéralisées après une incubation en milieu de différenciation hypertrophique. Nous pourrions envisager, comme cela a été décrit pour les cellules ATDC5, qu'une condensation cellulaire est une étape indispensable à la calcification. Shukunami et al. ont décrit l'existence de nodules, comportant les chondrocytes hypertrophiques minéralisant leur matrice

(Shukunami, C. et al. 1997). Aucune minéralisation n'est observée dans les cultures d'ATDC5 en monocouche.

La minéralisation est obtenue lorsque les chondrocytes pré-hypertrophiques de notre modèle sont cultivés dans le milieu de différenciation supplémenté en β -glycérophosphate, acide rétinolique et 1,25-dihydroxyvitamine D3 dans une atmosphère à 3% CO₂. Ces conditions de culture favorisent la différenciation hypertrophique et la minéralisation de la matrice (Iwamoto, M. et al. 1993, Orfanidou, T. et al. 2012, Shukunami, C. et al. 1997). Un environnement enrichi en O₂ serait effectivement nécessaire à une minéralisation plus efficace. En condition *in vivo*, le cartilage calcifié subit une vascularisation progressive, conduisant à un apport de nutriments et d'O₂ au cours de l'ossification endochondrale. A l'inverse, la différenciation chondrogénique est favorisée en condition anaérobie au cours de la réparation du cartilage articulaire, suite à une fracture par exemple (Shapiro, F. et al. 1993). Nous pourrions envisager que le changement de concentration en CO₂ (de 5 à 3%) dans le protocole serait similaire au changement subi par les chondrocytes hypertrophiques au cours de l'ossification endochondrale. Enfin, une mortalité cellulaire au sein des amas chondrocytaires pourraient également favoriser la minéralisation de la matrice extracellulaire.

En définitive, les prérequis nécessaires à la minéralisation des chondrocytes de notre modèle sont : une forte densité cellulaire, un milieu de culture induisant l'hypertrophie et une atmosphère enrichie en O₂ (3% CO₂).

Nous n'avons pas réalisé d'analyses physico-chimiques pour déterminer le type de minéralisation générée dans les matrices extracellulaires hypertrophiques. Toutefois, les études réalisées sur les cellules ATDC5 et les chondrocytes de la plaque de croissance, différenciés dans un milieu de culture similaire, ont démontré la présence de cristaux d'hydroxyapatite, reproduisant la minéralisation de la matrice du cartilage au cours de l'ossification ostéochondrale *in vivo* (Shukunami, C. et al. 1997, Garimella, R. et al. 2004).

Finalement, ce modèle permet la récapitulation de l'expression séquentielle des gènes caractérisant la différenciation chondrocytaire puis hypertrophique. Il s'agit donc d'un outil intéressant pour étudier les acteurs moléculaires impliqués dans la transition phénotypique des chondrocytes. Ce protocole de culture peut être appliqué à des cellules issues de souris transgéniques ou knock-out pour étudier le rôle spécifique d'une molécule ou d'une voie de signalisation au cours de la différenciation hypertrophique, dans des conditions de culture bien contrôlées.

2.3.2 Modèle humain

Sur la base de l'expression de gènes d'intérêt, le modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains, développé par l'équipe de Yahara, coïncide avec les données connues de la littérature, à travers une diminution de l'expression des marqueurs des chondrocytes articulaires au profit d'une induction de l'expression des marqueurs de l'hypertrophie. Toutefois, ce modèle décrit des phénotypes chondrocytaires moins spécifiques que ceux rapportés dans notre modèle murin. Rappelons que les chondrocytes proviennent de patients arthrosiques, ce sont des cellules âgées (âge moyen des patients de plus 60 ans) avec une capacité de prolifération limitée, d'où la nécessité de réaliser une culture en 3D. Sans cet environnement tridimensionnel, les chondrocytes humains ne synthétisent pas de matrice extracellulaire et par conséquent ne produisent pas de calcifications.

L'hétérogénéité de l'expression des gènes d'intérêt en condition basale reflète la diversité des patients et la différence du stade de progression de leur arthrose. Malgré la dissection du cartilage dans les zones d'apparence saine, nous visualisons un profil d'expression génique très différent suivant l'origine des chondrocytes articulaires. Globalement, les niveaux d'expression d'OSX, MMP13 et ACAN sont équivalents en condition basale, reflétant manifestement le contexte arthrosique dans lequel les chondrocytes ont évolué avant la mise en culture. Le milieu chondrogénique semble réinitialiser le phénotype des chondrocytes vers un phénotype plus homogène, avec une tendance d'engagement vers une voie de différenciation hypertrophique.

Malgré ses limites, ce modèle reste un système intéressant de validation des résultats obtenus dans notre modèle murin. En combinant les données, nous pourrions découvrir de potentielles cibles impliquées dans la différenciation hypertrophique, jouant un rôle essentiel dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale.

3. Mise en évidence de cibles impliquées dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes et le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale

Compte tenu de l'existence d'un lien entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes, la vascularisation de la jonction ostéochondrale et la progression de l'arthrose chez les patients, nous avons émis l'hypothèse que la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le cartilage arthrosique jouerait un rôle clé dans l'angiogenèse ostéochondrale en induisant une production accrue de facteurs pro-angiogéniques et une diminution des facteurs angiostatiques. Nous avons donc recherché à identifier des molécules impliquées dans ces mécanismes par des études *in vitro*. Dans ce but, nous avons comparé le potentiel angiogénique des chondrocytes hypertrophiques à celui des chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques dans notre modèle de différenciation. Ainsi, l'expression et la synthèse de facteurs pro- et anti-angiogéniques ont été évaluées.

3.1 Approche ciblée

3.1.1 Etude de l'expression de molécules angiogéniques et angiostatiques dans les modèles de différenciation hypertrophique de chondrocytes

Nous avons étudié dans notre modèle de différenciation hypertrophique l'expression génique et la production de facteurs angiogéniques, tels que le vascular endothelial growth factor (Vegf) et son isoforme principale le Vegf₁₆₅, le basic fibroblast growth factor (Fgfb), le transforming growth factor β 1 (Tgfb1), la sphingosine kinase 1 (Sphk1), la chimiokine C-X-C motif chemokine ligand 12 (Cxcl12), également appelée stromal cell-derived factor 1 (Sdf1) (Figure 73).

L'ensemble de ces facteurs est faiblement exprimé par les chondrocytes articulaires (Tableau 19), à l'exception de Vegf et Cxcl12 qui présentent une expression basale relativement élevée. La différenciation des chondrocytes vers un phénotype hypertrophique s'accompagne d'une augmentation de l'expression de Fgfb, de Cxcl12 et de Sphk1, respectivement de 3,1, 4,7, et 3,3 fois par rapport aux chondrocytes pré-hypertrophiques. En revanche, nous n'observons pas de différence significative pour l'expression des gènes codant le VEGF et le VEGF₁₆₅. L'expression de Tgfb1 est significativement augmentée de 2,7 fois dès le stade pré-hypertrophique puis reste constante.

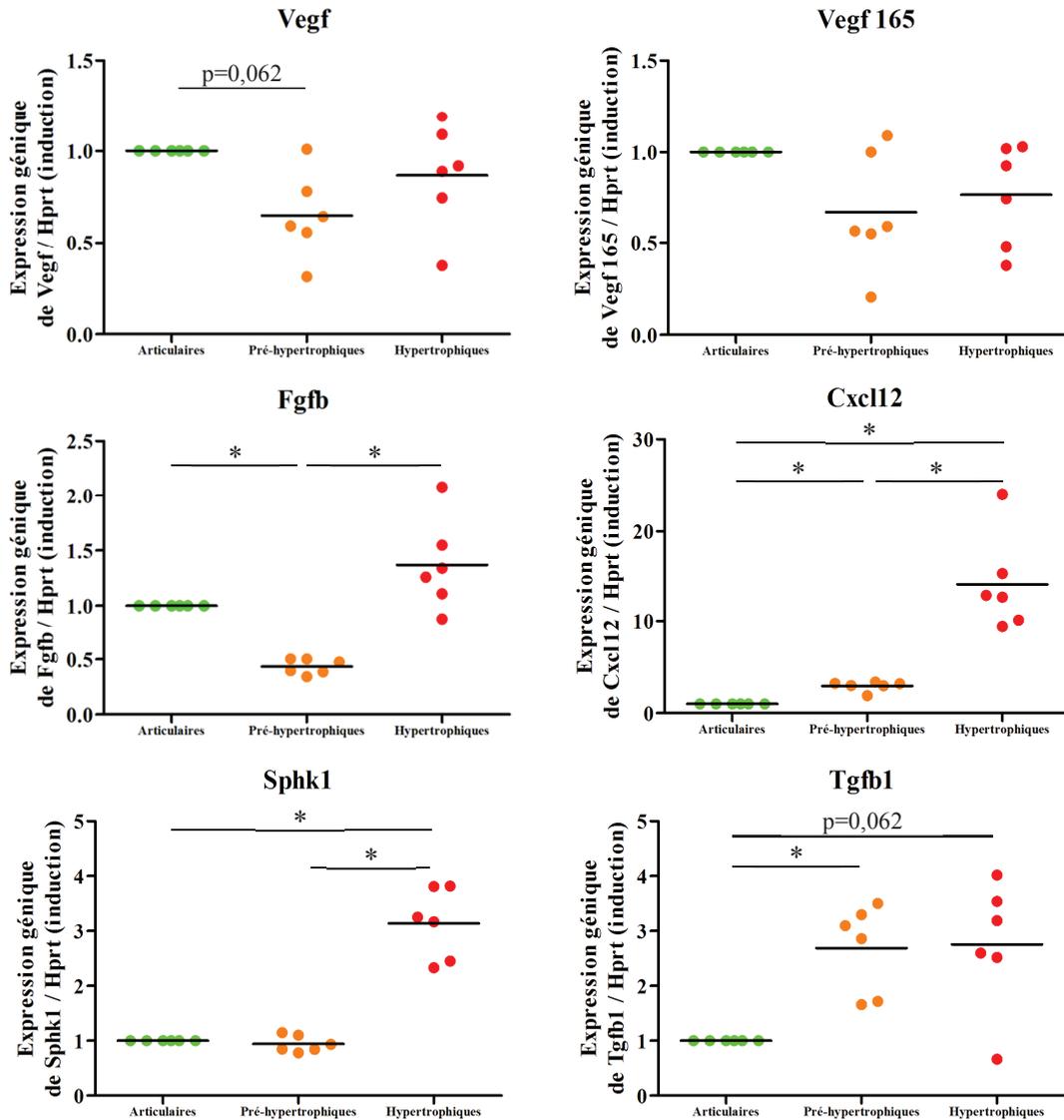


Figure 73: Expression génique de facteurs pro-angiogéniques par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes murins arrêtés à trois stades de différenciation, les chondrocytes articulaires (●) (1 semaine de culture jusqu'à confluence), les pré-hypertrophiques (●) (4 semaines supplémentaires de culture) et les chondrocytes hypertrophiques (●) (6 semaines supplémentaires de culture). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport aux chondrocytes articulaires, dont l'expression basale est normalisée à 1. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

ARNm	Vegf	Vegf ₁₆₅	Fgfb	Cxcl12	Sphk1	Tgfb1
Ct articulaires	24,4	28,3	29,4	22,8	28,6	25,5

Tableau 19: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).

Ces valeurs correspondent au nombre de cycles de PCR quantitative à partir duquel l'expression des gènes est détectée dans les échantillons. Ces données permettent d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les chondrocytes articulaires, qui nous servent de condition contrôle, dont l'expression est normalisée à 1.

Les chondrocytes synthétisent du VEGF, CXCL-12 et du bFGF (Figure 74). Le VEGF et le CXCL-12 sont détectés dans les lysats cellulaires des chondrocytes articulaires, à une concentration moyenne de 0,012 pg/μg de protéines et 0,13 pg/μg de protéines, respectivement. Ces facteurs sont également détectés dans les surnageants de culture des chondrocytes articulaires, à une concentration moyenne de 4,5 pg/μg de protéines et 3,3 pg/μg de protéines, respectivement. Le bFGF n'est quant à lui détecté que dans les lysats cellulaires, à une concentration moyenne de 2,9 pg/μg de protéines.

Les concentrations de ces facteurs angiogéniques dans les milieux conditionnés et les lysats cellulaires varient avec l'hypertrophie chondrocytaire. En effet, contrairement à son expression génique, le VEGF est davantage synthétisé dans les lysats cellulaires des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, respectivement de près de 5,6 fois et 10,3 fois, par rapport aux chondrocytes articulaires. De la même façon, une augmentation de la sécrétion de VEGF d'environ 1,6 fois est observée dans les surnageants de culture des chondrocytes hypertrophiques par rapport aux articulaires. Une sécrétion accrue de CXCL-12 est également mesurée dans les surnageants des chondrocytes hypertrophiques. Les concentrations de CXCL-12 et de bFGF dosées dans les lysats des chondrocytes articulaires sont supérieures à celles des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Toutefois, notons l'augmentation significative de la production de ces facteurs par les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux pré-hypertrophiques.

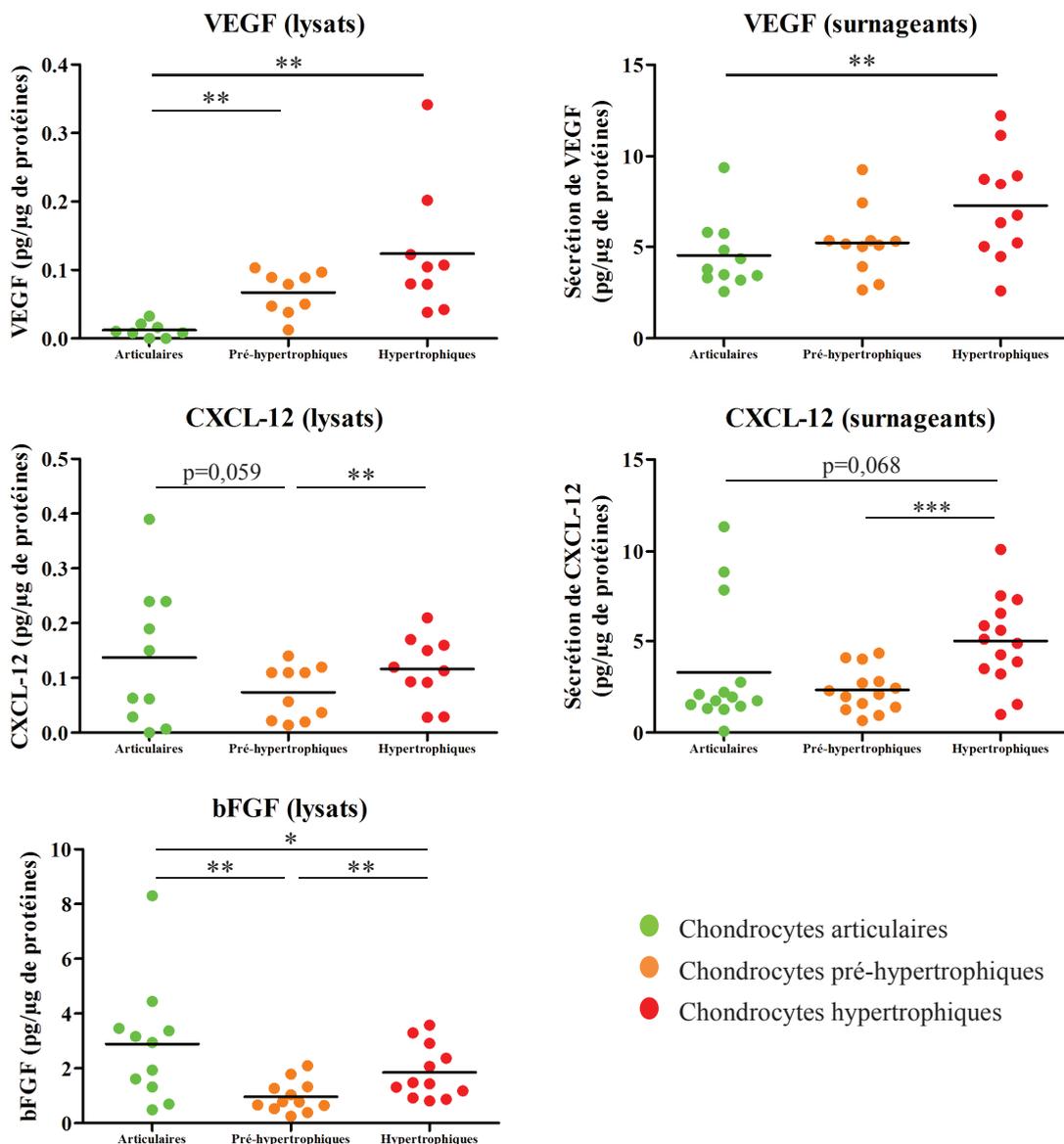


Figure 74: Synthèse de facteurs pro-angiogéniques par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

Dosage par ELISA de la production de VEGF, de CXCL-12 et de bFGF dans les lysats cellulaires, comprenant les compartiments intracellulaire, transmembranaire et la matrice extracellulaire. Dosage de la sécrétion de VEGF et de CXCL-12 dans les surnageants de culture à partir des milieux conditionnés des chondrocytes récupérés après 24h d'incubation. La quantité de facteurs angiogéniques dosée (en pg) dans les lysats cellulaires et les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en μg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (VEGF (lysats) n=9, VEGF (surnageants) n=11, CXCL-12 (lysats) n=10, CXCL-12 (surnageants) n=14, bFGF (lysats) n=12). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Nous avons également étudié l'expression d'inhibiteurs de l'angiogenèse, tels que le pigment epithelium-derived factor (Pddf), l'angiopoïétine like 4 (Angptl4), les thrombospondines 1 et 2 (Thbs1 et Thbs2) et la chondromoduline I (ChM-I) (Figure 75).

Les chondrocytes articulaires présentent une expression basale relativement importante de ces facteurs anti-angiogéniques (Tableau 20). Au cours de la différenciation hypertrophique, la régulation de l'expression de ces facteurs est très variable. Nous constatons une augmentation significative de l'expression du Pddf d'environ 2,4 fois entre les chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de l'expression des thrombospondines (Thbs1 et Thbs2). A l'inverse, la chondromoduline I (ChM-I) présente une expression qui diminue significativement de 7,8 fois dans les chondrocytes pré-hypertrophiques par rapport aux chondrocytes articulaires et diminue encore de 3,4 fois lorsque les chondrocytes pré-hypertrophiques deviennent hypertrophiques. Enfin, l'angiopoïétine like 4 (Angptl4) présente un profil d'expression biphasique, différent des autres facteurs anti-angiogéniques étudiés. En effet, son expression est significativement augmentée de 19,4 fois dans les chondrocytes pré-hypertrophiques par rapport aux articulaires, puis diminue de 1,6 fois entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

Notons que la régulation de la synthèse protéique du PEDF et des TSP-1 et TSP-2 est radicalement différente de leur régulation transcriptionnelle. Alors qu'une tendance à l'augmentation de leur expression génique a été observée, la quantité de PEDF (doublet de 45 et 47 kDa) ne semble pas varier en fonction de l'état de différenciation des chondrocytes par Western Blot dans les lysats cellulaires (Figure 76A). A l'inverse, dans les milieux conditionnés, le PEDF (50 kDa) est très peu sécrété par les chondrocytes articulaires par rapport aux pré-hypertrophiques et hypertrophiques, comme observé par PCR quantitative. La TSP-1 (220 kDa) n'est pas détectée par Western Blot dans les lysats des chondrocytes articulaires, mais elle s'accumule distinctement dans les lysats des chondrocytes pré-hypertrophiques (Figure 76B). Lorsque ces chondrocytes deviennent hypertrophiques, une nette diminution de la production de TSP-1 dans les lysats est observable et quantifiable par densitométrie (Figure 76B-C). Des résultats similaires sont obtenus pour la TSP-2 (non montrés). Ni la TSP-1 ni la TSP-2 ne sont détectés par Western Blot dans les milieux conditionnés des chondrocytes.

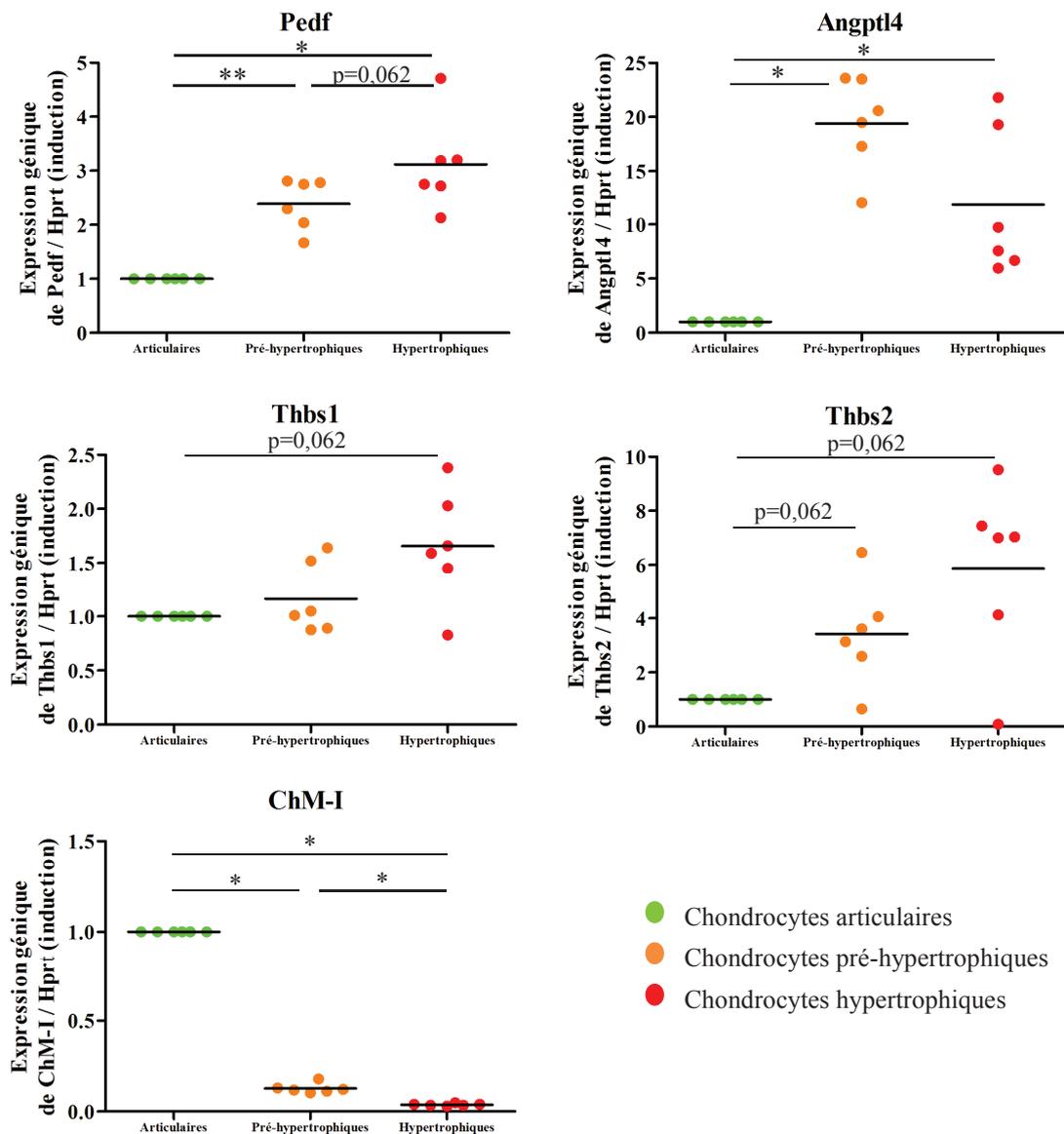


Figure 75: Expression génique de facteurs anti-angiogéniques par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport aux chondrocytes articulaires, dont l'expression basale est normalisée à 1. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05, ** p<0,01.

ARNm	Pedf	Angptl4	Thbs1	Thbs2	ChM-I
Ct articulaires	21,5	26,7	19	23,8	18,8

Tableau 20: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).

Ces valeurs correspondent au nombre de cycles de PCR quantitative à partir duquel l'expression des gènes est détectée dans les échantillons. Ces données permettent d'évaluer le

niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les chondrocytes articulaires, qui nous servent de condition contrôle, dont l'expression est normalisée à 1.

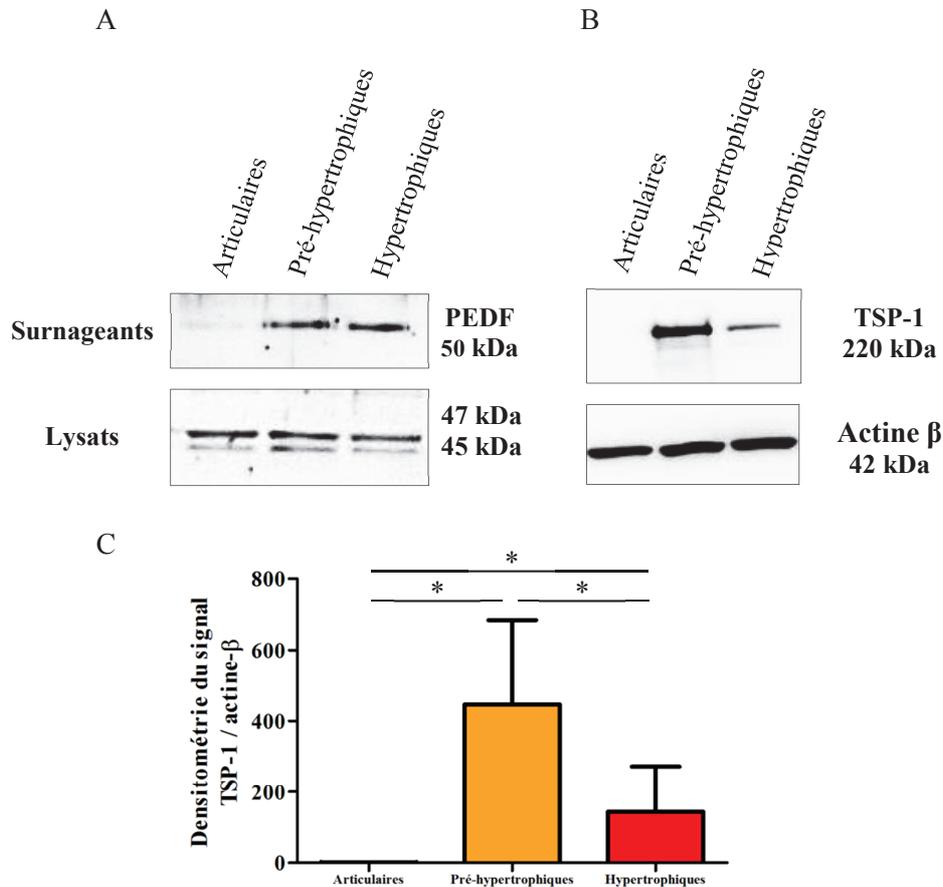


Figure 76: Synthèse de facteurs anti-angiogéniques (PEDF et TSP-1) par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

(A) La synthèse de PEDF a été évaluée par Western Blot dans les lysats cellulaires, comprenant les compartiments intracellulaire, transmembranaire et la matrice extracellulaire et dans les surnageants de culture à partir des milieux conditionnés des chondrocytes récupérés après 24h d'incubation. Photographie représentative de 3 expériences indépendantes (B) La synthèse de TSP-1 est visualisée par Western Blot exclusivement dans les lysats des chondrocytes car elle n'est pas détectée dans les surnageants de culture. Photographie représentative de 10 expériences indépendantes. (C) Quantification par densitométrie du signal émis par la protéine TSP-1 en Western Blot, rapporté au signal émis par l'actine-β (témoin de charge).

De manière intéressante, nous confirmons nos résultats dans le modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains, avec une synthèse importante de TSP-1 dans les chondrocytes cultivés en milieu chondrogénique, qui est significativement diminuée lorsqu'ils sont cultivés en milieu de différenciation hypertrophique (Figure 77A-B). Contrairement aux chondrocytes murins qui ne présentent pas de régulation significative de l'expression de Thbs1 selon leur état de différenciation, les chondrocytes humains cultivés en milieu de

différenciation hypertrophique ont une expression de THBS1 significativement diminuée de 3,1 fois par rapport à la condition basale et de 1,8 fois par rapport aux chondrocytes cultivés en milieu chondrogénique (Figure 77C).

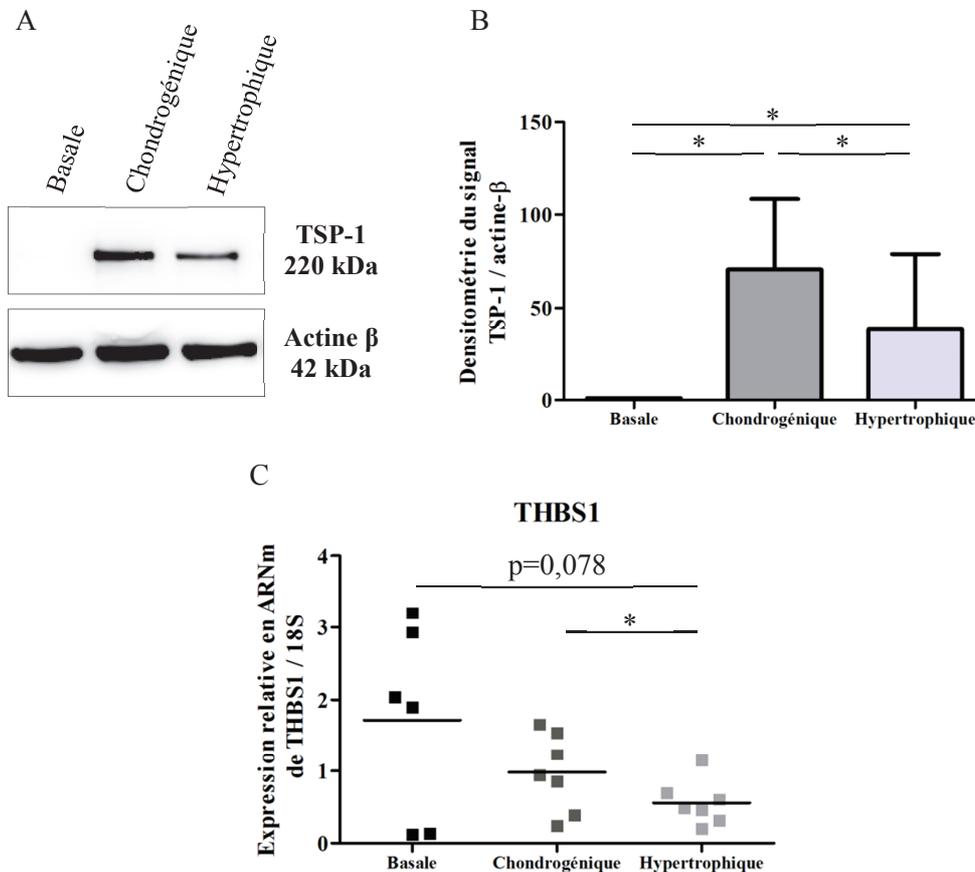


Figure 77: Expression de la TSP-1 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes humains.

(A) La synthèse de TSP-1 est évaluée par Western Blot dans les lysats des chondrocytes humains cultivés en culots et arrêtés à trois stades de culture. Tout d'abord au moment de la formation du culot, soit la condition dite basale (■). Ces culots sont ensuite cultivés en milieu chondrogénique (■) pendant 6 semaines puis en milieu de différenciation hypertrophique (■) pendant 2 semaines supplémentaires. Photographie représentative de 6 expériences indépendantes. (B) Quantification par densitométrie du signal émis par la protéine TSP-1 en Western Blot, rapporté au signal émis par l'actine-β (témoin de charge). (C) L'expression de THBS1 est rapportée à l'expression du gène de référence 18S. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6 en condition basale, n=7 en milieu chondrogénique et hypertrophique). * p<0,05.

L'ensemble de ces résultats montre que l'expression des facteurs impliqués dans la régulation de l'angiogenèse varie selon l'état de différenciation des chondrocytes. Les chondrocytes pré-hypertrophiques produisent davantage de facteurs anti-angiogéniques alors

que les chondrocytes hypertrophiques vont synthétiser principalement des facteurs pro-angiogéniques. Au cours de la différenciation hypertrophique, les chondrocytes semblent donc acquérir un potentiel angiogénique. D'après ces observations, nous pouvons suggérer que la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le cartilage arthrosique pourrait favoriser l'angiogenèse ostéocondrale et participer à la progression de la pathologie.

3.1.2 Effet d'un stress inflammatoire sur les chondrocytes murins articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques

Il est reconnu que l'angiogenèse et l'inflammation sont intimement liées dans des contextes physiologiques et pathologiques (Walsh, D. A. & Pearson, C. I. 2001). Etant donné l'existence d'un environnement inflammatoire de bas grade dans l'articulation arthrosique, nous nous sommes intéressés à la réponse des chondrocytes murins à un stress inflammatoire par l'interleukine-1 β (IL-1 β). Nous avons étudié l'expression de marqueurs de différenciation et de facteurs régulant l'angiogenèse afin de déterminer l'impact d'un stress inflammatoire sur le phénotype et le potentiel angiogénique des chondrocytes murins selon leur stade de différenciation.

L'étude de la régulation de l'expression de l'interleukine-6 (Il6) en réponse à l'IL-1 β (1 ng/mL) constitue une condition contrôle qui reflète l'efficacité de la stimulation (Figure 78). Pour les 3 stades de différenciation, nous confirmons que la stimulation des chondrocytes par l'IL-1 β a induit efficacement l'expression de l'interleukine-6, d'environ 68,1 fois dans les chondrocytes articulaires, de 5532 fois dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et de 189,3 fois dans les chondrocytes hypertrophiques. En réponse à l'IL-1 β , les chondrocytes articulaires présentent une diminution notable de l'expression de marqueurs caractéristiques des chondrocytes, tels que le collagène de type II (Col2a1) et la chondromoduline I (ChM-I). L'expression de Col2a1 diminue d'environ 1,6 fois dans les chondrocytes articulaires, de 3,3 fois dans les pré-hypertrophiques et de 4,4 fois dans les hypertrophiques en réponse à l'IL-1 β . De même, l'expression de ChM-I diminue de 1,5 fois dans les chondrocytes articulaires, de 3,1 fois dans les pré-hypertrophiques et de 2,9 fois dans les hypertrophiques. Une tendance à la diminution est également observée pour l'expression de l'aggrécane (Acan) quel que soit l'état de différenciation des chondrocytes stimulés par l'IL-1 β . Dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, dans lesquels nous avons précédemment démontré une diminution significative de l'expression des marqueurs chondrocytaires, nous constatons un effet additionnel de l'IL-1 β sur l'inhibition de l'expression de ces marqueurs.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'expression de marqueurs de l'hypertrophie, tels que le facteur de transcription Runx2 et l'ostérix (Osx) dont les expressions ont tendance à diminuer en réponse à l'IL-1 β dans les chondrocytes aux 3 stades de différenciation (Figure 79). A l'inverse, une augmentation significative de l'expression de la métalloprotéase matricielle 13 (Mmp13), d'environ 19,2 fois dans les chondrocytes articulaires, de 5,9 fois dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et de 4,2 fois dans les chondrocytes hypertrophiques est observée en réponse à l'IL-1 β .

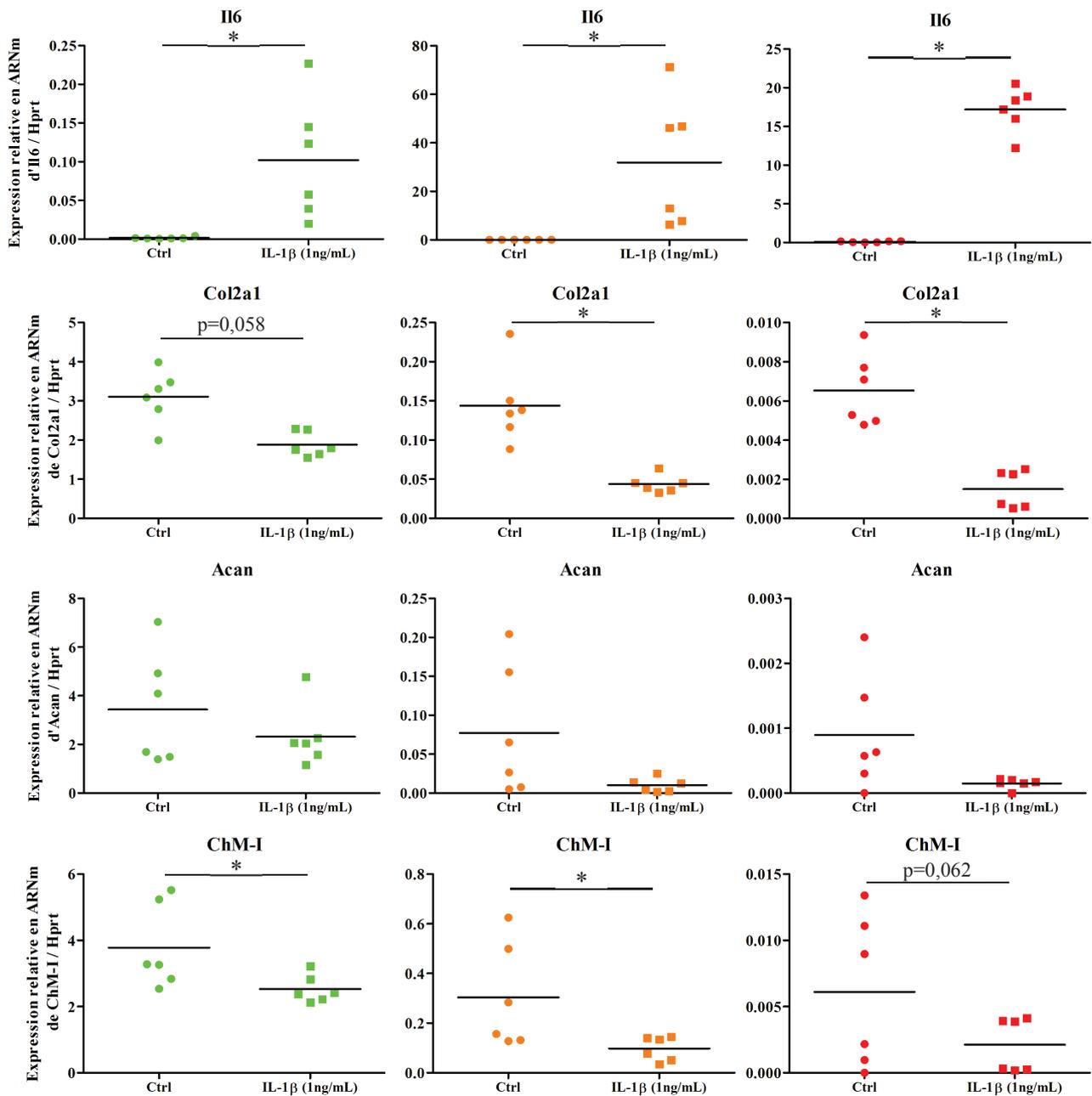


Figure 78: Effet d'un stress inflammatoire sur l'expression génique de marqueurs chondrocytaires par les chondrocytes murins.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes articulaires (●), pré-hypertrophiques (●)

) et hypertrophiques (●) incubés en présence ou non d'IL-1 β à 1 ng/mL pendant 24h. L'expression relative de chaque gène est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

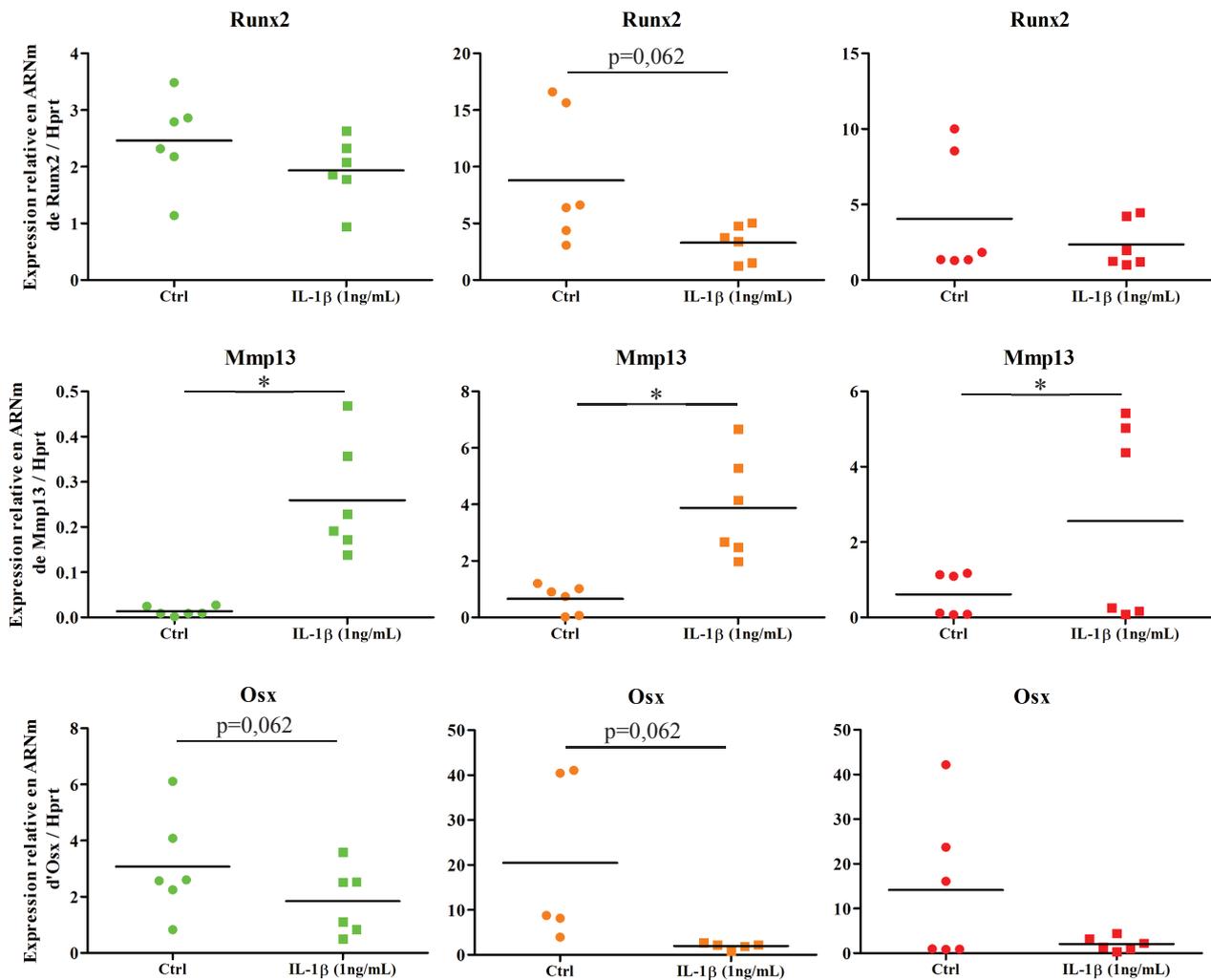


Figure 79: Effet d'un stress inflammatoire sur l'expression génique de marqueurs de différenciation hypertrophique par les chondrocytes murins.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes articulaires (●), pré-hypertrophiques (●) et hypertrophiques (●) incubés en présence ou non d'IL-1 β à 1 ng/mL pendant 24h. L'expression relative de chaque gène est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

Enfin, l'effet de l'IL-1 β sur l'expression génique de facteurs pro-angiogéniques (Vegf et Fgfb) et de facteurs anti-angiogéniques (Thbs1 et Thbs2) a été évalué (Figure 80). Nous constatons une induction significative de l'expression de Vegf d'environ 6,1 fois dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et de 1,8 fois dans les chondrocytes hypertrophiques stimulés par l'IL-1 β . Une tendance à l'augmentation de l'expression de Fgfb est également mise en évidence dans les chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques en réponse à l'IL-1 β . A l'inverse, une diminution importante de l'expression des thrombospondines 1 et 2 est observée dans les chondrocytes pré-hypertrophiques (de 24,1 fois pour Thbs1 et 3,4 fois pour Thbs2) et dans les chondrocytes hypertrophiques (de 6,4 fois pour Thbs1 et 2,1 fois pour Thbs2) stimulés par l'IL-1 β . Cet effet a été étudié à l'échelle protéique pour la TSP-1 dans les lysats des chondrocytes pré-hypertrophiques, où nous retrouvons une nette diminution de sa synthèse en réponse à l'IL-1 β (Figure 81).

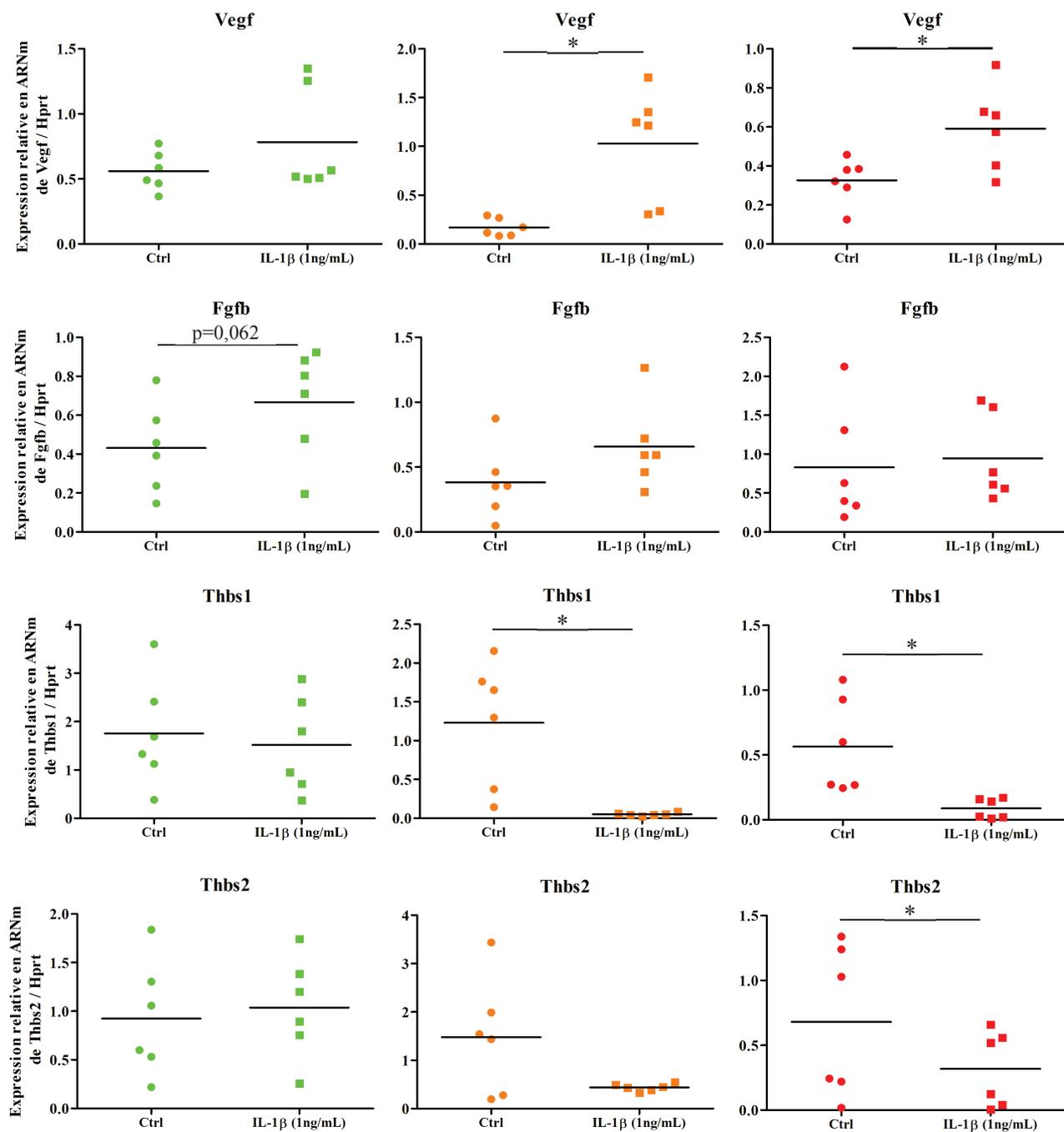


Figure 80: Effet d'un stress inflammatoire sur l'expression génique de facteurs de l'angiogenèse par les chondrocytes murins.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes articulaires (●), pré-hypertrophiques (●) et hypertrophiques (●) incubés en présence ou non d'IL-1β à 1 ng/mL pendant 24h. L'expression relative de chaque gène est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

Lysats pré-hypertrophiques

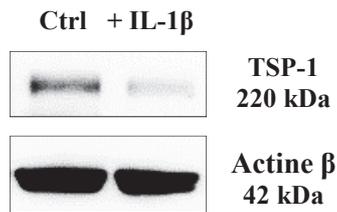


Figure 81: Effet d'un stress inflammatoire sur la synthèse de TSP-1 par les chondrocytes pré-hypertrophiques murins.

Les protéines ont été extraites à partir des lysats des chondrocytes pré-hypertrophiques, comprenant les compartiments intracellulaire, transmembranaire et la matrice extracellulaire. Ces chondrocytes ont été incubés en présence ou non d'IL-1 β à 1 ng/mL pendant 24h. Photographie de Western Blot représentative de 3 expériences indépendantes.

En définitive, nous avons montré un effet du stress inflammatoire sur la modulation du profil d'expression génique des chondrocytes murins, quel que soit leur état de différenciation. Le type de réponse observé dans les chondrocytes stimulés par l'IL-1 β suggère l'induction d'une dédifférenciation chondrocytaire (diminution de Col2a1, Acan, ChM-I, Runx2, Osx) et l'acquisition d'un phénotype pro-catabolique (augmentation de Mmp13) et pro-angiogénique (augmentation de Vegf, diminution de Thbs1 et Thbs2).

Il est intéressant de noter la réponse spécifique à l'IL-1 β des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques pour l'expression des gènes codant la TSP-1, la TSP-2 et le VEGF par rapport aux chondrocytes articulaires. Nous constatons que le phénotype hypertrophique est amplifié par l'IL-1 β . Pour les chondrocytes pré-hypertrophiques que l'on imagine être ceux peuplant le cartilage articulaire sain en profondeur, au-dessus de la tidemark, l'IL-1 β fait chuter l'expression des TSP-1 et -2 et augmenter celle du VEGF. Ce constat suggère que l'IL-1 β pourrait abolir la barrière angiostatique que représentent les chondrocytes pré-hypertrophiques dans le cartilage. Il est connu que la ChM-I empêche la différenciation hypertrophique des chondrocytes tandis que le VEGF la favorise. Nous pouvons donc imaginer lors d'un stress inflammatoire du cartilage que cette réponse spécifique des chondrocytes pré-hypertrophiques à l'IL-1 β favoriserait la différenciation hypertrophique des chondrocytes et donc la progression de l'arthrose.

Nous nous sommes donc intéressés au rôle que pourrait jouer la TSP-1 au cours du mécanisme de différenciation hypertrophique des chondrocytes de notre modèle et à son rôle dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéocondrale dans un modèle murin.

3.1.3 La thrombospondine-1 (TSP-1) : données bibliographiques

3.1.3.1 Structure et fonctions de la TSP-1

La famille des thrombospondines (TSP) comporte cinq membres : Les TSP-1 et TSP-2, qui sont structurellement similaires et s'organisent en homotrimères et les TSP-3, TSP-4 et TSP-5 (cette dernière également connue sous le nom de cartilage oligomeric matrix protein, COMP), qui sont organisées en pentamères (Bornstein, P. 1992, Adams, J. & Lawler, J. 1993). La TSP-1 est une protéine dite matri-cellulaire (Bornstein, P. 1995). Le terme « matri-cellulaire » se réfère à un groupe de protéines modulaires, extracellulaires dont les fonctions sont permises par leurs interactions avec des protéines matricielles, des récepteurs à la surface des cellules ou avec d'autres molécules, telles que des cytokines et des protéases qui interagissent à leur tour à la surface des cellules.

La TSP-1 est plus précisément une glycoprotéine matricielle non collagénique qui a été initialement identifiée dans les granules alpha plaquettaires, jouant un rôle essentiel dans l'aggrégation plaquettaire et la coagulation sanguine (Baenziger, N. L. et al. 1971). Elle est produite et sécrétée par divers types cellulaires, tels que les cellules musculaires lisses (Isenberg, J. S. et al. 2006), les cellules endothéliales (Phelan, M. W. et al. 1998), les cellules épithéliales (Rogers, N. M. et al. 2012), les fibroblastes (Dameron, K. M. et al. 1994) et les kératinocytes (Wikner, N. E. et al. 1987) en réponse à un stress, mais également par les cellules de l'immunité innée, comme les monocytes, les macrophages (DiPietro, L. A. & Polverini, P. J. 1993) et les lymphocytes T (Li, S. S. et al. 2002) en réponse à leur activation par des cytokines pro-inflammatoires. Son expression dans les tissus adultes est limitée généralement aux sites de remodelage tissulaire pour réguler le phénotype cellulaire et la structure de la matrice extracellulaire (Zhang, X. & Lawler, J. 2007). La TSP-1 module en effet la structure de la MEC en se liant aux protéines matricielles telles que la fibronectine et le collagène et en modulant l'activité des protéases comme les MMP. Cette capacité à réguler le phénotype cellulaire et l'organisation de la MEC fait de la TSP-1 mais aussi de la TSP-2, des régulateurs essentiels des processus de remodelage tissulaire comme l'angiogenèse, le développement, la cicatrisation et la synaptogenèse. Elles sont également impliquées dans des processus de remodelages pathologiques, associés à l'athérosclérose, la néoplasie et l'angiogenèse tumorale.

Bien que des fonctions similaires soient décrites pour la TSP-1 et la TSP-2, leur distribution tissulaire différente au cours du développement suggère tout de même une

spécificité d'action pour ces deux molécules (Laherty, C. D. et al. 1992, Iruela-Arispe, M. L. et al. 1993). Les séquences de leur promoteur sont différentes (Bornstein, P. 1992) et par conséquent présenteraient potentiellement une régulation différente. Le gène codant la TSP-1 est hautement répondeur aux facteurs de croissance, comme le PDGF et le sérum, contrairement au gène codant la TSP-2 (Majack, R. A. et al. 1987).

La TSP-1 est une protéine trimérique de 450 kDa, composée d'un domaine N-terminal d'environ 200 acides aminés contenant un site de haute affinité pour l'héparine et les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (Chen, H. et al. 1996) (Figure 82). Ce domaine permet également l'internalisation et la clairance de la TSP-1 par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant de la low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1). Trois domaines thrombospondin type 1 repeat (TSR) et trois domaines thrombospondin type 2 repeat (domaine epidermal growth factor (EGF) like) sont présents au centre de la molécule. Les domaines TSR sont retrouvés dans approximativement 100 protéines humaines (Tucker, R. P. 2004), qui ont démontré leur activité d'inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale et au cours de la croissance (Lawler, J. & Detmar, M. 2004).

La partie C-terminale de TSP-1, incluant la séquence du dernier domaine type 2 repeat et le domaine type 3 repeat, est composée d'une série de sites contigus de liaison au calcium comportant les 200 derniers acides aminés de la protéine (Carlson, C. B. et al. 2005). Ce domaine C-terminal est le plus conservé dans les 5 membres de la famille TSP. Il est capable de lier 30 ions calcium, suggérant que les TSP sont impliquées dans l'homéostasie du calcium, même si cette fonction n'a pas été explorée en détail. L'interaction de la TSP-1 avec le calcium permet également d'influencer sa conformation et l'exposition de ses sites de liaison, régulant ainsi les interactions avec ses ligands (Resovi, A. et al. 2014).

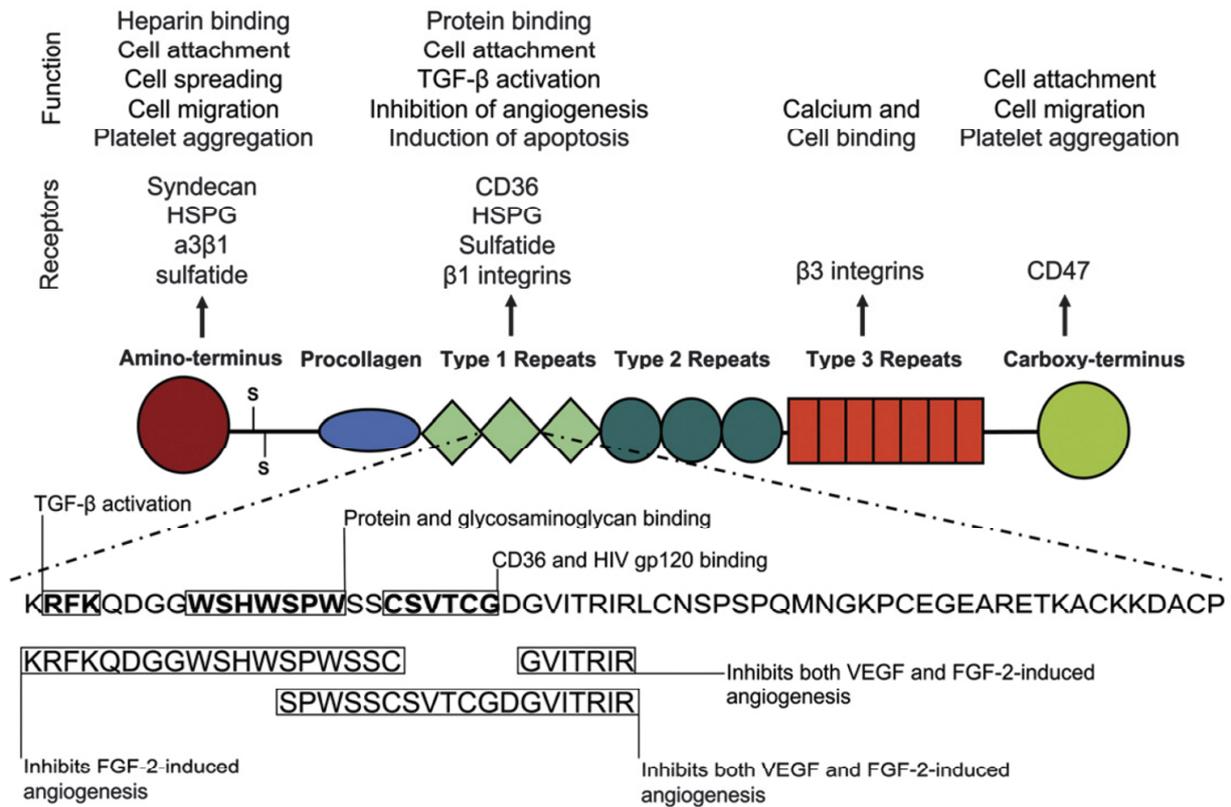


Figure 82: Structure des domaines fonctionnels de la TSP-1.

La TSP-1 comprend de multiples domaines fonctionnels, qui interagissent avec une variété de récepteurs et de protéines matricielles ou transmembranaires. La séquence d'acides aminés du second domaine type 1 repeat (TSR) est décrite en détail et mentionne les séquences d'interaction avec les protéines et les glycosaminoglycanes et la séquence RFK d'activation du TGF- β . Les peptides aux propriétés anti-angiogéniques sont également indiqués. D'après Zhang, X. & Lawler, J. (2007).

3.1.3.2 Complexité des interactions moléculaires de la TSP-1

Les possibilités d'interactions de la TSP-1 avec une variété de protéines matricielles (VEGF, TGF- β , MMP, protéases à sérine) et de récepteurs transmembranaires (CD36, CD47, intégrines, VEGFR-2, LRP1) reflètent les fonctions biologiques complexes de la TSP-1. Les effets de ces interactions influencent la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaire (Figure 83). L'interaction de la TSP-1 avec des protéines structurales (collagènes, protéoglycanes, fibronectine, laminines) permet de moduler l'organisation de la matrice extracellulaire. L'activation du TGF- β , qui induit la synthèse de collagènes et de protéines matricielles, permet aussi de moduler la conformation de la MEC. Cette activation du TGF- β requière la séquence RFK présente entre le premier et le second TSR de la TSP-1 (Young, G. D. & Murphy-Ullrich, J. E. 2004). Contrairement à la TSP-1, la TSP-2 ne possède pas cette

séquence, elle est donc incapable d'activer le TGF- β . Enfin, ses interactions, notamment avec la fibronectine, permettent de protéger la TSP-1 de l'action des enzymes protéolytiques (Dardik, R. & Lahav, J. 1999).

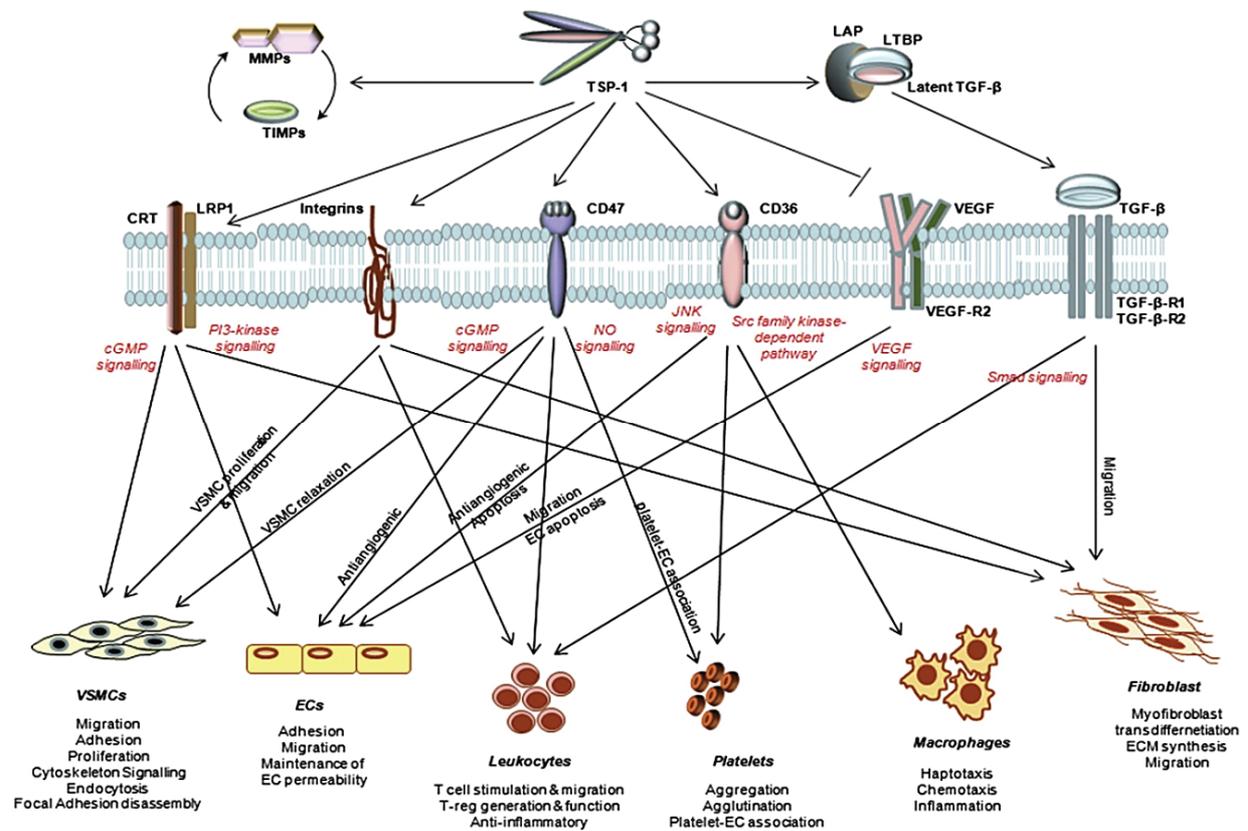


Figure 83: Synthèse des récepteurs de la TSP-1, des voies de signalisation et des types cellulaires influencés par la TSP-1.

Les effets majeurs de la TSP-1 incluent : le maintien de la balance entre les MMP et les TIMP, l'activation du TGF- β et de sa voie de signalisation Smad via TGF β R1 et TGF β R2, l'activation du complexe CRT/LRP1 (calréticuline / low density lipoprotein receptor-related protein-1) qui induit les voies de signalisation du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et de la phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase), l'activation d'intégrines et des voies en aval qui affectent la réponse de multiples types cellulaires (cellules musculaires lisses (VSMC), leucocytes, fibroblastes...), l'activation du récepteur CD47 qui induit les voies de signalisation du GMPc et du monoxyde d'azote (NO), l'activation du récepteur CD36 qui entraîne de nombreuses réponses cellulaires à travers les voies de signalisation de la famille des kinases Src et de Jun NH2-terminal kinase (JNK), l'inhibition de l'angiogenèse par l'interaction avec le VEGF et son récepteur VEGFR-2. Ces multiples voies de signalisation influencées par la TSP-1 affectent donc de nombreux types cellulaires du réseau vasculaire. D'après Krishna, S. M. & Golledge, J. (2013).

3.1.3.3 Mécanismes de l'inhibition de l'angiogenèse par la TSP-1

Les propriétés anti-angiogéniques de la TSP-1 sont complexes et résulteraient de nombreux mécanismes. Ces propriétés ont émergé au début des années 90 dans des modèles *in vitro* (Good, D. J. et al. 1990). Parmi la famille des thrombospondines, seules les TSP-1 et TSP-2 sont capables d'inhiber l'angiogenèse (Lawler, J. 2000). Détectées dans le cartilage pour leur rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de la plaque de croissance (Tooney, P. A. et al. 1998), leur distribution et leur propriété anti-angiogénique ont été ensuite découvertes dans d'autres systèmes, comme les poumons et l'intestin (Lawler, J. 2000, Fleitas, T. et al. 2013, Lopez-Dee, Z. P. et al. 2015).

3.1.3.3.1 Effets directs sur la fonction des cellules endothéliales

Les TSP-1 et TSP-2 sont de puissants inhibiteurs de la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF ou le bFGF grâce à leurs domaines TSR (Lawler, J. & Detmar, M. 2004) à travers leurs interactions avec le récepteur CD36 (Simantov, R. & Silverstein, R. L. 2003) et les intégrines $\beta 1$ (Short, S. M. et al. 2005). Dans une étude plus ancienne, une seconde séquence présente dans le domaine pro-collagène a été montrée comme impliquée dans l'inhibition de la migration cellulaire (Tolsma, S. S. et al. 1993).

CD36 est une protéine transmembranaire de 88 kDa qui permet l'internalisation des lipides oxydés ainsi que l'activité anti-angiogénique de la TSP-1 et TSP-2 (Dawson, D. W. et al. 1997). Leur action anti-angiogénique a été démontrée sur des cellules endothéliales *in vitro* et sur l'inhibition de la néo-vascularisation *in vivo*, par l'activation du processus d'apoptose cellulaire via les voies de signalisation des protéines kinases Src, des protéases caspase-3 like, de la protéine p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) et par l'activation de Fas ligand (FasL) ou par le TNF- α /TNF-receptor 1 (Jimenez, B. et al. 2000, Volpert, O. V. et al. 2002, Rege, T. A. et al. 2009). L'interaction de CD36 avec la TSP-1 inhibe l'activation du récepteur VEGFR-2 par le VEGF et par conséquent la voie de signalisation induite par la protéine p38 MAPK (Primo, L. et al. 2005). L'interaction des TSR avec CD36 conduit également à l'apoptose des cellules endothéliales (Jimenez, B. et al. 2000). La TSP-1 induit en effet une augmentation de l'expression de Bax et une diminution de l'expression de Bcl-2. La TSP-1 inhibe aussi l'augmentation de l'expression de Bcl-2 induite par le VEGF dans les cellules endothéliales (Nör, J. E. et al. 2000). Des études *in vivo* ont également démontré son implication dans la promotion de l'apoptose des cellules endothéliales tumorales (Zhang, X. et al. 2005). Il a été montré que la TSP-1 inhibait l'angiogenèse en arrêtant la progression du

cycle cellulaire des cellules endothéliales par un mécanisme indépendant du récepteur CD36 (Yamauchi, M. et al. 2007) mais dépendant de CD47, en accélérant significativement la sénescence répliquative (Gao, Q. et al. 2016). L'interaction de la TSP-1 avec le récepteur very low density lipoprotein (VLDL) inhibe également la division cellulaire des cellules endothéliales par arrêt du cycle cellulaire (Oganesian, A. et al. 2008).

De nombreux facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF, l'angiopoïétine-1 et l'insuline provoquent l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS), à l'origine d'un flux continu de NO, qui stimule la prolifération des cellules endothéliales via l'activation de la signalisation guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Isenberg, J. S. et al. 2009). Grâce à son interaction avec CD47, la TSP-1 exerce ses effets anti-angiogéniques en ciblant les voies de signalisation en aval de VEGFR-2, comme la NO synthase endothéliale et la guanylate cyclase soluble, responsables de réponses pro-angiogéniques (Roberts, D. D. et al. 2007, Rogers, N. M. et al. 2014). Une étude a également démontré que la TSP-1 inhibait directement l'activation du VEGFR-2 à travers son récepteur CD47 (Kaur, S. et al. 2010). En effet, d'après des données de Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) et de co-immunoprécipitation, le récepteur CD47 est constitutivement associé au VEGFR-2. La liaison de la TSP-1 sur CD47 abolit l'association entre CD47 et VEGFR-2 et inhibe ainsi la phosphorylation et l'activation de VEGFR-2.

Une grande partie des cellules endothéliales participant à la micro-vascularisation tumorale a été décrite comme provenant des progéniteurs circulants de cellules endothéliales (Rafii, S. et al. 2002, Shaked, Y. et al. 2005). Cette population cellulaire est approximativement deux fois plus abondante chez les souris déficientes en TSP-1 (TSP-1^{-/-}), suggérant que les niveaux endogènes de TSP-1 empêchent la production et/ou la survie de ces progéniteurs endothéliaux circulants. De plus, un peptide mimétique de la TSP-1, dénommé ABT-510, diminue les niveaux des cellules endothéliales circulantes chez ces souris TSP-1^{-/-}, suggérant que la TSP-1 et les agents thérapeutiques basés sur les TSR pourraient inhiber l'angiogenèse en réduisant les niveaux de ces cellules endothéliales circulantes (Shaked, Y. et al. 2005). Les effets de ces peptides mimétiques seront discutés dans un chapitre suivant.

3.1.3.3.2 Effets indirects sur la fonction des cellules endothéliales

En plus d'inhiber l'activation du VEGFR-2 via son interaction avec CD36 et CD47, la TSP-1 inhibe l'angiogenèse en limitant la mobilisation du VEGF de la matrice extracellulaire et ses effets en se liant directement à lui (Gupta, K. et al. 1999, Rodriguez-Manzaneque, J. C. et al. 2001). Le domaine N-terminal de liaison à l'héparine de la TSP-1 a été décrit comme un domaine qui rentre en compétition avec le VEGF pour se lier aux protéoglycanes des cellules endothéliales (Gupta, K. et al. 1999). Ces protéoglycanes à héparane sulfate sont des co-récepteurs de la low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1), qui est un récepteur « scavenger » impliqué dans la clairance de la TSP-1 et dans l'endocytose des complexes formés entre la TSP-1 et les MMP-2, MMP-9 et le VEGF (Yang, Z. et al. 2001, Hahn-Dantona, E. et al. 2001, Greenaway, J. et al. 2007), conduisant à une diminution de leur activité et par conséquent à l'inhibition de l'angiogenèse (Figure 84). La TSP-1 se lie aussi au bFGF et au HGF, suggérant une fonction de clairance des facteurs de croissance pro-angiogéniques (Margosio, B. et al. 2003). Le VEGF lié à la matrice est relargué par l'activité protéolytique des MMP. Les TSP-1 et TSP-2 ont été décrits comme capables d'inhiber l'activité des MMP, notamment de MMP-2 et MMP-9, et au contraire d'augmenter leur taux de clairance (Bein, K. & Simons, M. 2000, Yang, Z. et al. 2001). Une étude a montré que le niveau de MMP-9 à l'état activé dans des tissus mammaires tumoraux était inversement corrélé à la quantité de TSP-1 (Rodriguez-Manzaneque, J. C. et al. 2001). Quand la TSP-1 est surexprimée, la quantité de VEGF associée au VEGFR-2 est diminuée, tout comme la taille et le nombre de vaisseaux au sein des tumeurs mammaires. Dans les gliomes, la liaison concomitante de TSP-1, MMP-2 et LRP1 aboutit à une diminution de l'angiogenèse (Fears, C. Y. et al. 2005). D'autre part, la TSP-1 influence indirectement l'angiogenèse, en inhibant la prolifération cellulaire à travers l'activation du TGF- β 1, comme l'a démontré une étude sur les carcinomes humains (Yee, K. O. et al. 2004).

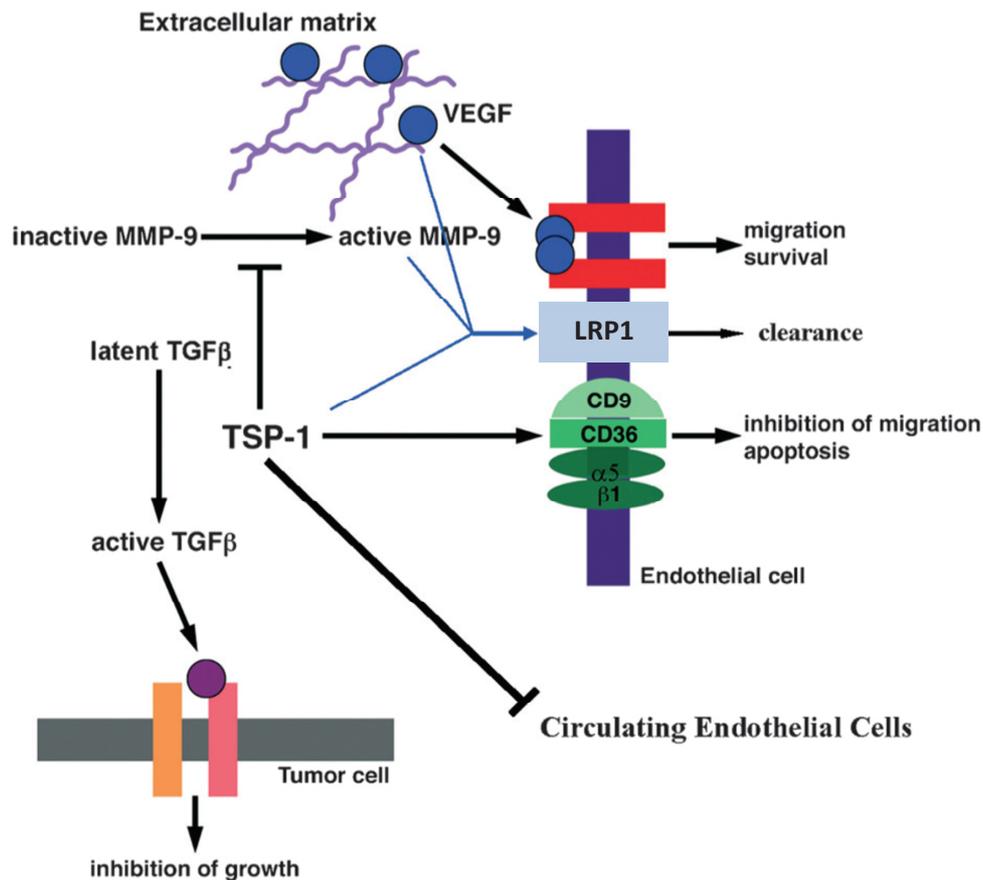


Figure 84: Rôle de la TSP-1 dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale.

La TSP-1 affecte l'angiogenèse par des effets directs sur les cellules endothéliales à travers son interaction avec CD36, les intégrines et LRP1. La TSP-1 est capable de séquestrer le VEGF et d'inhiber la mobilisation du VEGF de la matrice extracellulaire par la MMP-9. Le TGF-β activé par la TSP-1 peut inhiber l'angiogenèse et la croissance tumorale. Enfin, la TSP-1 réduit également le niveau de cellules endothéliales circulantes. Adapté de Kazerounian, S. et al. (2008).

3.1.3.4 Modèles de souris déficientes pour la TSP-1

Le phénotype de la souris knock-out (KO) pour la TSP-1, rapporté pour la première fois par Lawler et al. en 1998, est caractérisé par une lordose modérée et une tendance aux infections pulmonaires (Lawler, J. et al. 1998). Posey et al. ont montré que les souris déficientes pour la TSP-1 ou la TSP-2 présentaient une légère désorganisation des chondrocytes de la plaque de croissance, mais aucune vascularisation anormale du cartilage n'a été rapportée (Posey, K. L. et al. 2008). En revanche, la déficience en TSP-1 a pour conséquence une augmentation de la densité vasculaire rétinienne, une diminution du taux d'apoptose des cellules endothéliales et une formation excessive de capillaires dans le cœur et les muscles squelettiques (Wang, S. et al. 2003, Malek, M. H. & Olfert, I. M. 2009).

3.1.3.5 Utilisation de la TSP-1 dans des modèles *in vivo*

Dans un modèle d'arthrite induite chez le rat, l'injection intra-articulaire d'adénovirus codant la TSP-1 recombinante murine réduit la sévérité de la pathologie en limitant les niveaux de VEGF et d'IL-1 β et en inhibant le mécanisme d'angiogenèse et d'hyperplasie de la membrane synoviale (Jou, I. M. et al. 2005). Dans des modèles de réparation du cartilage, des lésions fémorales traitées par une transplantation de chondrocytes autologues associés à une matrice, sont restaurées par le développement d'un cartilage de bonne qualité exprimant la TSP-1 et la ChM-I, démontrant l'importance de la présence de ces facteurs anti-angiogéniques dans l'homéostasie du cartilage et la régulation de l'ossification endochondrale (Blanke, M. et al. 2009). Un modèle a démontré que l'application abondante de TSP-1 recombinante dans des lésions de micro-fractures empêchait la différenciation terminale des cellules mésenchymateuses stromales de la moelle osseuse, prévenant ainsi la différenciation hypertrophiques des chondrocytes et la formation d'excroissances osseuses (Gelse, K. et al. 2011). Dans ce modèle, la réparation des lésions était limitée en absence de BMP-7 recombinante associée à la TSP-1.

3.1.3.6 Applications cliniques de la TSP-1

Les bénéfices apportés par la TSP-1 dans des applications précliniques de traitements contre le cancer sont considérables et bien référencés (Ren, B. et al. 2006, Zhang, X. & Lawler, J. 2007, Carlson, C. B. et al. 2008, Mirochnik, Y. et al. 2008, Kazerounian, S. et al. 2008). Par exemple, le traitement du cancer de la prostate par l'ABR-215050 (quinoline-3-carboxamide tasquinimod) induit une surexpression de la TSP-1, parallèlement à une inhibition de l'expression du VEGF dans les tissus tumoraux (Olsson, A. et al. 2010). Au cours des malformations artério-veineuses cérébrales, également dénommées angiomes cérébraux, les cellules endothéliales présentent des caractéristiques angiogéniques différentes de celles provenant d'un cerveau sain. La TSP-1 est capable de normaliser le taux de prolifération et de migration des cellules endothéliales de ces angiomes (Stapleton, C. J. et al. 2011).

3.1.3.7 Applications cliniques de peptides mimétiques de la TSP-1 : ABT-510, ABT-526 et ABT-898

Diverses considérations logistiques empêchaient l'utilisation de la molécule globale pour le développement clinique et l'application chez l'Homme. Ceci inclut la grande taille de la TSP-1, qui générerait des coûts prohibitifs pour sa production à grande échelle et la possibilité

d'effets secondaires non désirés en raison de l'interaction de la TSP-1 avec de multiples récepteurs, molécules et cellules cibles, qui pourrait stimuler l'angiogenèse dans certaines conditions (Mirochnik, Y. et al. 2008). Une des solutions a été d'utiliser des peptides mimétiques dérivés de la TSP-1, basés sur la séquence anti-angiogénique GVITRIR du second domaine type I repeat (TSR) de la molécule (Reiher, F. K. et al. 2002). Dans un second temps, ces peptides ont été modifiés pour améliorer la demi-vie en incorporant des acides aminés synthétiques, à l'origine des peptides ABT-510, ABT-526 ou ABT-898, développés par les laboratoires Abbott (Haviv, F. et al. 2005).

L'ABT-510 est basé sur la séquence de 8 acides aminés présents dans le second domaine TSR (Figure 85), dont l'action pro-apoptotique est conduite majoritairement par son interaction avec CD36 (Haviv, F. et al. 2005, Mirochnik, Y. et al. 2008, Isenberg, J. S. et al. 2008 et 2009). Ces peptides ont démontré leur efficacité et leur sureté dans le traitement de cancers chez le chien (Rusk, A. et al. 2006a et 2006b) et de gliomes malins chez la souris (Anderson, J. C. et al. 2007). Dans un modèle de cancer ovarien épithélial murin, le traitement des souris avec le cisplatine ou le paclitaxel était plus efficace par son association avec l'ABT-510, capable d'induire la normalisation du réseau vasculaire de la tumeur en provoquant l'apoptose des cellules endothéliales des vaisseaux immatures et en permettant ainsi une meilleure assimilation du cisplatine ou paclitaxel, à l'origine d'une réduction tumorale significative (Campbell, N. E. et al. 2010).

Bien que l'ABT-526 soit principalement utilisé dans les études précliniques, l'ABT-510 a été testé au cours d'essais cliniques. Toutefois, son impact n'a pas démontré d'effet impressionnant sur son efficacité clinique dans divers cancers à des stades avancés, malgré sa bonne tolérance et ses effets secondaires négligeables aux doses testées (Hoekstra, R. et al. 2005, Ebbinghaus, S. et al. 2007, Gordon, M. S. et al. 2008, Baker, L. H. et al. 2008).

L'ABT-898 présente une modification d'un acide aminé par rapport à la séquence de l'ABT-510 (Figure 85), lui conférant une demi-vie augmentée et une meilleure stabilité plasmatique dans le but d'améliorer son efficacité dans les essais cliniques. Campbell et al. ont montré que l'ABT-898 induisait une régression des cancers ovariens épithéliaux à un stade avancé chez la souris en favorisant l'apoptose des cellules tumorales et des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins immatures, non associés à des péricytes (Campbell, N. et al. 2011). L'ABT-898 est ainsi capable de réduire le réseau vasculaire tumoral et l'expression du VEGF au sein de la tumeur.

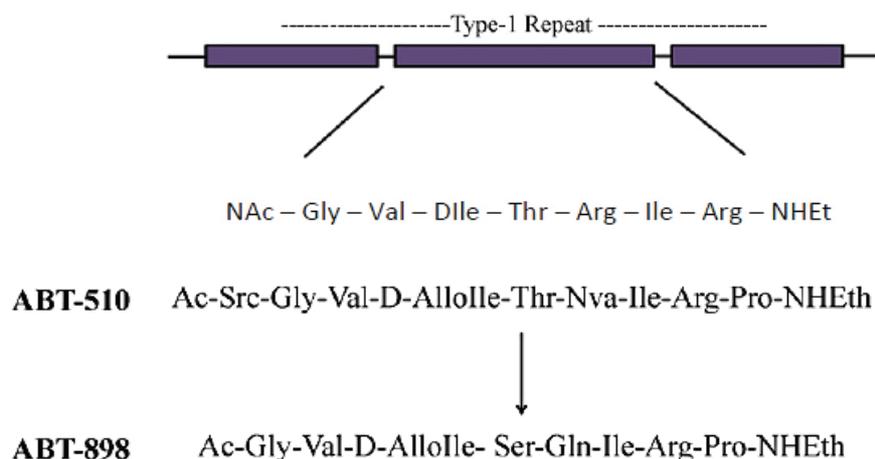


Figure 85: Génération de peptides mimétiques de la TSP-1 par les laboratoires Abbott.

Peptide original issu du second type I repeat de la TSP-1 (en haut). L’ABT-510 a été généré en ajoutant une proline (Pro) et l’acide aminé synthétique sarcosine (Sar) et en substituant une arginine (Arg) par une norvaline (Nva). Les laboratoires Abott ont par la suite modifié la séquence de l’ABT-510 pour augmenter la demi-vie du peptide. Une thréonine (Thr) a été substituée par une sérine (Ser) et la norvaline (Nva) par une glutamine (Gln) pour générer l’ABT-898.

3.1.3.8 Rôle de la TSP-1 dans le cartilage

La TSP-1 a été mise en évidence dans de nombreux tissus et notamment le cartilage articulaire et les ménisques (Miller, R. R. & McDevitt, C. A. 1988 et 1991). Elle a d’ailleurs été purifiée à partir de cartilage articulaire bovin en 1994 (Dicesare, E. et al. 1994) mais ses fonctions dans le cartilage étaient encore inconnues. Elle a été mise en évidence par immunohistochimie dans la matrice extracellulaire du cartilage de la plaque de croissance murine, principalement dans les zones de chondrocytes prolifératifs composant les couches sus-jacentes des chondrocytes hypertrophiques (Tooney, P. A. et al. 1998). Ces observations ont suggéré l’existence de facteurs anti-angiogéniques assurant l’homéostasie et la résistance du cartilage de la plaque de croissance à la vascularisation (Iruela-Arispe, M. L. et al. 1993).

Dans le cartilage humain, la présence de TSP-1 a été démontrée dans les couches intermédiaires et profondes contenant les chondrocytes pré-hypertrophiques (Pfander, D. et al. 2000). Zhao et al. ont récemment mis en avant la régulation positive de la transcription du gène THBS1 codant la TSP-1 par l’hypoxie et notamment le facteur de transcription HIF-2α (Zhao, C. et al. 2017). Les auteurs ont discuté de l’effet miroir de l’hypoxie sur l’induction de l’expression de la TSP-1 et du VEGF, en suggérant une potentielle boucle de régulation négative qui limiterait l’angiogenèse dans certaines conditions, par exemple dans le cartilage articulaire. A l’inverse, une boucle de rétrocontrôle positive a été mise en avant entre la TSP-1

et le TGF- β , puisque la TSP-1 est capable d'activer le TGF- β latent et en retour le TGF- β peut promouvoir la synthèse de TSP-1 (Zhao, C. et al. 2017).

Son expression n'a pas été détectée dans le cartilage calcifié comprenant les chondrocytes hypertrophiques (Pfander, D. et al. 2000). Des travaux plus récents ont confirmé ces résultats en étudiant la distribution des molécules constituant la matrice extracellulaire de l'ensemble des couches du cartilage humain entre la surface articulaire et l'os par spectrométrie de masse iTRAQ (Müller, C. et al. 2014). La TSP-1 et le mimecan sont ressorties comme les deux seules protéines préférentiellement retrouvées dans la couche intermédiaire du cartilage articulaire. La présence de ces deux protéines a été décrite comme diminuée dans les couches les plus profondes. Comme mentionné précédemment, il a été montré que la TSP-1 limite la différenciation hypertrophique des chondrocytes et empêche une ossification endochondrale excessive au cours du processus de réparation des lésions cartilagineuses (Gelse, K. et al. 2011).

L'ensemble de ces études propose un rôle de la TSP-1 dans le maintien de l'homéostasie du cartilage en régulant la différenciation des chondrocytes et en préservant les propriétés avasculaires du cartilage articulaire.

3.1.3.9 Rôle de la TSP-1 au cours de l'arthrose

Au cours de l'arthrose, une diminution importante de la TSP-1 dans la matrice extracellulaire du cartilage a été décrite (Pfander, D. et al. 2000). Cette observation a été confirmée récemment dans une étude évaluant par RT-qPCR l'expression génique d'une variété de facteurs régulant l'angiogenèse à l'aide d'une puce *angiogenesis array*, réalisée sur des échantillons de cartilages OA humains (Zhang, X. et al. 2016a). Cette étude a démontré une diminution de l'expression de la TSP-1 de plus de 2 fois dans les cartilages à un stade sévère d'arthrose par rapport à un stade modéré. De la même façon, une diminution de l'expression de la TSP-2 d'environ 4 fois a été mise en évidence. Dans les stades sévères d'arthrose, la diminution de la synthèse de TSP-1 s'accompagne d'une forte expression de son récepteur CD36, particulièrement dans les clusters de chondrocytes hypertrophiques (Pfander, D. et al. 2000). L'augmentation de l'expression de CD36 par les chondrocytes OA pourrait être interprétée comme une tentative de compensation pour interagir avec la TSP-1, perdue au cours de la progression de l'arthrose.

Les auteurs de ces études ont suggéré qu'un déséquilibre entre la production de facteurs pro- et anti-angiogéniques pourrait être responsable de l'angiogenèse ostéochondrale qui a lieu au cours du processus arthrosique.

Dans un modèle de transection du ligament croisé antérieur induisant une arthrose chez le rat, l'injection intra-articulaire d'un adénovirus codant la TSP-1 murine (AdTSP1) conduit à une inhibition de l'angiogenèse synoviale et de l'infiltration des macrophages, ainsi qu'une réduction des niveaux d'IL-1 β dans l'articulation (Hsieh, J. L. et al. 2010). De plus, les rats traités par les adénovirus AdTSP1 n'expriment quasiment plus de MMP-13 dans leur cartilage articulaire, contrairement aux rats OA contrôles, limitant ainsi les changements structuraux pathologiques, caractéristiques de la progression de l'arthrose. De manière intéressante, aucun ostéophyte n'a été détecté chez les rats traités. Cette étude a donc suggéré les potentielles applications thérapeutiques de la TSP-1 dans le traitement de l'arthrose.

Au vu des résultats de nos études *in vitro*, qui démontraient une diminution significative de la TSP-1 dans les cultures de chondrocytes hypertrophiques murins et humains, nous nous sommes interrogés sur le rôle que pourrait jouer la TSP-1 dans l'inhibition de la différenciation hypertrophique des chondrocytes de notre modèle murin. Dans ce but, nous avons réalisé des études *in vitro* à partir de chondrocytes issus de souris TSP-1^{-/-} afin d'étudier les conséquences de l'absence de cette molécule au cours du processus de différenciation hypertrophique des chondrocytes. Nous avons également étudié le rôle de la TSP-1 *in vivo* dans la progression de l'arthrose et dans l'angiogenèse ostéochondrale dans un modèle murin d'arthrose induite par déstabilisation du ménisque médial (DMM) chez des souris TSP-1^{-/-}. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'implication de la TSP-1 au cours de la pathologie humaine et notamment de son lien avec l'angiogenèse ostéochondrale et la progression de l'arthrose.

3.1.4 Etude du rôle de la TSP-1 dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes murins

Le cartilage articulaire sain présente la capacité de maintenir l'état de différenciation des chondrocytes qui le composent et de résister à la vascularisation. Compte tenu de la diminution de la TSP-1 dans le cartilage de la plaque de croissance autour des chondrocytes hypertrophiques et dans le cartilage arthrosique, tous deux vascularisés, nous nous sommes interrogés sur le rôle potentiellement joué par ce facteur anti-angiogénique dans le maintien du phénotype chondrocytaire et dans la protection du cartilage articulaire contre une invasion

vasculaire. Dans ce but, nous avons tout d'abord étudié l'implication de la TSP-1 dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes grâce à notre modèle *in vitro*, reproduit pour différencier des chondrocytes articulaires issus de souris déficientes pour la TSP-1. Son rôle dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéochondrale a ensuite été évalué dans un modèle murin d'arthrose mécanique.

3.1.4.1 Différenciation hypertrophique de chondrocytes articulaires TSP-1^{-/-}

Le potentiel de minéralisation des matrices extracellulaires des chondrocytes knock-out pour la TSP-1 a été déterminé par le dosage de la coloration au rouge alizarine des cultures au cours de leur différenciation hypertrophique. Nous constatons que le niveau de minéralisation des matrices des chondrocytes hypertrophiques KO pour la TSP-1 ($DO_{405nm} = 0,37$ en moyenne) (Figure 86) n'est significativement pas différent de celui précédemment mesuré dans les chondrocytes hypertrophiques WT ($DO_{405nm} = 0,48$ en moyenne) (Figure 67).

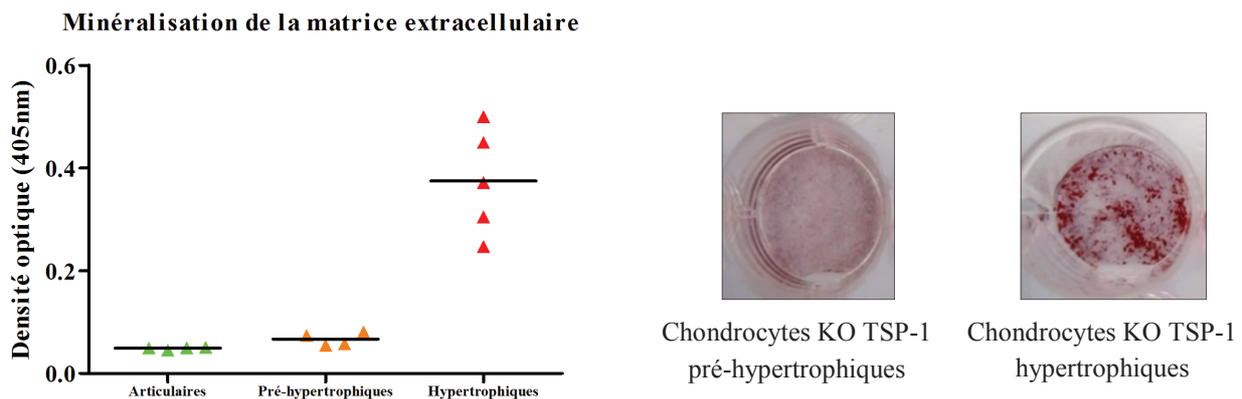


Figure 86: Evaluation du potentiel de minéralisation des matrices extracellulaires des chondrocytes déficients pour la TSP-1.

Mesure du degré de calcification des chondrocytes articulaires (▲), pré-hypertrophiques (▲) et hypertrophiques (▲) issus de souris KO pour la TSP-1, après coloration au rouge alizarine (densité optique à 405 nm). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=4 pour les chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques, n=5 pour les chondrocytes hypertrophiques). Photographies représentatives de 5 expériences indépendantes.

De la même façon, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les chondrocytes déficients pour la TSP-1 et les chondrocytes WT pour l'expression des marqueurs chondrocytaires étudiés (Figure 87), tels que Col2a1, ChM-I, Acan (non montrée), ni pour les marqueurs de l'hypertrophie, tels que Runx2, Osx, Mmp13 (non montrée), quel que soit le stade de différenciation de ces chondrocytes.

Nous n'observons pas d'augmentation de l'expression de Thbs2 par compensation de la déficience de Thbs1 dans ces chondrocytes (Figure 88). L'unique différence remarquée entre les chondrocytes WT et les chondrocytes TSP-1^{-/-} serait une tendance à l'augmentation de l'expression de Cd36, un des récepteurs de la TSP-1, dans les chondrocytes déficients pour cette dernière.

Finalement, d'après les paramètres étudiés, la déficience en TSP-1 ne semble pas favoriser la différenciation hypertrophique des chondrocytes murins en culture. L'absence de TSP-1 dans ces chondrocytes n'induit ni de minéralisation plus importante des matrices des chondrocytes hypertrophiques, ni d'augmentation de l'expression de marqueurs de l'hypertrophie.

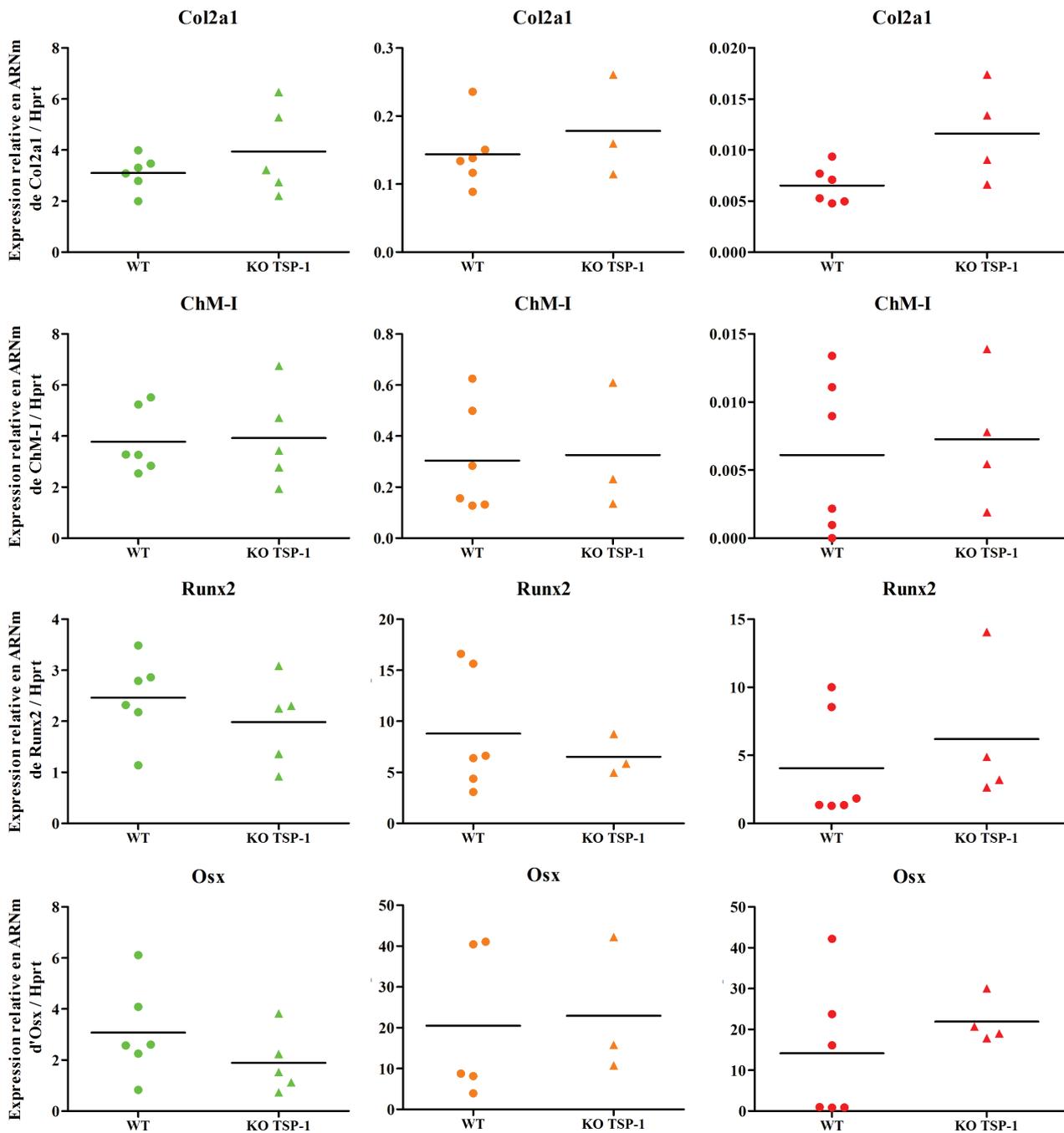


Figure 87: Comparaison de l'expression génique de marqueurs chondrocytaires et de marqueurs de l'hypertrophie par les chondrocytes murins WT et TSP-1^{-/-}.

L'expression en ARNm a été comparée entre les chondrocytes articulaires (●), pré-hypertrophiques (●) et hypertrophiques (●) issus de souriceaux WT et entre les chondrocytes articulaires (▲), pré-hypertrophiques (▲) et hypertrophiques (▲) issus de souriceaux KO pour la TSP-1 (TSP-1^{-/-}). L'expression relative de chaque gène est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données, n=6 pour les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques WT, n=5 pour les chondrocytes articulaires TSP-1^{-/-}, n=3 pour les chondrocytes pré-hypertrophiques TSP-1^{-/-} et n=4 pour les chondrocytes hypertrophiques TSP-1^{-/-}.

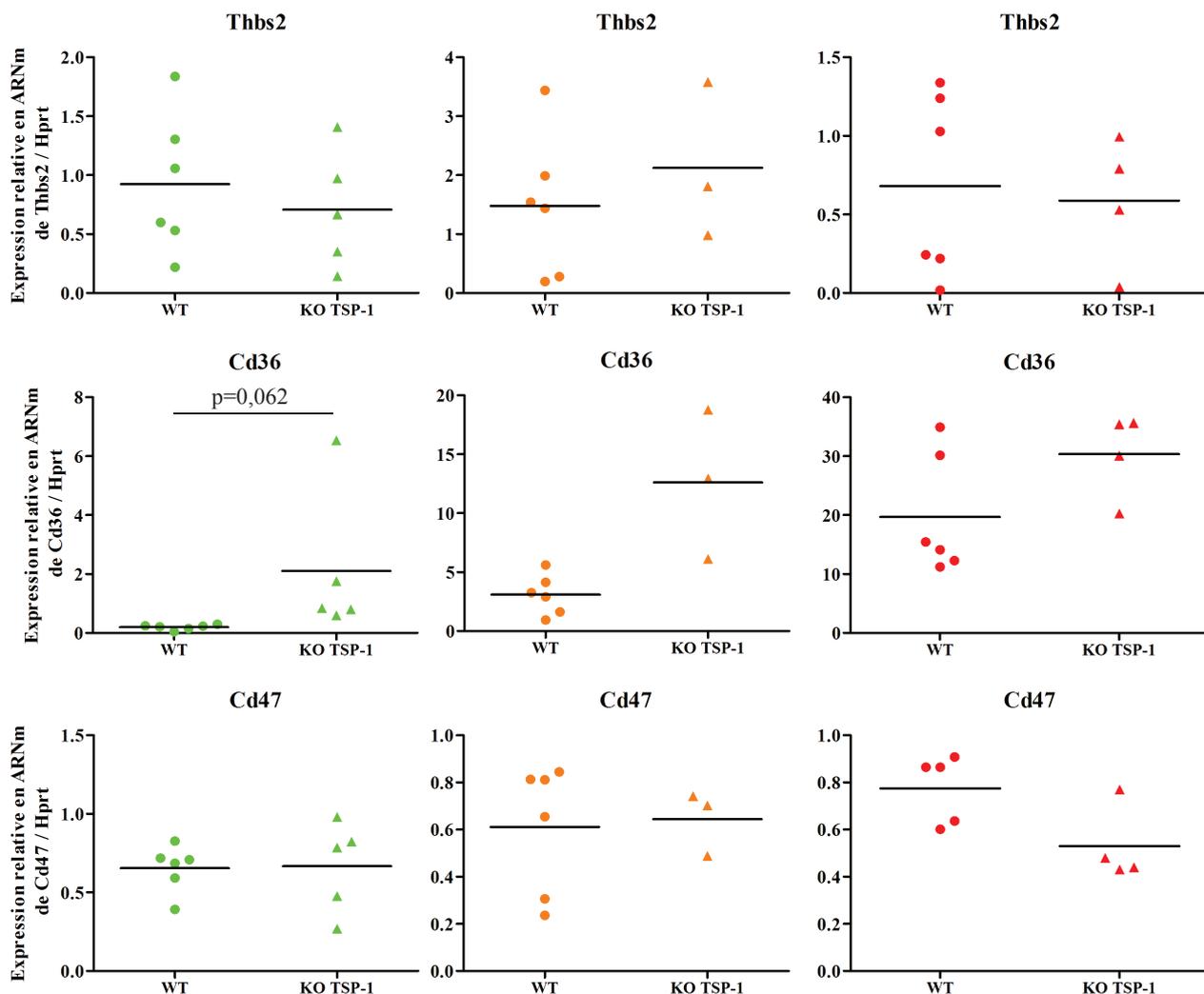


Figure 88: Comparaison de l'expression génique de Thbs2 et des récepteurs de TSP-1 (Cd36 et Cd47) par les chondrocytes murins WT et TSP-1^{-/-}.

L'expression relative de chaque gène est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données, n=6 pour les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques WT, n=5 pour les chondrocytes articulaires TSP-1^{-/-}, n=3 pour les chondrocytes pré-hypertrophiques TSP-1^{-/-} et n=4 pour les chondrocytes hypertrophiques TSP-1^{-/-}.

3.1.4.2 Potentiel angiogénique des chondrocytes TSP-1^{-/-}

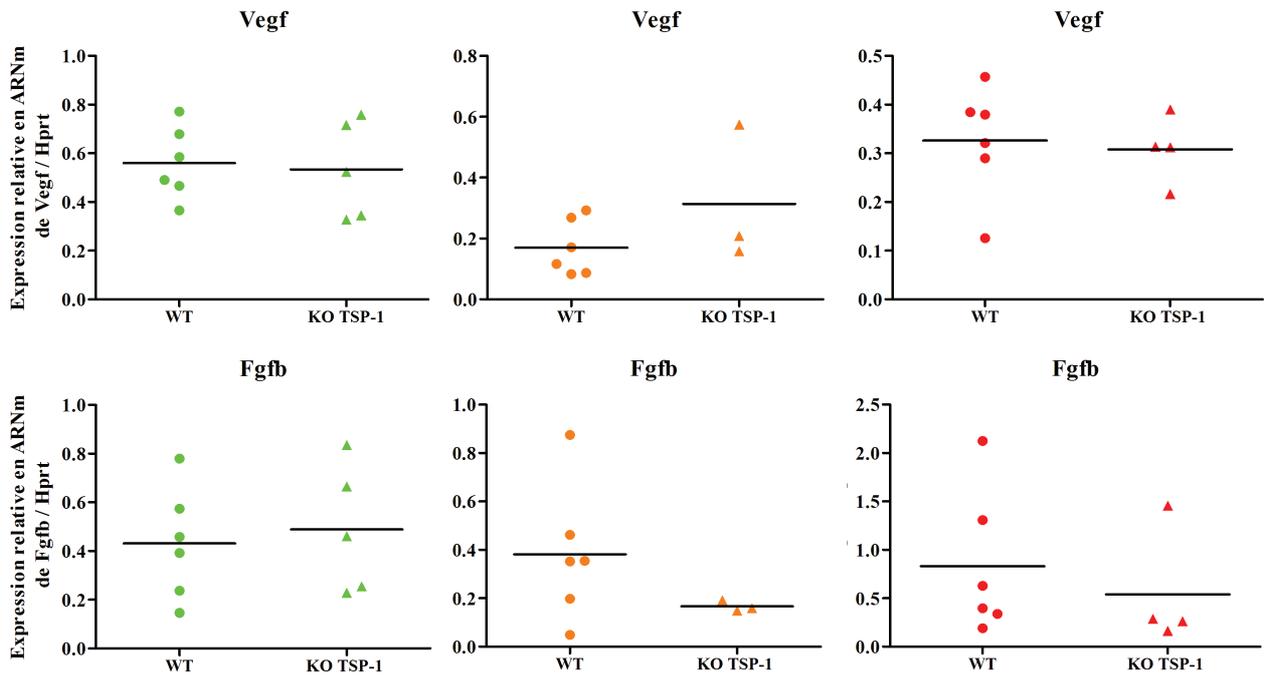
Le potentiel angiogénique des chondrocytes déficients pour la TSP-1 a été comparé à celui des chondrocytes WT, étudié précédemment. A l'échelle moléculaire, nous n'observons pas de variation significative de l'expression des facteurs pro-angiogéniques, tels que le Vegf, Fgfb et Tgfb1 (non montré) par rapport aux chondrocytes WT, au même stade de différenciation (Figure 89A).

Comme observé dans les chondrocytes WT, la différenciation hypertrophique des chondrocytes KO TSP-1 s'accompagne d'une sécrétion accrue de VEGF dans les surnageants de culture et les lysats cellulaires (Figure 89B). Une production augmentée de bFGF est également montrée dans les lysats des chondrocytes KO TSP-1 hypertrophiques par rapport aux KO TSP-1 pré-hypertrophiques.

De manière intéressante, nous observons une tendance à l'augmentation de la sécrétion de VEGF dans les milieux conditionnés des chondrocytes KO TSP-1 par rapport aux WT, principalement pour les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques (Figure 89B). En effet, des concentrations supérieures en VEGF, respectivement de 1,4 fois et de 1,7 fois, ont été dosées dans les milieux conditionnés des chondrocytes KO TSP-1 pré-hypertrophiques et hypertrophiques par rapport aux milieux des chondrocytes WT. A l'inverse, peu de différences significatives sont observées pour les productions de VEGF et de bFGF dans les lysats des chondrocytes WT et TSP-1^{-/-}, excepté une tendance à l'augmentation de la production de VEGF par 3,1 fois dans les lysats des chondrocytes articulaires KO TSP-1 par rapport aux chondrocytes articulaires WT.

Finalement, dans cette étude *in vitro*, la TSP-1 présente dans les lysats semble jouer un rôle dans la régulation de l'angiogenèse en inhibant la sécrétion de VEGF dans les milieux conditionnés des chondrocytes en cours de différenciation hypertrophique.

A



B

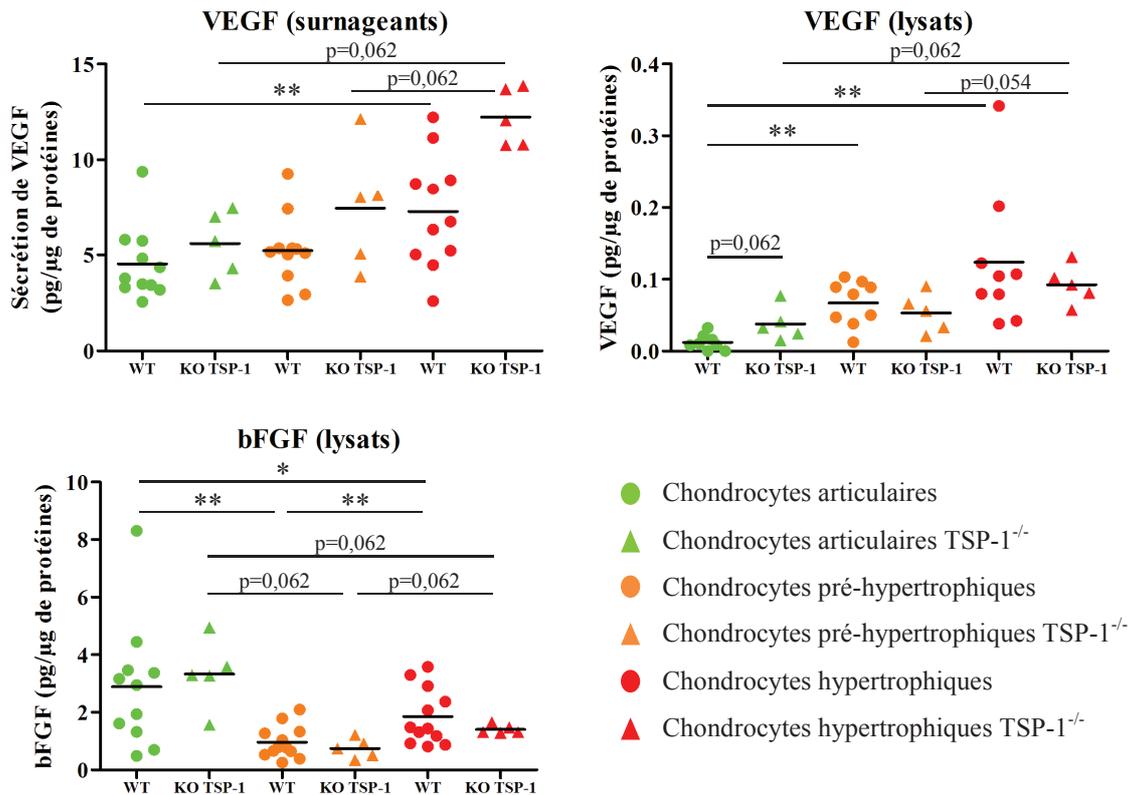


Figure 89: Comparaison du potentiel angiogénique des chondrocytes murins TSP-1^{-/-} par rapport aux chondrocytes WT.

(A) L'expression relative de Vegf et Fgfb dans les chondrocytes WT et KO TSP-1 est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données, n=6 pour les chondrocytes articulaires, pré-

hypertrophiques et hypertrophiques WT, n=5 pour les chondrocytes articulaires TSP-1^{-/-}, n=3 pour les chondrocytes pré-hypertrophiques TSP-1^{-/-} et n=4 pour les chondrocytes hypertrophiques TSP-1^{-/-}. (B) Dosage par ELISA de la production de bFGF dans les lysats cellulaires des chondrocytes TSP-1^{-/-} et de VEGF dans les lysats et les surnageants des chondrocytes TSP-1^{-/-}, récupérés après 24h d'incubation. La quantité de facteurs angiogéniques dosée (en pg) dans les lysats cellulaires et les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en µg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=5), comparés aux données obtenues pour les chondrocytes WT, présentées dans la figure 74. * p<0,05, ** p<0,01.

3.1.4.3 Effets d'un peptide mimétique de la TSP-1 : l'ABT-510

Nous nous sommes intéressés aux effets d'un peptide mimétique de la TSP-1, le composé ABT-510, sur les chondrocytes murins aux 3 stades de différenciation, en condition normale et inflammatoire. Dans ce but, l'expression de marqueurs de différenciation et de facteurs de l'angiogenèse a été étudiée en réponse à deux doses d'ABT-510 (100 nM et 1 µM), en présence ou non d'IL-1β à 1 ng/mL.

Aucune réponse significative sur l'expression des gènes cibles étudiés (Col2a1, Acan, ChM-I, Runx2, Osx, Mmp13, Il6, Vegf, Fgfb, Tgfb1, Cd36, Cd47, Thbs1 et Thbs2) n'a été mise en évidence dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques, en réponse aux 2 doses d'ABT-510 testées, en condition normale (données non montrées). Le même constat a été réalisé en condition inflammatoire, en présence d'IL-1β à 1 ng/mL, excepté dans les chondrocytes pré-hypertrophiques, capables de moduler l'expression de certains gènes cibles en réponse à l'ABT-510 (Figure 90). En effet, nous observons une faible induction de l'expression d'Acan, de ChM-I et de Runx2 en réponse à 1 µM d'ABT-510 dans les chondrocytes pré-hypertrophiques soumis à un stress inflammatoire pendant 24h. A l'inverse, l'expression du Vegf est significativement diminuée d'en moyenne 1,6 fois en réponse à 100 nM d'ABT-510 par rapport à la condition contrôle. L'expression du gène codant l'IL-6 est également réduite de près de 1,4 fois en réponse à 1 µM d'ABT-510. De manière intéressante, les chondrocytes pré-hypertrophiques voient leur expression de Thbs1 et Thbs2 significativement augmenter, respectivement de 9,1 fois et de 2,1 fois, en réponse à la dose maximale d'ABT-510 par rapport à la condition contrôle. Ces résultats suggèrent que l'ABT-510 réverserait les effets de l'IL-1β sur les chondrocytes pré-hypertrophiques, en réduisant l'expression du Vegf et en augmentant l'expression de Thbs1 et Thbs2. Parallèlement, l'expression du récepteur CD36 présente une tendance à l'augmentation.

L'expression des autres gènes étudiés ne présente pas de variation significative en réponse à l'ABT-510.

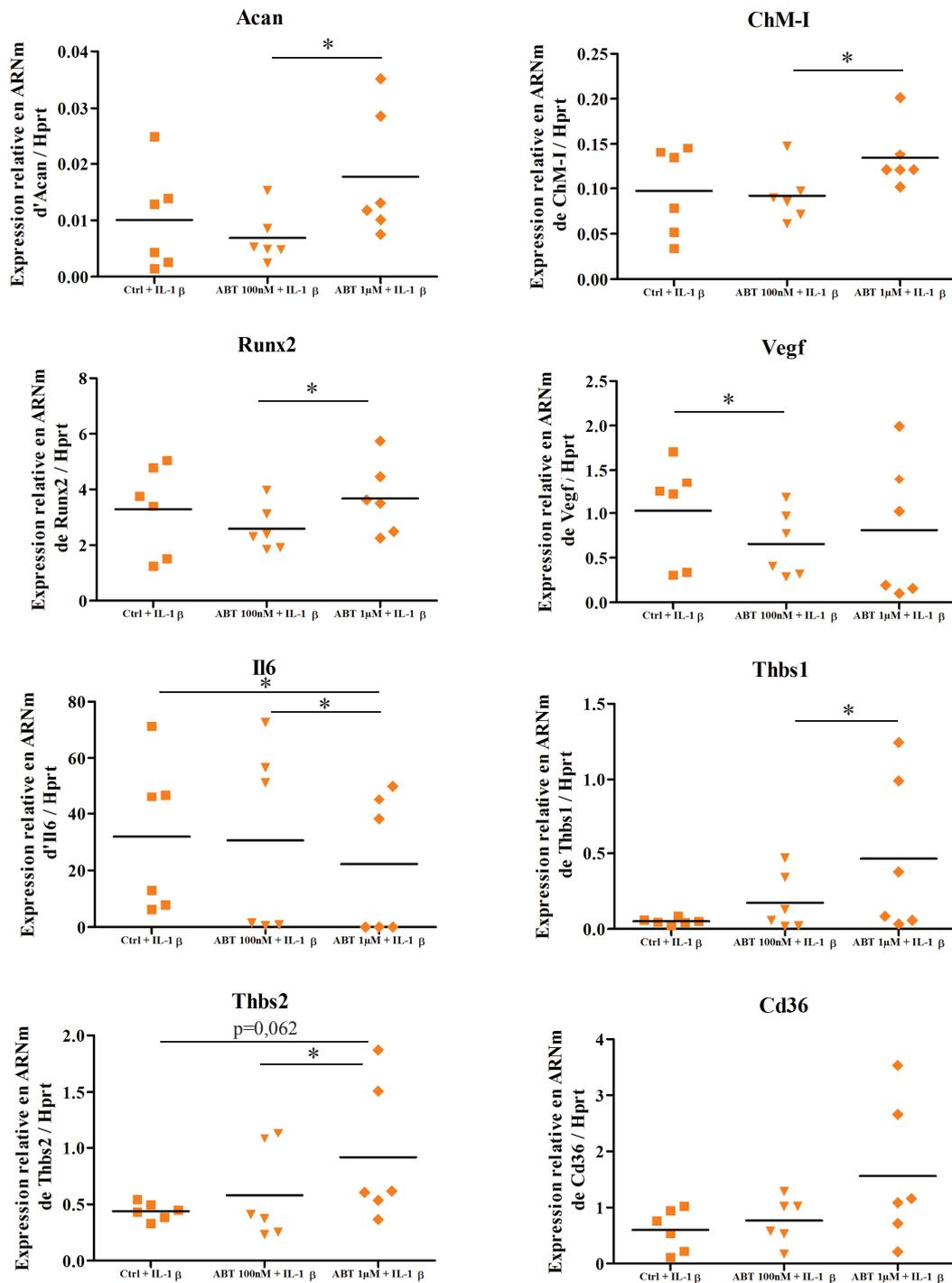


Figure 90: Evaluation de l'expression de marqueurs de différenciation et de facteurs de l'angiogenèse par les chondrocytes murins pré-hypertrophiques en réponse à l'ABT-510, en condition inflammatoire.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes pré-hypertrophiques incubés pendant 24h en présence d'IL-1 β à 1 ng/mL avec ou sans ABT-510 à 100 nM ou 1 μ M. L'expression

relative de chaque gène est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

Ces expériences reproduites avec les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques déficients pour la TSP-1 nous apportent des résultats préliminaires (n=3) similaires. En effet, l'ABT-510 semble à nouveau induire une réponse cellulaire observable uniquement dans les chondrocytes KO TSP-1 pré-hypertrophiques en condition inflammatoire (Figure 91). Nous constatons notamment une diminution des expressions de Fgfb et de Mmp13, non observées dans les chondrocytes WT en réponse à l'ABT-510, ainsi qu'une diminution de l'expression d'Il6 et Vegf, davantage marquée que dans les chondrocytes pré-hypertrophiques WT. En revanche, aucune différence notable pour l'expression des marqueurs de différenciation (Col2a1, Acan, ChM-I, Runx2, Osx) n'est mise en évidence.

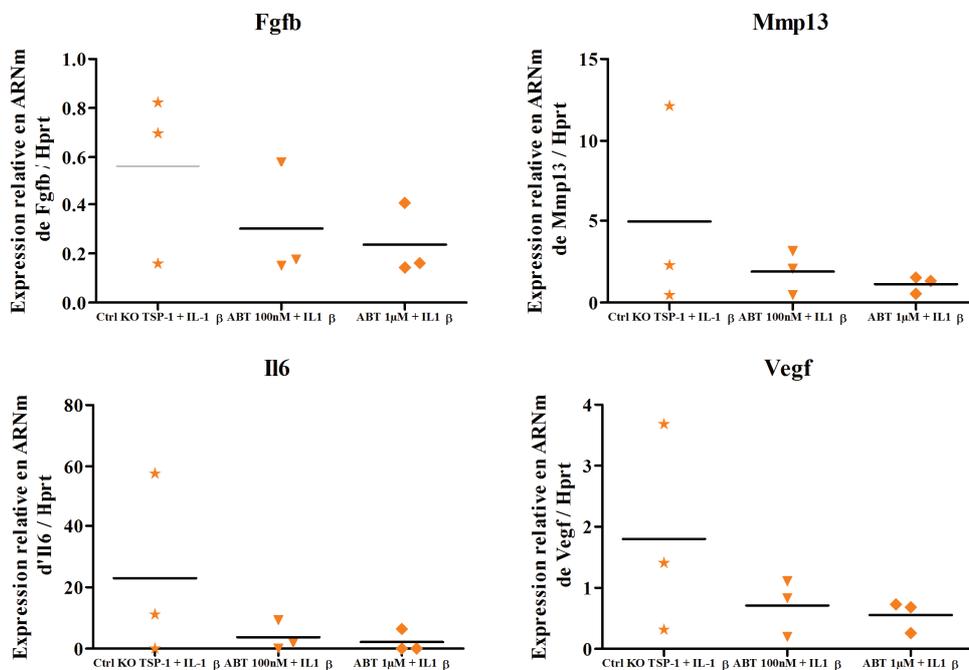


Figure 91: Evaluation de l'expression de gènes cibles par les chondrocytes murins pré-hypertrophiques KO TSP-1 en réponse à l'ABT-510, en condition inflammatoire.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes pré-hypertrophiques KO TSP-1 incubés pendant 24h en présence d'IL-1β à 1 ng/mL avec ou sans ABT-510 à 100 nM ou 1 μM. L'expression relative de chaque gène est rapportée à l'expression du gène de référence Hprt. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=3).

En définitive, il est intéressant de noter un effet significatif de l'ABT-510 exclusivement en condition inflammatoire dans les cultures de chondrocytes pré-hypertrophiques, qui présentent naturellement une accumulation de TSP-1. Ce peptide semble ainsi présenter une

fenêtre d'action limitée à un phénotype particulier (pré-hypertrophique) dans un contexte donné (inflammatoire).

En condition inflammatoire, nous avons précédemment démontré la diminution significative de la synthèse de TSP-1 par les chondrocytes pré-hypertrophiques, accompagnée d'une diminution significative de l'expression de marqueurs de la différenciation (Figures 78 à 81). A ce stade de différenciation, l'apport d'un peptide mimétique de la TSP-1 pendant 24h permet de restreindre la diminution de l'expression des gènes de différenciation (Acan, ChM-I, Runx2). L'ABT-510 serait donc susceptible de limiter l'effet de l'IL-1 β sur la dédifférenciation des chondrocytes pré-hypertrophiques. En condition normale, la TSP-1 endogène jouerait son rôle dans la régulation du phénotype des chondrocytes pré-hypertrophiques, expliquant le fait que nous n'observons pas d'effet additionnel du peptide mimétique sur les paramètres étudiés. Au vu de ces résultats, la TSP-1 pourrait donc jouer un rôle dans le maintien du phénotype des chondrocytes pré-hypertrophiques.

Dans le cartilage articulaire, ces chondrocytes pré-hypertrophiques présents dans les couches profondes à proximité de la jonction ostéochondrale semblent essentiels au maintien de la barrière anti-angiogénique (expression de ChM-I et TSP-1) pour contrer la vascularisation en provenance du cartilage calcifié et de l'os sous-chondral.

En conclusion, ces travaux *in vitro* ont montré que la TSP-1, fortement synthétisée par les chondrocytes pré-hypertrophiques, semble impliquée dans la régulation de l'angiogenèse en inhibant l'expression et la production de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. La TSP-1 participerait également au maintien du phénotype des chondrocytes pré-hypertrophiques de notre modèle *in vitro*.

3.1.5 Rôle de la TSP-1 dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéocondrale dans un modèle murin d'arthrose mécanique

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle que pourrait jouer la TSP-1 dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéocondrale dans un modèle murin d'arthrose expérimentalement induite.

3.1.5.1 Modèle de déstabilisation du ménisque médial (DMM)

Le modèle de déstabilisation du ménisque médial (DMM) est le modèle d'arthrose mécanique de référence (Glasson, S. S. et al. 2007). Il consiste à déstabiliser le ménisque médial en sectionnant le ligament ménisco-tibial médial. Cette chirurgie compromet la stabilité mécanique de l'articulation du genou, qui est à l'origine d'un stress mécanique local excessif, induisant des lésions du cartilage similaires à celles observées au cours de l'arthrose humaine. Il s'agit d'un modèle facilement reproductible, très utile pour étudier l'implication d'une molécule dans le processus arthrosique chez des souris KO (Glasson, S. S. et al. 2004). Grâce à ce modèle DMM, le rôle de la TSP-1 dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéocondrale a été évalué à l'aide des souris TSP-1^{-/-}.

Chez ces souris TSP-1^{-/-}, la sévérité de l'arthrose (score OARSI), la présence d'ostéophytes et la vascularisation ostéocondrale ont été déterminées à 8 semaines post-opératoires (Figure 92). Toutes les souris opérées, WT et KO pour la TSP-1, présentent une arthrose 8 semaines après la chirurgie par comparaison aux groupes SHAM WT et KO. Il s'agit toutefois d'une arthrose précoce, caractérisée par un score OARSI moyen de 2,75 pour le groupe de souris WT et de 3 pour le groupe de souris KO TSP-1. Les deux groupes de souris présentent également des ostéophytes dans 85,7% des cas. Enfin, la vascularisation sous-chondrale, définie par le nombre de vaisseaux d'orientation orthogonale de l'os sous-chondral vers le cartilage calcifié, est significativement augmentée chez les souris WT et les souris TSP-1^{-/-}, par rapport aux souris SHAM. Cependant, aucune différence significative n'est constatée entre les souris WT et TSP-1^{-/-} à 8 semaines post-DMM.

Grâce à ce modèle, nous retrouvons le lien entre l'augmentation de la vascularisation sous-chondrale et la progression de l'arthrose décrit dans la littérature (Mapp, P. I. et al. 2008, Pan, J. et al. 2012, Saito, M. et al. 2012). Toutefois, l'implication de la TSP-1 dans ces processus n'a pas été démontrée.

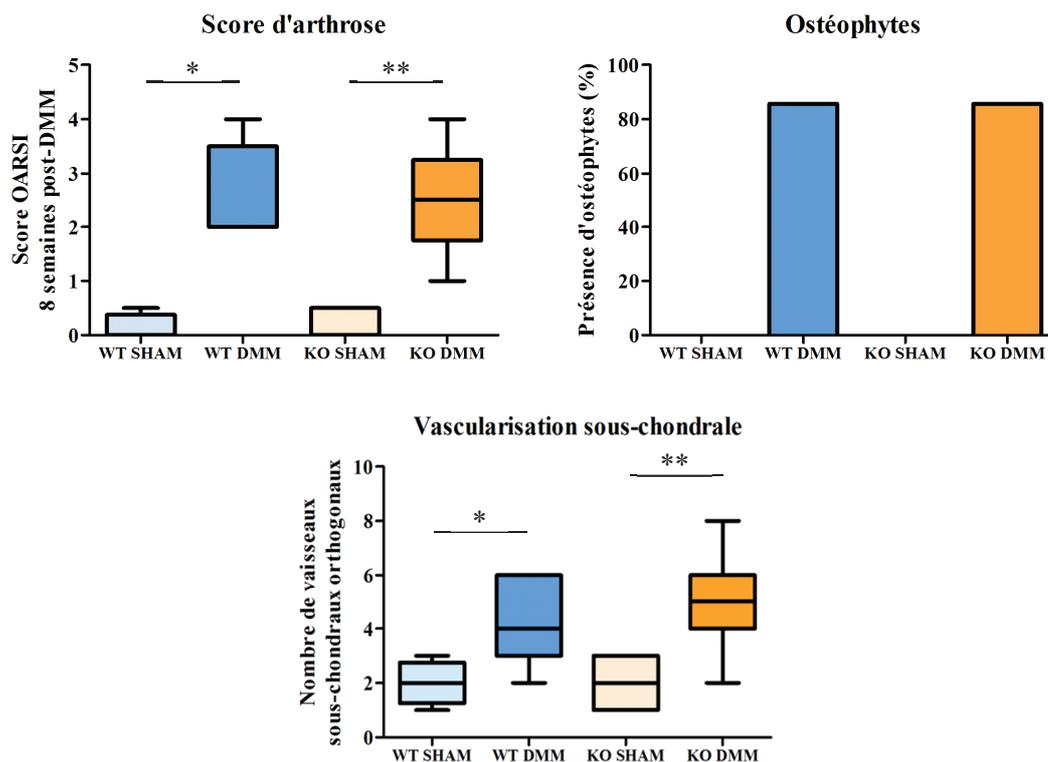


Figure 92: Evaluation du score OARSI, de la présence d'ostéophytes et de la vascularisation ostéochondrale chez les souris WT et TSP-1^{-/-} 8 semaines post-DMM.

Ces paramètres ont été évalués dans le groupe de souris WT SHAM (n=4), WT DMM (n=5), KO TSP-1 SHAM (n=5) et KO TSP-1 DMM (n=6). Le score OARSI et la présence d'ostéophytes ont été déterminés d'après les coupes histologiques des genoux droits opérés. Le nombre de vaisseaux sous-chondraux orthogonaux a été comptabilisé à partir des images acquises par nano-CT (nano-computed tomography). * p<0,05, ** p<0,001.

Nous nous sommes également intéressés à différents paramètres morphologiques de l'os trabéculaire de l'épiphyse tibiale interne de ces souris. Grâce à l'imagerie nano-CT, le volume minéral osseux (BV/TV), correspondant au ratio entre le volume des travées et le volume total du tissu, le nombre de travées (Tb.N), l'espacement entre les travées (Td.Sp) et enfin l'épaisseur des travées (Tb.Th) ont été évalués dans les 4 groupes de souris à 8 semaines post-opératoires (Figure 93).

Chez les souris WT DMM, l'induction d'une arthrose mécanique a pour conséquence une perte osseuse, caractérisée par une diminution du BV/TV par comparaison aux souris WT SHAM. Cette perte osseuse est essentiellement traduite par une diminution du nombre de travées (Tb. N) et un espacement plus important entre ces travées (Tb. Sp). Leur épaisseur (Tb. Th) reste en revanche inchangée.

Chez les souris KO TSP-1 SHAM, nous constatons que les paramètres morphologiques osseux étudiés sont totalement distincts des souris WT SHAM. En effet, une perte osseuse significative (BV/TV diminué) est présente dès l'état basal chez ces souris déficientes pour la TSP-1, avec un nombre de travées (Tb. N) diminué et un espace inter-trabéculaire (Tb. Sp) augmenté. Contrairement aux souris WT, l'induction d'une arthrose par DMM n'entraîne aucune conséquence sur les paramètres osseux des souris KO TSP-1.

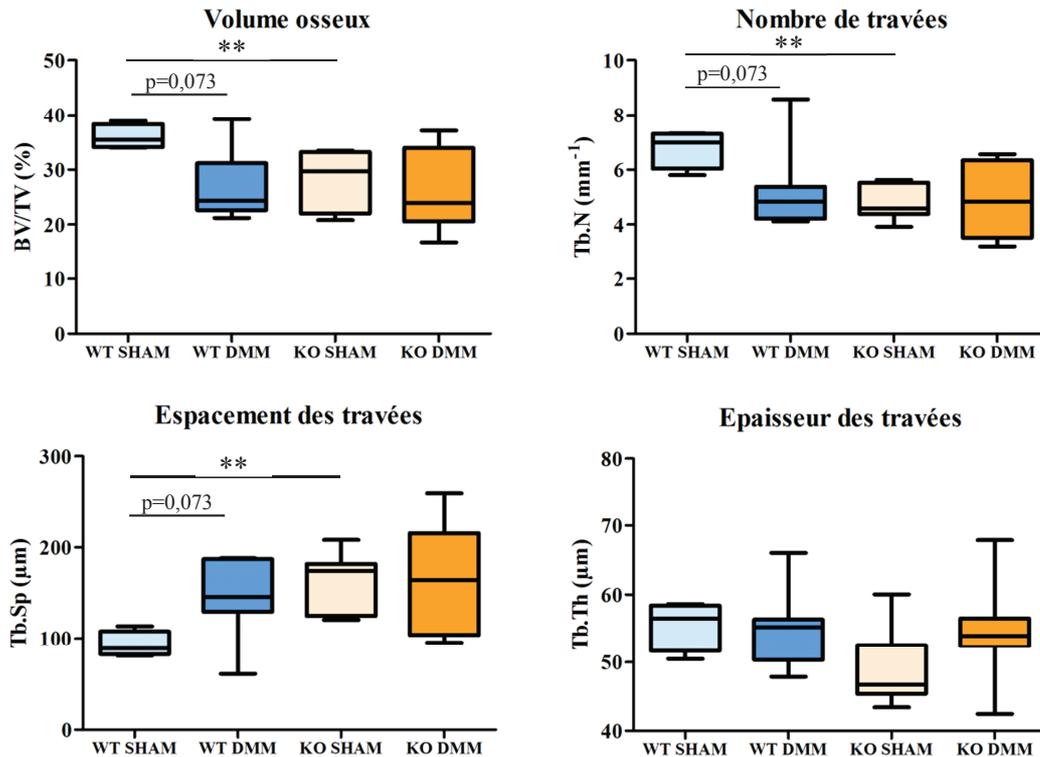


Figure 93: Evaluation de paramètres morphologiques de l'os trabéculaire de l'épiphyse tibiale interne chez les souris WT et TSP-1^{-/-} 8 semaines post-DMM.

Le volume minéral osseux (BV/TV), le nombre de travées (Tb.N), l'espacement entre les travées (Tb.Sp) et l'épaisseur des travées (Tb.Th) ont été mesurés à partir des images nano-CT. ** p<0,001.

Finalement, nous n'avons pas établi de lien évident entre la déficience en TSP-1, l'augmentation de la vascularisation ostéocondrale et l'aggravation de la sévérité de l'arthrose induite par DMM. Dans ce modèle, la TSP-1 ne semble donc pas impliquée dans la protection du cartilage articulaire contre l'invasion vasculaire et contre la progression de l'arthrose. Toutefois, nous avons démontré l'existence d'un phénotype osseux de type ostéoporotique dans l'os sous-chondral de l'épiphyse tibiale de ces souris TSP-1^{-/-}. Des études complémentaires sur les souris en vieillissement naturel, âgées de 6, 9, 12 et 18 mois en cours d'expérimentation au laboratoire, permettront d'analyser le développement de cette

ostéoporose et les conséquences sous-jacentes sur la fonctionnalité des articulations de ces souris. Le risque de développement d'une arthrose précoce sera également évalué par comparaison aux souris WT. Les mécanismes moléculaires conduisant à une arthrose post-traumatique ou liée au vieillissement pourraient être différents. L'implication de la TSP-1 pourrait de ce fait être différente dans ces deux types d'arthrose.

3.1.6 Implication de la TSP-1 au cours de la pathologie humaine

L'implication de la TSP-1 dans la progression de l'arthrose humaine a été évaluée par immunohistochimie sur des coupes de cartilages de patients arthrosiques, présentant différents stades d'arthrose. L'intensité et la répartition du marquage TSP-1 sur les coupes ont été définies par un score compris entre 0 et 3.

Dans un cartilage articulaire présentant un stade précoce d'arthrose (SMm = 2), l'immunomarquage TSP-1 est intense (score = 3), avec une localisation principalement péri-cellulaire dans l'ensemble des couches du cartilage articulaire (Figure 94D et G). Comme attendu, le cartilage calcifié, comportant les chondrocytes hypertrophiques, ne présente pas de marquage TSP-1. Dans un cartilage présentant une arthrose modérée (SMm = 7,5), un marquage TSP-1 diminué (score = 2) est observé dans l'ensemble du cartilage (Figure 94E et H). Cette diminution est davantage constatée dans les couches les plus profondes, à proximité de la jonction ostéochondrale. A un stade plus avancé d'arthrose (SMm = 9,5), un immunomarquage TSP-1 très faible (score = 1) est principalement repéré dans les couches les plus superficielles du cartilage articulaire (Figure 94F).

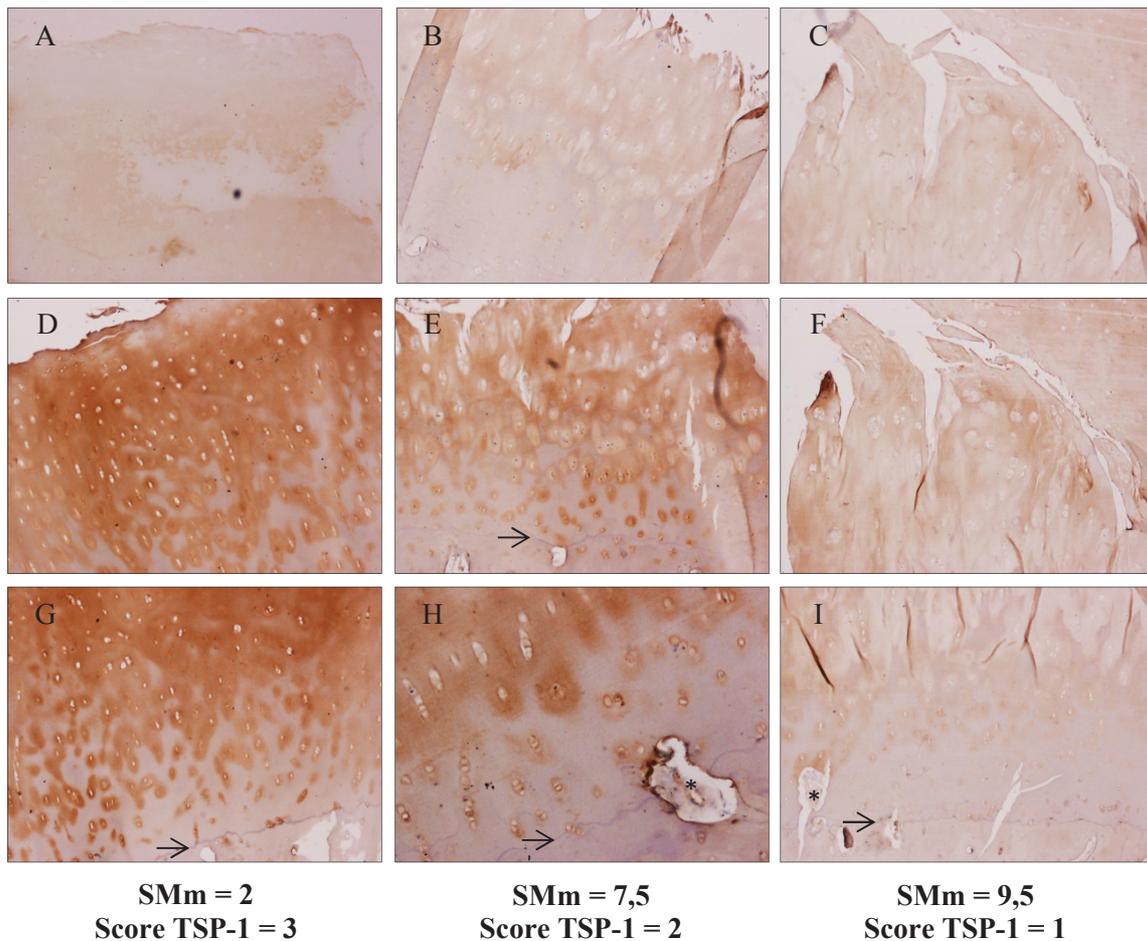


Figure 94: Evaluation de la présence de la TSP-1 dans la matrice extracellulaire du cartilage articulaire à des stades évolutifs d'arthrose.

Immunohistochimie de la TSP-1 sur des coupes de cartilages OA à différents stades d'arthrose (Score de Mankin modifié, SMm) : arthrose légère (SMm = 2), modérée (SMm = 7,5) et sévère (SMm = 9,5). (A-B-C) correspondent au marquage par l'IgG isotype (IgG1 de souris), (D-E-F) au marquage TSP-1 à la surface articulaire et (G-H-I) proche de la jonction ostéochondrale (→) sur les mêmes coupes de cartilages D-E-F, à différents stades d'arthrose. Le score du marquage de la TSP-1 attribué à chaque coupe de cartilage (n=19) correspond à la moyenne du score déterminé par deux observateurs indépendamment. (D-G) SMm de 2 et score TSP-1 de 3. (D) Un marquage intense de la TSP-1 est principalement localisé en péri-cellulaire dans l'ensemble des couches du cartilage articulaire. (G) Ce marquage est au contraire diminué à l'approche de la tidemark (→) et du cartilage calcifié. (E-H) SMm de 7,5 et score TSP-1 de 2. (E) Un marquage modéré de la TSP-1 est présent dans la matrice péri-cellulaire du cartilage arthrosique, aminci par l'érosion et la fibrillation. (H) Ce marquage est diminué à proximité de la tidemark (→) et du cartilage calcifié. (F-I) SMm de 9,5 et score TSP-1 de 1. (F) Un faible marquage est observé dans la matrice péri-cellulaire des couches superficielles du cartilage articulaire. (I) Un marquage extrêmement faible est présent dans les couches plus profondes du cartilage, jusqu'à disparaître totalement à l'approche de la tidemark (→) et des chenaux vasculaires de la jonction ostéochondrale (*). Ces photographies ont été prises au grossissement x40, excepté l'image (H) obtenue au grossissement x200.

De manière intéressante, nous constatons que l'intensité du marquage de la TSP-1 sur les coupes (n=19) est inversement corrélée au niveau de dégradation du cartilage chez ces patients arthrosiques ($r = -0,550$, $p = 0,015$) (Figure 95A).

En regroupant les patients selon leur stade d'arthrose (Figure 95B), défini par une arthrose légère (SMm entre 1 et 4), modérée (SMm entre 4 et 8) ou sévère (SMm supérieur à 8), nous observons une diminution significative du marquage de la TSP-1 dans les matrices péri-cellulaires des cartilages des patients présentant une arthrose sévère. En revanche, nous n'observons pas de différence significative entre les patients souffrant d'une arthrose légère et modérée. Notons seulement une tendance à la diminution du marquage de la TSP-1 au cours de l'évolution de l'arthrose.

Ces résultats suggèrent donc un lien entre la diminution de la TSP-1 dans le cartilage articulaire et la progression de l'arthrose chez les patients.

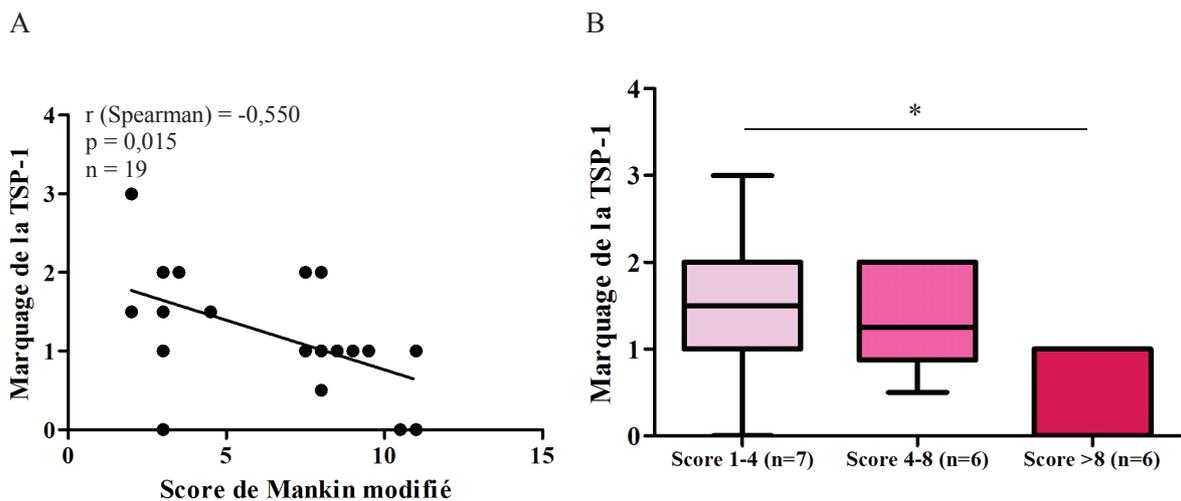


Figure 95: Corrélation entre la présence de TSP-1 dans le cartilage articulaire et la sévérité de l'arthrose chez des patients ayant subi une arthroplastie totale de genou.

(A) Le score du marquage de la TSP-1 attribué à chaque coupe correspond à la moyenne du score déterminé par deux observateurs indépendamment. La sévérité de l'arthrose est représentée par le score de Mankin modifié (SMm). (B) Quantification du marquage de la TSP-1 dans les coupes de patients arthrosiques (n=19), réparties en 3 groupes selon le stade d'arthrose : arthrose légère (SMm de 1 à 4), modérée (SMm de 4 à 8) et sévère (SMm supérieur à 8).

Malgré une diminution significative de la TSP-1 dans les matrices des cartilages articulaires à des stades tardifs d'arthrose, nous ne démontrons pas de corrélation directe entre l'augmentation de la vascularisation ostéocondrale et la diminution de la TSP-1 (Figure 96). De même, nous n'observons pas de corrélation significative entre l'accroissement du nombre

de chondrocytes hypertrophiques dans les cartilages arthrosiques et la diminution de la TSP-1 (Figure 97).

L'ensemble de ces résultats suggère donc un lien entre la disparition de la TSP-1 dans les matrices extracellulaires des cartilages arthrosiques et l'aggravation de l'arthrose chez les patients. Néanmoins, pas de corrélation directe n'est établie entre la disparition de la TSP-1, la progression de la différenciation hypertrophique des chondrocytes et l'accroissement de la vascularisation ostéochondrale chez ces patients.

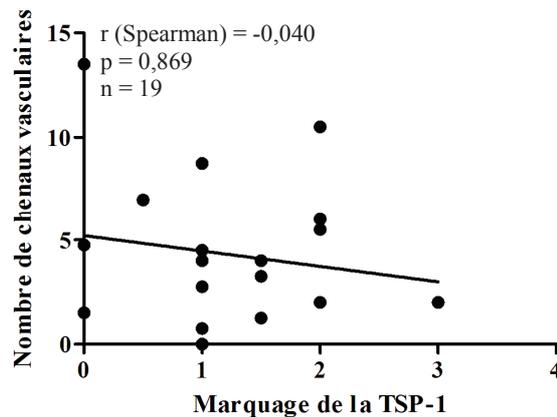


Figure 96: Corrélation entre le nombre de chenaux vasculaires à la jonction ostéochondrale et la présence de TSP-1 sur des coupes histologiques de cartilages OA.
La quantification a été réalisée sur un nombre total de 19 coupes de cartilages arthrosiques.

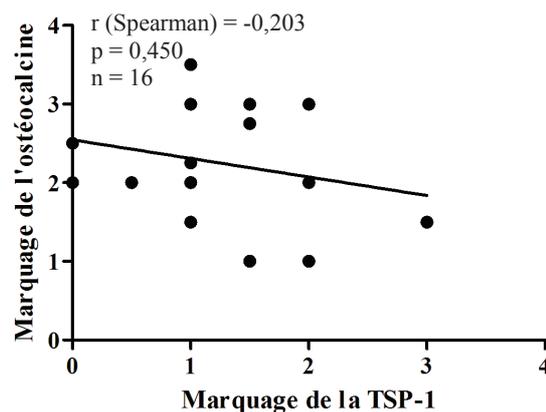


Figure 97: Corrélation entre la densité de chondrocytes hypertrophiques et la présence de TSP-1 sur des coupes histologiques de cartilages OA.
La densité de chondrocytes hypertrophiques a été évaluée par l'intensité de l'immunomarquage de l'OC. Des coupes histologiques issues des mêmes patients ($n=16$) ont été utilisées afin de déterminer l'intensité de l'immunomarquage de la TSP-1.

3.1.7 Discussion

3.1.7.1 Etudes ciblées de l'expression de molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques

Nos résultats *in vitro* ont montré que la différenciation hypertrophique des chondrocytes s'accompagnait d'une diminution de l'expression de facteurs angiostatiques et d'une augmentation de celle de facteurs angiogéniques. Cette modulation de l'expression et/ou de la synthèse de facteurs pro-angiogéniques pourrait promouvoir des mécanismes impliqués à la fois dans l'angiogenèse, mais aussi favoriser l'ostéoclastogenèse et la différenciation hypertrophique par rétrocontrôle positif. En effet, il a été décrit que le CXCL-12 pourrait stimuler l'angiogenèse ostéochondrale via le recrutement de précurseurs endothéliaux (Zheng, H. et al. 2007) et la production de VEGF (Sun, X. et al. 2013). Le CXCL-12 pourrait contribuer à la différenciation hypertrophique des chondrocytes à travers la stimulation de l'expression de Runx2 (Wei, L. et al. 2010). Enfin, il pourrait favoriser l'ostéoclastogenèse en activant l'expression de RANKL (Kim, H. R. et al. 2014). Les niveaux d'expression de la sphingosine kinase 1 et du TGF- β 1, deux facteurs angiogéniques qui participent surtout à la maturation des vaisseaux, augmentent avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes, notamment dès le stade pré-hypertrophique pour le TGF- β 1. Le TGF- β 1 joue un rôle dual dans le cartilage selon la voie de signalisation activée. D'une part, il maintient l'homéostasie du cartilage articulaire en stimulant la production de protéines matricielles et d'autre part il peut induire une différenciation hypertrophique des chondrocytes au cours de l'arthrose (Blaney Davidson, E. N. et al. 2009). La sphingosine kinase 1, à l'origine de la formation de sphingosine 1 phosphate, serait impliquée dans l'ostéoclastogenèse en favorisant le recrutement de progéniteurs d'ostéoclastes dans la circulation sanguine (Takahashi, N. et al. 2014).

La possibilité de pouvoir ralentir la différenciation hypertrophique des chondrocytes pourrait ainsi réduire les dommages du cartilage articulaire. Pour cette raison, le changement phénotypique des chondrocytes constitue une cible intéressante dans le traitement de l'arthrose. Il représente de ce fait un phénomène à étudier et à comprendre. Le modèle cellulaire développé dans cette étude est adapté pour un screening d'agents inhibiteurs de l'hypertrophie.

3.1.7.2 Rôle de la TSP-1 dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes

Au cours de la différenciation des chondrocytes du modèle murin, nous avons pu constater une nette diminution de la synthèse protéique de la TSP-1, qui ne coïncidait pas avec une diminution de l'expression génique de *Thbs1*. Afin d'écartier tous doutes de l'efficacité d'extraction de la TSP-1 des matrices minéralisées, nous avons testé différentes méthodes d'extraction des protéines : tampons NaCl (1M) / chlorure de guanidinium (4M) / Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ (0,5 mM) Triton-X-100 (0,1%) / Triton-X-100 (0,5%) NH₄OH (20 mM) / Triton-X-100 (0,5%) / SDS (1%) NH₄OH (20 mM) / SDS (1%) / SDS (0,1%). L'extraction de la TSP-1 a été observée par tous les traitements sauf par le tampon Triton-X-100 (0,5%) (non montré). La diminution de la synthèse de TSP-1 serait donc modulée préférentiellement par un mécanisme de régulation post-traductionnelle, notamment par une dégradation protéolytique (Pfander, D. et al. 2000) ou une régulation post-transcriptionnelle par l'intermédiaire de micro-ARN (Stenina-Adognravi, O. 2014). De manière intéressante, l'enzyme ADAMTS-7, dont l'expression est augmentée au cours de l'arthrose (Lai, Y. et al. 2014) et qui est décrite comme capable de cliver la TSP-1 (Kessler, T. et al. 2015), présente dans notre modèle une expression génique significativement augmentée dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux chondrocytes pré-hypertrophiques. De la même façon, une étude a montré que le miR-709 inhibait la TSP-1. Nous avons retrouvé une augmentation significative de l'expression de ce miR dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux chondrocytes pré-hypertrophiques (Surendran, S. et al. 2016). Ces molécules pourraient donc participer aux mécanismes impliqués dans la diminution de la TSP-1 dans les cultures de chondrocytes hypertrophiques.

Une diminution de la synthèse de TSP-1 a également été montrée en condition pro-inflammatoire, suggérant qu'en plus du mécanisme de différenciation hypertrophique, le contexte inflammatoire de l'articulation arthrosique pourrait participer à la diminution de la TSP-1. Une étude a d'ailleurs suggéré la possibilité que la forte concentration en IL-1 β dans les liquides synoviaux arthrosiques soit impliquée dans la diminution de l'expression de la TSP-1 dans le cartilage (Lyons-Giordano, B. et al. 1991).

Si nous considérons que ces chondrocytes pré-hypertrophiques constituent une barrière anti-angiogénique en profondeur du cartilage sain, la réduction de la TSP-1, parallèlement à celles de la TSP-2 et de la ChM-I, pourrait abolir la capacité du cartilage à résister à la vascularisation. Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences qu'engendrerait

l'absence de la TSP-1 dans des cultures de chondrocytes TSP-1^{-/-}, soumis à un protocole de différenciation hypertrophique et dans un modèle murin d'arthrose.

Les cultures de chondrocytes KO n'ont présenté aucune différence majeure par rapport aux chondrocytes WT au cours du processus de différenciation hypertrophique. La déficience en TSP-1 n'a pas perturbé le maintien du phénotype pré-hypertrophique et n'a pas non plus induit une différenciation hypertrophique précoce, ni une minéralisation accélérée des cultures. Nous nous sommes donc interrogés sur l'existence d'un potentiel mécanisme de compensation par la TSP-2, la plus proche de la TSP-1, dans les chondrocytes en culture et chez les souris déficientes pour la TSP-1. Nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de l'expression de la TSP-2 dans les chondrocytes déficients en TSP-1 par rapport aux WT. De même, nous avons comparé l'expression de la TSP-2 dans différents tissus de souris KO et WT, exprimant la TSP-1 (reins, poumons, cartilage). Nos résultats n'ont démontré aucune compensation de la déficience en TSP-1 par une expression exacerbée de TSP-2.

La seule différence observée entre les souris WT et TSP-1^{-/-}, mais actuellement non quantifiée, est la désorganisation tridimensionnelle de la matrice extracellulaire dans les puits des chondrocytes KO TSP-1. Des études ont démontré une désorganisation des fibres de collagènes chez les souris KO TSP-2 (Kyriakides, T. R. et al. 1998, Gruber, H. E. et al. 2008, Calabro, N. E. et al. 2014), à l'origine d'une hyperlaxité tendineuse et ligamentaire et une peau très fragile. Un phénomène similaire chez les souris KO TSP-1 reste à confirmer.

Le peptide mimétique de la TSP-1 (ABT-510) n'a démontré aucun effet en condition normale de culture sur les chondrocytes WT et KO, quel que soit leur phénotype. Seul un traitement en condition inflammatoire a provoqué une réponse cellulaire des chondrocytes pré-hypertrophiques. Un traitement aigu de 24h n'est probablement pas adapté pour induire une réponse cellulaire observable dans des chondrocytes engagés dans une voie de différenciation depuis plusieurs semaines. Il aurait été intéressant de réaliser un traitement chronique d'ABT-510 (demi-vie de 72h, donnée non montrée) sur toute la durée du protocole de différenciation hypertrophique des chondrocytes pour évaluer son action sur le processus de différenciation. Cependant, cela n'était pas réalisable en terme de coût et de quantité de peptides nécessaires pour la durée du protocole (11 semaines avec un changement des milieux tous les deux jours).

3.1.7.3 Rôle de la TSP-1 dans la progression de l'arthrose et la vascularisation ostéochondrale dans un modèle murin

Hsieh et al. ont démontré une amélioration de la sévérité de l'arthrose dans un modèle de rats en réponse à l'injection intra-articulaire d'adénovirus codant la TSP-1, en étudiant des mécanismes impliqués au niveau de la membrane synoviale (Hsieh, J. L. et al. 2010). En revanche, aucune étude ne s'est intéressée au rôle de la TSP-1 dans les processus qui ont lieu à la jonction ostéochondrale.

Dans notre modèle murin DMM, les souris KO pour la TSP-1 ne développent pas d'arthrose plus sévère que les souris WT. Ceci pourrait être expliqué par différentes raisons. Tout d'abord, que la TSP-1 ne jouerait pas de rôle essentiel dans le maintien des propriétés avasculaires du cartilage articulaire de ces souris. Ensuite, notons que l'ensemble de ces souris présente des signes précoces d'arthrose avec un score OARSI relativement faible à 8 semaines post-DMM. Nous pouvons nous questionner si des différences seraient observées entre les souris WT et TSP-1^{-/-} à des stades plus sévères d'arthrose. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'évolution de la vascularisation ostéochondrale plus précocement chez les WT et TSP-1^{-/-}, avant l'apparition des signes d'arthrose (cinétique à 4, 6 et 8 semaines post-DMM par exemple).

Les résultats concernant les paramètres vasculaires sont encore préliminaires. Les données de l'étude du réseau vasculaire en 3D chez les souris TSP-1^{-/-} restent actuellement non interprétables en raison des difficultés de perfusion au sulfate de baryum. En effet, ces souris présentent des fragilités cardiaques et vasculaires rendant difficiles et inefficaces les perfusions intracardiaques réalisées. Il a d'ailleurs été décrit récemment que ces souris TSP-1^{-/-} développent des anévrismes aortiques dus à des altérations du remodelage matriciel de la paroi des vaisseaux (Satoh, M. et al. 2017).

Botter et al. s'interrogeaient à savoir si les changements observés dans l'os sous-chondral étaient une conséquence ou une cause des atteintes du cartilage (Botter, S. M. et al. 2009). Dans notre modèle, les changements osseux ne sont pas directement responsables de la progression de l'OA puisque nous n'observons pas d'arthrose induite chez les souris KO SHAM qui présentent initialement une ostéoporose. La progression de l'arthrose est en revanche dépendante du développement de la vascularisation ostéochondrale chez les souris WT et KO TSP-1.

De manière intéressante, des résultats préliminaires d'immunohistochimie ont montré une hyper-vascularisation des ménisques chez les souris TSP-1^{-/-} DMM par rapport aux souris WT DMM. Ahraf et al. ont démontré un lien entre la vascularisation des ménisques et la douleur chez les patients arthrosiques (Ahraf, S. et al. 2011). De plus, il est connu que des atteintes méniscales augmentent le risque d'une gonarthrose chez les patients (Englund, M. et al. 2009). Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches sur le rôle de la TSP-1 dans les ménisques.

Jusqu'à récemment, aucun phénotype ostéo-articulaire n'a été décrit dans la littérature. Amend et al. ont montré une sclérose de l'os diaphysaire chez ces souris (Amend, S. R. et al. 2015). Dans notre étude, nous avons démontré une ostéoporose de l'os épiphysaire à proximité de la jonction ostéochondrale chez ces souris TSP-1^{-/-}. La TSP-1 semble donc jouer un rôle important dans l'architecture de la matrice osseuse. Une caractérisation des mécanismes du remodelage osseux en l'absence de TSP-1 semble nécessaire afin de comprendre son implication dans l'homéostasie des tissus articulaires. Linde et al. ont décrit un lien entre le développement d'une ostéoporose et d'une arthrose chez les patients (Linde, K. N. et al. 2017). Il serait intéressant d'étudier l'apparition de ces deux pathologies chez les souris WT et KO TSP-1 en cours de vieillissement. Nous déterminerons ainsi si la déficience en TSP-1 accélère ou aggrave le développement de l'arthrose liée au vieillissement.

3.1.7.4 Implication de la TSP-1 au cours de la pathologie humaine

Comme précédemment observé avec le marquage de l'ostéocalcine (OC) nous n'avons pas mis en évidence de corrélation directe entre la diminution du marquage de la TSP-1 et la progression de l'angiogenèse ostéochondrale, ni entre la diminution du marquage de la TSP-1 et l'augmentation du marquage de l'OC des chondrocytes hypertrophiques chez les patients arthrosiques. Il existerait probablement une fenêtre de temps différente entre ces différents mécanismes. Nous pouvons suggérer que la différenciation hypertrophique est le processus le plus précoce, initiant une vascularisation ostéochondrale et une diminution de la TSP-1 dans le cartilage. La disparition de la TSP-1 dans les tissus arthrosiques est principalement observée à des stades tardifs d'arthrose. Cela suggère que la réduction de la TSP-1 dans le cartilage arthrosique ne serait probablement pas responsable de l'initiation de la vascularisation ostéochondrale mais pourrait participer à l'amplification de l'invasion vasculaire du cartilage et par conséquent contribuer à l'aggravation de l'arthrose.

Ces résultats nous conduisent à rechercher d'autres cibles pouvant participer à des phénomènes plus précoces du remodelage de la jonction ostéochondrale.

3.2 Recherche de cibles par une approche sans a priori

3.2.1 Etude microarray du modèle de différenciation hypertrophique des chondrocytes murins

Dans cette dernière partie, nous recherchions à mettre en évidence des molécules impliquées dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes grâce à une approche sans a priori. Le but de cette étude était donc d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques jouant un rôle prépondérant dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes et dans le processus de remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale chez la souris par une étude microarray. Une analyse du transcriptome et du miRnome a ainsi été effectuée dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Recherches Servier, à Croissy-sur-Seine.

3.2.1.1 Préparation des cultures cellulaires

Afin de permettre cette étude transcriptomique à chaque stade de différenciation chondrocytaire, nous avons mis en place notre protocole de différenciation hypertrophique sur des chondrocytes articulaires issus de 12 portées distinctes de souriceaux (n=12). Par souci de faisabilité, les 12 dissections ont été réalisées la même semaine, avec 4 portées concomitantes sur 3 jours.

Ces mises en culture rapprochées, partageant ainsi un milieu de culture commun et des conditions expérimentales similaires, nous ont permis d'instaurer des conditions optimales pour réduire la variabilité entre les différents échantillons de chondrocytes.

A chaque étape de différenciation, nous avons extrait les ARN totaux et les micro-ARN pour l'ensemble des mises en culture, soit 36 échantillons de chondrocytes à la fin du protocole de différenciation hypertrophique : 12 échantillons au stade articulaire, 12 au stade pré-hypertrophique et enfin 12 au stade hypertrophique. Nous avons également récupéré les milieux conditionnés et les lysats cellulaires pour les analyses biochimiques. Le dosage des calcifications par une coloration au rouge alizarine a été réalisé afin de vérifier l'état de différenciation des chondrocytes. L'évaluation de la viabilité cellulaire par un test MTT (3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium bromide) a également été effectuée.

Le dosage de la coloration au rouge alizarine démontre bien la présence de calcifications dans les 12 mises en culture de chondrocytes hypertrophiques, avec une moyenne de densité

optique de 0,42 contre 0,05 pour les chondrocytes articulaires et 0,06 pour les chondrocytes pré-hypertrophiques, traduisant le bruit de fond de la coloration de la MEC (Figure 98A).

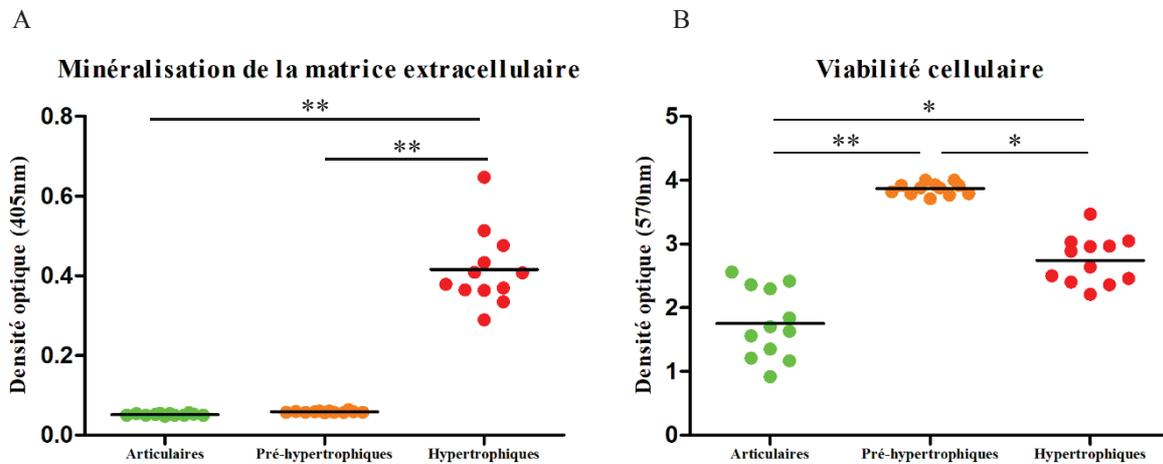


Figure 98: Evaluation de la minéralisation matricielle et de la viabilité des chondrocytes au cours de la différenciation hypertrophique.

(A) Mesure du degré de calcification des chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques après coloration au rouge alizarine (densité optique à 405 nm). (B) Evaluation de la viabilité des chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques par un test MTT (densité optique à 570 nm). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=12 pour chaque groupe). * p<0,05, ** p<0,001.

Avant de démarrer l'étude microarray, il nous a semblé nécessaire d'évaluer la viabilité des chondrocytes à chaque stade de différenciation par un test MTT, reflétant l'activité mitochondriale des chondrocytes (Figure 98B). Nous observons une augmentation de l'activité mitochondriale entre le stade articulaire et pré-hypertrophique, probablement expliquée par une densité cellulaire plus importante chez les chondrocytes pré-hypertrophiques et/ou par un métabolisme mitochondrial accru. A l'inverse, cette activité est diminuée entre le stade pré-hypertrophique et hypertrophique, qui pourrait être due à un processus de mortalité au cours de la différenciation hypertrophique et/ou à une quiescence cellulaire, ralentissant alors le métabolisme de ces chondrocytes hypertrophiques. Des analyses réalisées sur des cultures précédentes (Figure 64) ont montré, par un dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase, la mise en place d'un bref phénomène d'apoptose, parallèlement à l'apparition des calcifications. Cette mortalité pourrait ainsi expliquer la diminution de l'activité mitochondriale observée entre le stade pré-hypertrophique et hypertrophique dans notre modèle.

3.2.1.2 Contrôle qualité des ARN totaux

La quantité, l'intégrité et la qualité des ARN extraits sont des éléments indispensables à la réussite technique du microarray ainsi qu'à l'exploitation de ses résultats. Pour répondre à ces exigences, ces paramètres ont été évalués grâce à la technologie LabChip™ sur l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Cette méthode est basée sur la séparation électrophorétique des ARN totaux sur des puces et leurs détections par fluorescence. La mesure de cette fluorescence est représentée par un électrophérogramme (Figure 99A), à partir duquel un algorithme calcule la concentration en ARN de l'échantillon, un ratio des ARN ribosomiaux (ratio 28S/18S) et génère un score d'intégrité, le RNA Integrity Number (RIN) (Schroeder, A. et al. 2006). Le RIN prend en compte l'ensemble du profil électrophorétique de l'échantillon, ce qui permet la détection de potentiels produits de dégradation.

Un ratio des ARN ribosomiaux 28S/18S supérieur à 1,5 (1,7 dans l'échantillon Sa160 DMEM (Figure 99B)) est considéré comme bon, reflétant une bonne qualité des ARN. Néanmoins, ce ratio ne représente qu'arbitrairement l'intégrité globale des ARN totaux de l'échantillon, c'est ainsi que le RIN permet de remédier à cette incertitude. Les valeurs de RIN varient entre 10, ce qui correspond à des ARN absolument intacts, et 1, pour des ARN totalement dégradés. Un RIN supérieur à 7 (RIN de 10 dans l'échantillon Sa160 DMEM (Figure 99B)) est considéré comme bon, permettant une utilisation de ces échantillons pour des analyses d'expressions géniques

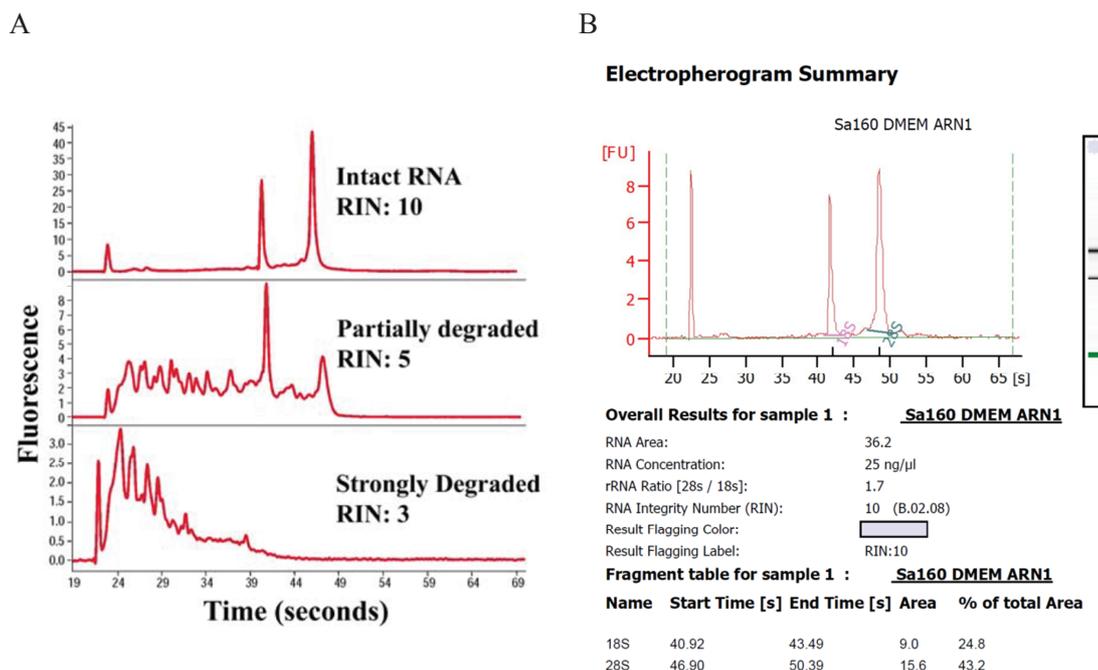


Figure 99: Critères du contrôle qualité des ARN totaux extraits.

(A) Représentations d'électrophérogrammes obtenus d'après les profils électrophorétiques d'échantillons d'ARN intacts (RIN : 10), d'ARN partiellement dégradés (RIN : 5) et d'ARN fortement dégradés (RIN : 3). (B) Exemple de données obtenues pour notre modèle, avec un échantillon d'ARN de chondrocytes articulaires (Sa160 DMEM), par LabChip™ sur l'Agilent 2100 Bioanalyzer.

Pour l'ensemble de cette étude, une nomenclature est utilisée pour désigner les échantillons de chondrocytes **articulaires : DMEM**, les chondrocytes **pré-hypertrophiques : HYP** et les chondrocytes **hypertrophiques : VITA**. Ils sont identifiés comme Sa160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170 et 171, ce qui représente les numéros des 12 cultures de chondrocytes aux 3 stades de différenciation étudiés. L'ensemble de ces échantillons (n=36) présentent des RIN compris entre 8,3 et 10 (Tableau 21), ce qui démontre la bonne qualité des ARN extraits, rendant ainsi possible leur utilisation pour une étude transcriptomique.

ARTICULAIRES	RIN	PRE-HYPERTROPHIQUES	RIN	HYPERTROPHIQUES	RIN
Sa160 DMEM	9,6	Sa160 HYP	8,5	Sa160 VITA	9,4
Sa161 DMEM	8,9	Sa161 HYP	8,6	Sa161 VITA	10,0
Sa162 DMEM	9,9	Sa162 HYP	8,6	Sa162 VITA	10,0
Sa163 DMEM	10,0	Sa163 HYP	8,4	Sa163 VITA	10,0
Sa164 DMEM	9,4	Sa164 HYP	8,5	Sa164 VITA	10,0
Sa165 DMEM	9,4	Sa165 HYP	8,5	Sa165 VITA	9,9
Sa166 DMEM	9,6	Sa166 HYP	8,6	Sa166 VITA	9,9
Sa167 DMEM	9,5	Sa167 HYP	8,4	Sa167 VITA	10,0
Sa168 DMEM	9,4	Sa168 HYP	8,4	Sa168 VITA	8,8
Sa169 DMEM	9,5	Sa169 HYP	8,4	Sa169 VITA	8,9
Sa170 DMEM	9,4	Sa170 HYP	8,3	Sa170 VITA	8,9
Sa171 DMEM	9,4	Sa171 HYP	8,4	Sa171 VITA	8,8

Tableau 21: Valeurs des RIN des chondrocytes articulaires DMEM, des chondrocytes pré-hypertrophiques HYP et des chondrocytes hypertrophiques VITA, calculées par le bioanalyser Agilent 2100.

(n=12 pour chaque groupe, soit n=36). Les valeurs théoriques de RIN varient entre 10, ce qui correspond à des ARN absolument intacts, et 1, pour des ARN totalement dégradés. Un RIN supérieur à 7 est considéré comme bon.

3.2.1.3 Profils transcriptionnels des chondrocytes du modèle

La technique de microarray nécessite une homogénéité transcriptionnelle pour chaque condition étudiée afin de rendre possibles une interprétation et une comparaison entre les conditions. Cette limitation introduit ainsi une contrainte expérimentale non négligeable que nous devons contrôler dans notre modèle afin de bénéficier de conditions optimales pour réaliser cette étude. Pour ce faire, nous avons examiné le phénotype des chondrocytes de notre modèle sur la base du niveau d'expression de gènes reconnus comme étant des marqueurs chondrocytaires ou des marqueurs de l'hypertrophie grâce à la technologie Fluidigm, une PCR en temps réel à haut débit. Notre but était donc de sélectionner, d'une part les échantillons présentant une faible variabilité au sein d'un même phénotype, et d'autre part une forte variabilité entre les différents phénotypes de chondrocytes du modèle.

3.2.1.3.1 Sélection des gènes de référence

Nous avons tout d'abord recherché à déterminer le nombre idéal et le type de gènes de référence à utiliser pour une normalisation optimale de nos données. Nous avons ainsi étudié par PCR quantitative les variations des Cycle Threshold (Ct) de 8 gènes de référence murins dans les 36 échantillons de l'étude : ribosomal protein L30 (Rpl30), TATA box binding protein (Tbp), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), hydroxymethylbilane

synthase (Hmbs), glucuronidase, beta (Gusb), peptidylprolyl isomerase A (Ppia), actin, beta (Actb), 18S ribosomal RNA (18S).

Il est étonnant de constater que la valeur des Ct dans l'ensemble des échantillons de notre modèle ne montre pas de variation, quel que soit le phénotype des chondrocytes (Figure 100). Quatre échantillons d'ostéoblastes, dont les ARN étaient en partie dégradés, sont ici des contrôles intéressants qui nous montrent une variation importante de l'expression des gènes de référence testés. Ce résultat nous confirme donc la stabilité de l'expression des gènes de référence dans l'ensemble de nos échantillons de chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Toutefois, cette observation ne nous permet pas de déterminer les gènes de référence à sélectionner. Pour cela, nous avons fait appel au logiciel qBase+ (Vandesompele, J. et al. 2002, Hellemans, J. et al. 2007), qui utilise un algorithme pour calculer le nombre de gènes de référence nécessaires et sélectionner les plus adaptés d'après le jeu de données implémentées.

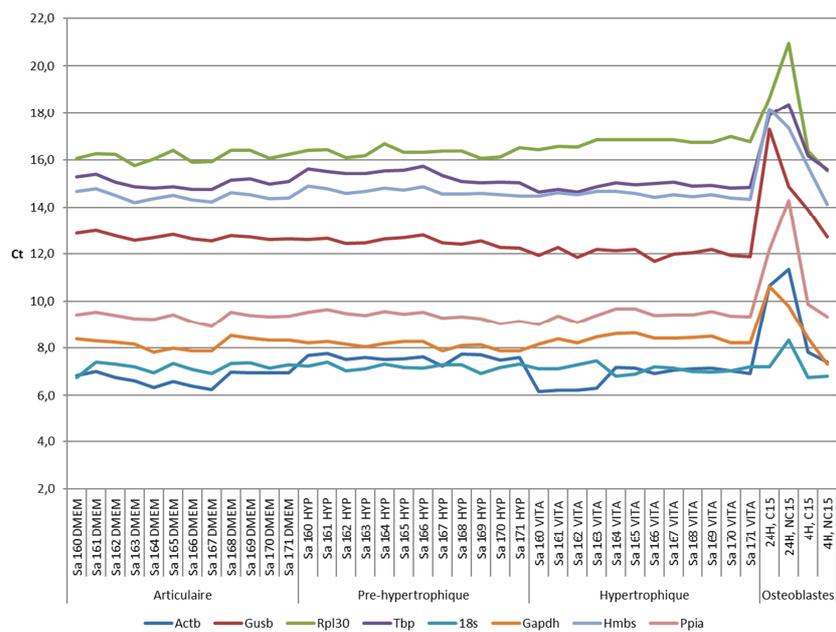


Figure 100: Sélection des gènes de référence dans notre modèle.

Ces courbes représentent les valeurs des Ct des gènes de référence Rpl30, Tbp, Gapdh, Hmbs, Gusb, Ppia, actin, beta Actb et 18S dans les chondrocytes articulaires DMEM, pré-hypertrophiques HYP, hypertrophiques VITA (n=36) et dans des ostéoblastes contrôles (n=4). La linéarité des courbes traduit la stabilité de l'expression de ces gènes de référence dans l'ensemble des échantillons de chondrocytes.

Nous avons pu conclure que seulement 2 gènes sur les 8 étaient suffisants pour la normalisation des données, grâce au paramètre geNorm V de 0,06 (Figure 101A), bien

inférieur au seuil de 0,15 calculé par le logiciel qBase+. Les gènes Hmbs et Ppia présentait dans ces conditions expérimentales une expression particulièrement stable, traduite par le paramètre geNorm M, inférieur à 0,2 (Figure 101B). Ces deux gènes de référence ont ainsi été choisis pour une normalisation de l'expression des gènes cibles étudiés par la suite.

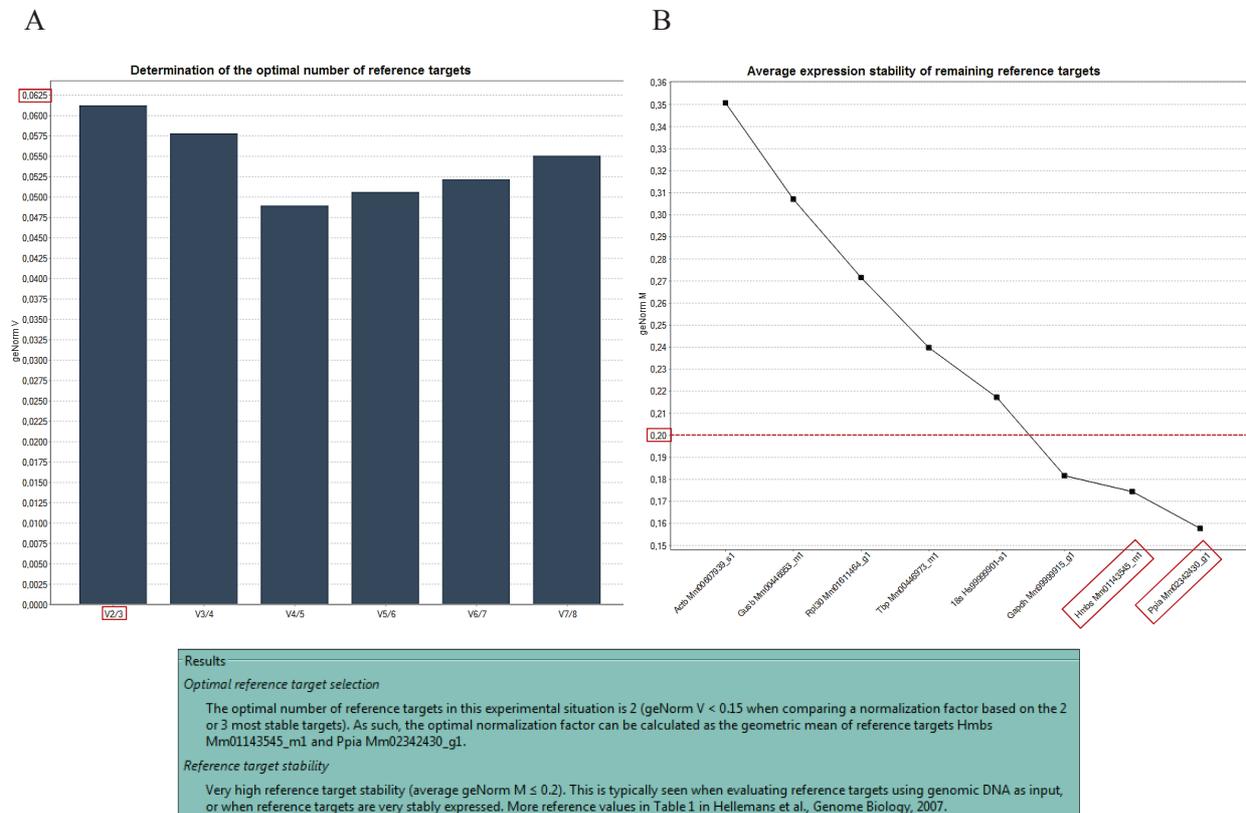


Figure 101: Analyse statistique sur le logiciel qBase+ du nombre de gènes de référence nécessaires à la normalisation des données.

(A) Détermination du nombre optimal de gènes de référence parmi 8 (geNorm V). Un geNorm V inférieur à 0,15 représente un nombre de gènes statistiquement suffisant pour une normalisation rigoureuse des données (B) Etude de la stabilité de l'expression de ces gènes dans les échantillons du modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes (geNorm M). Un geNorm M inférieur à 0,2 traduit une expression génique stable dans des conditions expérimentales données.

3.2.1.3.2 Expression des gènes d'intérêt

Les niveaux d'expression des transcrits des gènes d'intérêt sont présentés ici en Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) par rapport aux chondrocytes articulaires (Figure 102). Les données sont ensuite normalisées par rapport aux gènes de référence Hmbs et Ppia.

Comme attendu, nous constatons que nos gènes d'intérêt caractéristiques des chondrocytes articulaires, tels que le collagène de type II (Col2a1), le facteur de transcription Sox9, l'aggrécane (Acan) et la chondromoduline I (ChM-I) voient leur expression s'effondrer de manière homogène au cours de la différenciation hypertrophique.

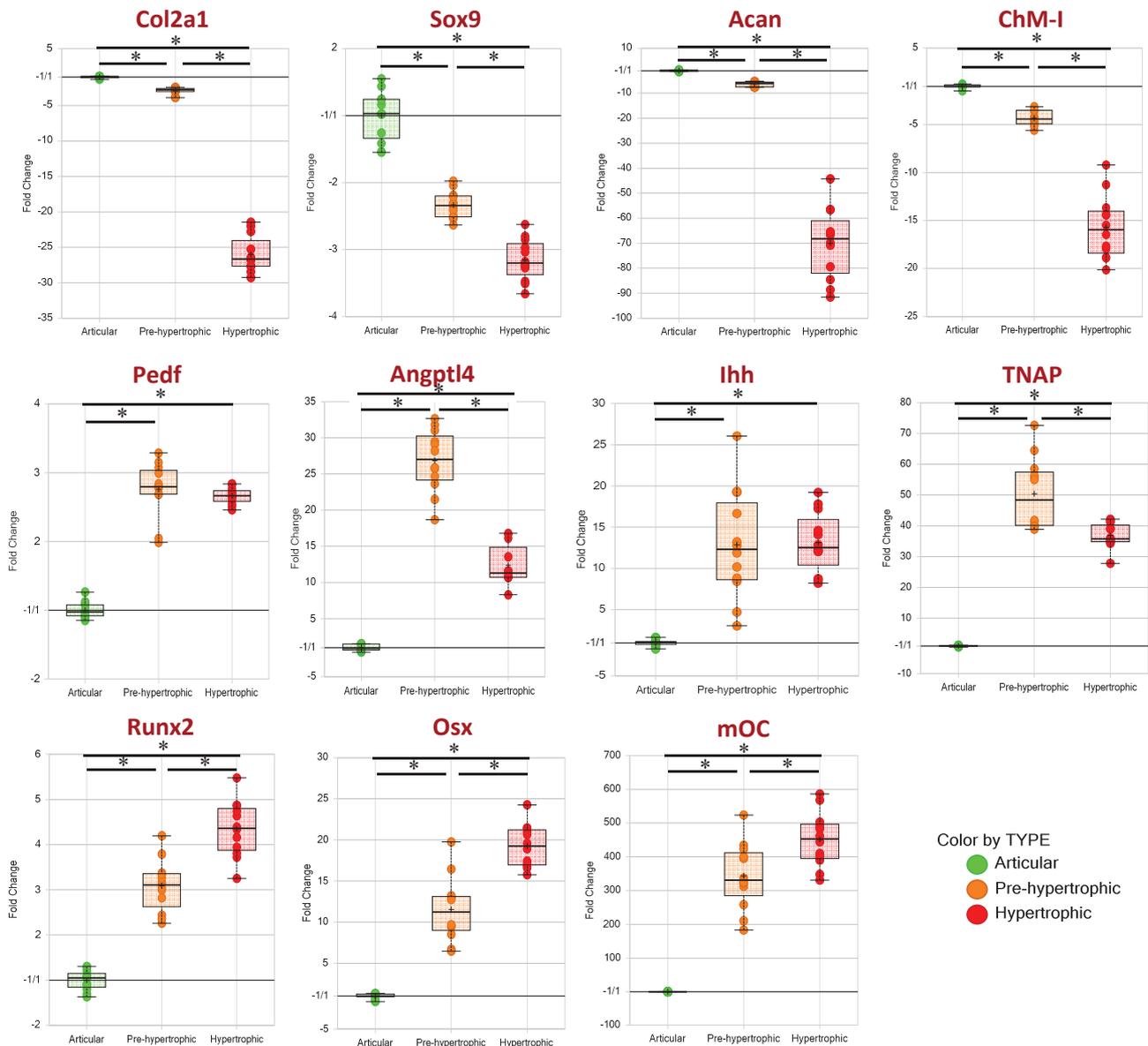


Figure 102: Expression des marqueurs chondrocytaires (Col2a1, Sox9, Acan, ChM-I) et des marqueurs de la différenciation pré-hypertrophique (Pedf, Angptl4, Ihh, TNAP) et hypertrophique (Runx2, Osx, mOC) par les chondrocytes du modèle.

Analyse par PCR quantitative de l'expression des gènes d'intérêt, normalisée par rapport aux gènes de référence Hmbs et Ppia. Les résultats sont représentés en Box plot suivant les Fold Change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) par rapport aux chondrocytes articulaires (n=12 par groupe). * p<0,05.

A l'inverse, les gènes caractéristiques des chondrocytes hypertrophiques, tels que le facteur de transcription Runx2, l'ostéocalcine (mOC) et ostérix (Osx) ont une expression augmentée au cours de la différenciation hypertrophique. Certains transcrits comme le pigment epithelium-derived factor (Pedf), l'angiopoïétine like 4 (Angptl4) et la tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) présentent un profil d'expression biphasique avec une expression augmentée dans les chondrocytes pré-hypertrophiques par rapport aux chondrocytes articulaires, puis une diminution dans les chondrocytes hypertrophiques. Le gène indian hedgehog (Ihh) voit son expression augmenter au cours de la différenciation hypertrophique mais ne présente pas de différence significative entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Nous avons constaté que ces expressions géniques étaient particulièrement homogènes et reproductibles au sein d'un même phénotype de chondrocytes. A contrario, entre les différents phénotypes de chondrocytes, les niveaux d'expression montraient une forte variabilité. Il était attendu que les phénotypes extrêmes représentés par les chondrocytes articulaires (1 semaine de culture sans synthèse de matrice) et hypertrophiques (11 semaines de culture avec synthèse d'une matrice minéralisée) pourraient être caractérisés par une signature moléculaire spécifique. En revanche, une incertitude persistait sur la caractérisation d'un phénotype intermédiaire pré-hypertrophique. En effet, nous ignorions si ces chondrocytes présentaient un phénotype propre ou plutôt un phénotype hybride à celui des articulaires et/ou hypertrophiques, comme pouvait le laisser penser l'expression simultanée de Col2a1, Sox9, Acan, ChM-I, Runx2, Osx ou encore mOC. Toutefois, le profil d'expression biphasique des gènes codant Angptl4 et TNAP suggérait bien l'existence d'un phénotype spécifique des chondrocytes pré-hypertrophiques.

Grâce à cette reproductibilité, notre modèle nous apportait la possibilité de comparer la signature moléculaire de chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques par la technique de microarray.

3.2.1.4 Sélection des échantillons pour le microarray

Après concertation entre notre laboratoire et nos collaborateurs de l'Institut de Recherches Servier, il a été jugé nécessaire de sélectionner un nombre limité d'échantillons utilisés pour le microarray, respectant à la fois les contraintes de coût, de design expérimental et de puissance statistique. Parmi les 12 cultures, il a été convenu d'en choisir 8, qui représenteraient les plus homogènes au sein d'un même phénotype et les plus hétérogènes

entre les différents phénotypes. Ce choix avait pour objectif d'optimiser l'analyse transcriptomique sous-jacente.

La sélection des échantillons a été réalisée grâce à une analyse statistique complexe sur les niveaux d'expression des 11 gènes d'intérêt (Figure 102) normalisés par rapport aux 2 gènes de référence (-dCt). La méthode statistique mise en place par les biostatisticiens de Servier a combiné des analyses en composantes principales (ACP) et des calculs de scores. Une synthèse simplifiée de ces analyses est décrite dans cette partie pour apporter une vision globale de la démarche qui a été adoptée.

L'ACP est une méthode d'analyse de données multivariées où leur visualisation dans un espace à 2 ou 3 dimensions permet d'identifier des groupes homogènes d'observations ou à l'inverse des observations hétérogènes.

Dans l'ACP présentée ici, les valeurs des niveaux d'expression des gènes (-dCt) ont été représentées en 2 dimensions. L'histogramme d'eigenvalues montre que la 1^{ère} dimension (PC1) explique 85,1% de la variance de l'expression génique entre les échantillons et la 2^{ème} dimension (PC2) l'explique à 11,2% (Figure 103A). Grâce à l'observation des données dans un espace défini par ces 2 dimensions, nous constatons que les 3 groupes d'échantillons sont très largement différenciés (Figure 103B). Notons que la variabilité inter-groupe est bien plus élevée que la variabilité intra-groupe, ce qui relativise finalement l'influence du choix des échantillons sur le résultat final de l'étude.

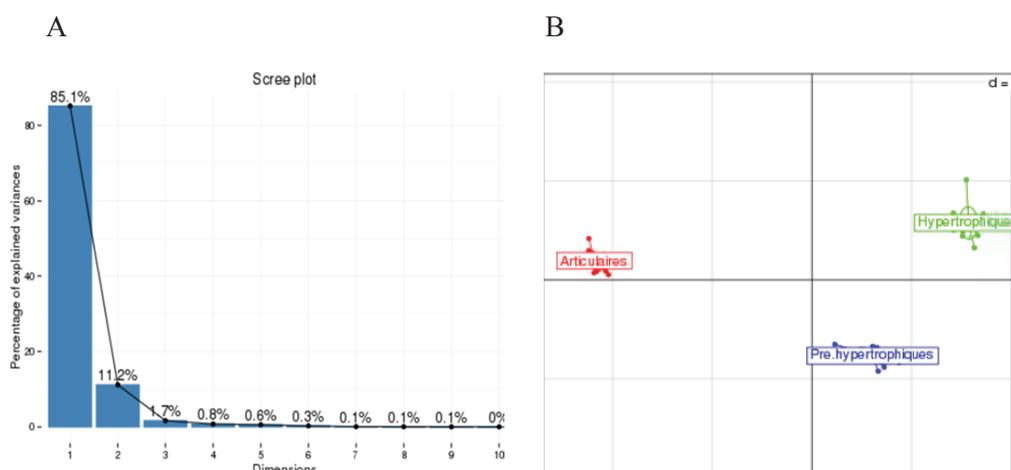


Figure 103: Analyse en composantes principales (ACP) sur les valeurs -dCt calculées pour les 11 gènes d'intérêt.

(A) Histogramme d'eigenvalues. (B) Représentation des données dans un espace à 2 dimensions, défini par PC1 et PC2.

Il est possible de représenter par des histogrammes le taux de contribution individuelle des échantillons à chaque dimension de l'ACP (Figure 104). Les chondrocytes articulaires DMEM et hypertrophiques VITA semblent contribuer davantage à la variance de la 1^{ère} dimension de l'ACP (Figure 104A) alors que les chondrocytes pré-hypertrophiques HYP contribueraient davantage à la variance de la 2^{nde} (Figure 104B). Par cette première méthode, le choix des échantillons s'est finalement reposé sur les différences maximales entre les phénotypes extrêmes VITA et DMEM. En effet, les échantillons du groupe hypertrophique VITA qui dévoilaient le plus de différences avec ceux du groupe articulaire DMEM (Figure 104A) ont été sélectionnés, soit les Sa 160, 166, 163, 169, 165, 168, 171 et 162.

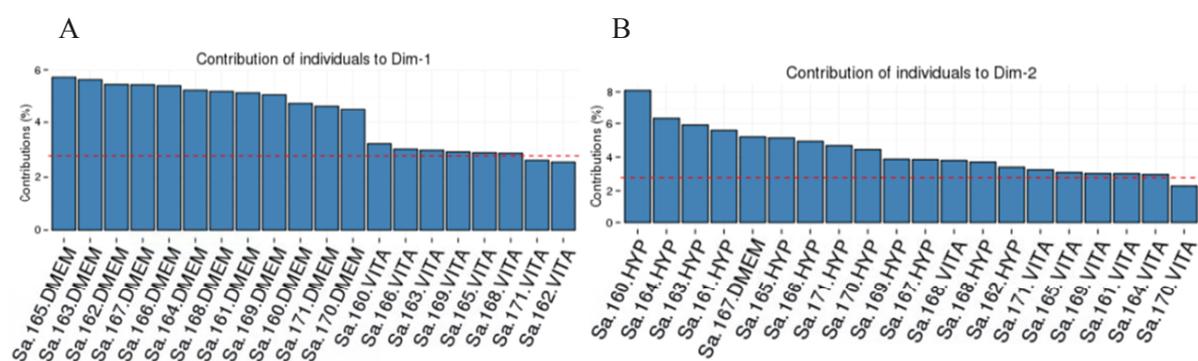


Figure 104: Contributions des échantillons à la variabilité des données.

(A) Histogrammes du top 20 des contributions des échantillons à la 1^{ère} dimension de l'ACP.
 (B) Histogrammes du top 20 des contributions des échantillons à la 2^{nde} dimension de l'ACP.

Une seconde méthode a permis le calcul d'un score, représentant la variabilité totale de l'expression des 11 gènes d'intérêt et du degré de calcification entre les échantillons hypertrophiques et articulaires (VITA vs DMEM) (Figure 105). Sur la base de ce Score, 7 échantillons sont ressortis plus divergents que la moyenne, représentée par la ligne discontinue, soit les Sa 165, 163, 166, 162, 168, 169 et 160.

Finalement, 7 échantillons sur 8 sont ressortis de manière commune des deux types de procédure de sélection (ACP et score) : les Sa 165, 163, 166, 162, 168, 169 et 160. Le choix du dernier échantillon à inclure s'est porté sur le Sa 171, qui avait été sélectionné par l'ACP en apparaissant dans les contributions maximales entre les hypertrophiques et les articulaires (Figure 104A) et dont le score est proche de celui des échantillons sélectionnés (Figure 105). La liste finale d'échantillons retenue est donc la suivante : **Sa 165, 163, 166, 162, 168, 169, 160 et 171** (n=8).

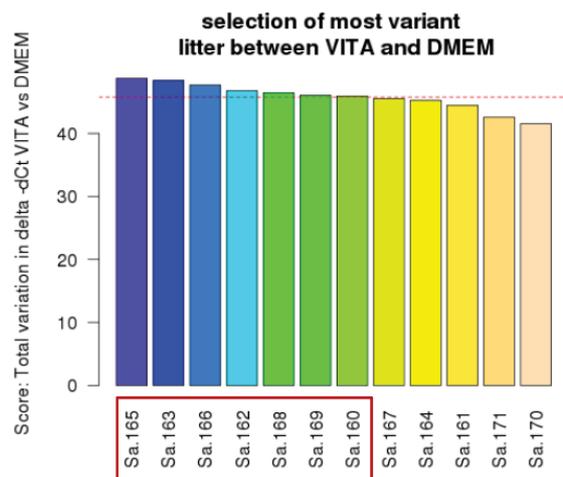


Figure 105: Calculs d'un score de variabilité sur les groupes de phénotypes extrêmes : chondrocytes articulaires vs hypertrophiques.

Ainsi, la démarche de sélection des échantillons s'est basée sur une analyse des données de PCR quantitative pour les 11 gènes d'intérêt (Figure 102) dans les deux phénotypes extrêmes du modèle, les chondrocytes articulaires et hypertrophiques, susceptibles d'assurer l'observation d'un maximum de divergences. Notre objectif était alors de parvenir à distinguer une signature pour chaque stade de différenciation des chondrocytes, grâce à une analyse transcriptomique du génome entier.

3.2.1.5 Microarray

3.2.1.5.1 Principe

L'utilisation des puces à ADN permet d'obtenir une mesure relative du niveau d'expression des gènes dans un échantillon donné par rapport à un échantillon de référence. Dans notre étude, il s'agit de comparer le transcriptome caractéristique d'un stade de différenciation cellulaire (chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques) par rapport à un phénotype cellulaire initial (chondrocytes articulaires).

3.2.1.5.2 Validation de la robustesse du modèle

Afin de visualiser des corrélations parmi les données globales du microarray, des analyses en composantes principales ont été réalisées. Une ACP en 3 dimensions nous a permis de visualiser 3 groupes distincts de chondrocytes, correspondant très clairement aux 3 phénotypes représentés dans le microarray ; les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques (Figure 106A). Dans cette analyse, 45,87% de la variabilité des données est portée par les 3 axes. Le premier axe, expliquant 21,45% de la variabilité, permet une

séparation nette du groupe de chondrocytes articulaires par rapport aux deux autres groupes et une séparation partielle des groupes de chondrocytes hypertrophiques et pré-hypertrophiques. Le second axe, expliquant 14,23% de la variabilité, permet une séparation franche entre le groupe des chondrocytes hypertrophiques et pré-hypertrophiques. Une ACP a également été réalisée d'après les données de calcification des échantillons (Figure 106B). Ce degré de calcification étant groupe dépendant, nous retrouvons visuellement cet effet sur l'ACP.

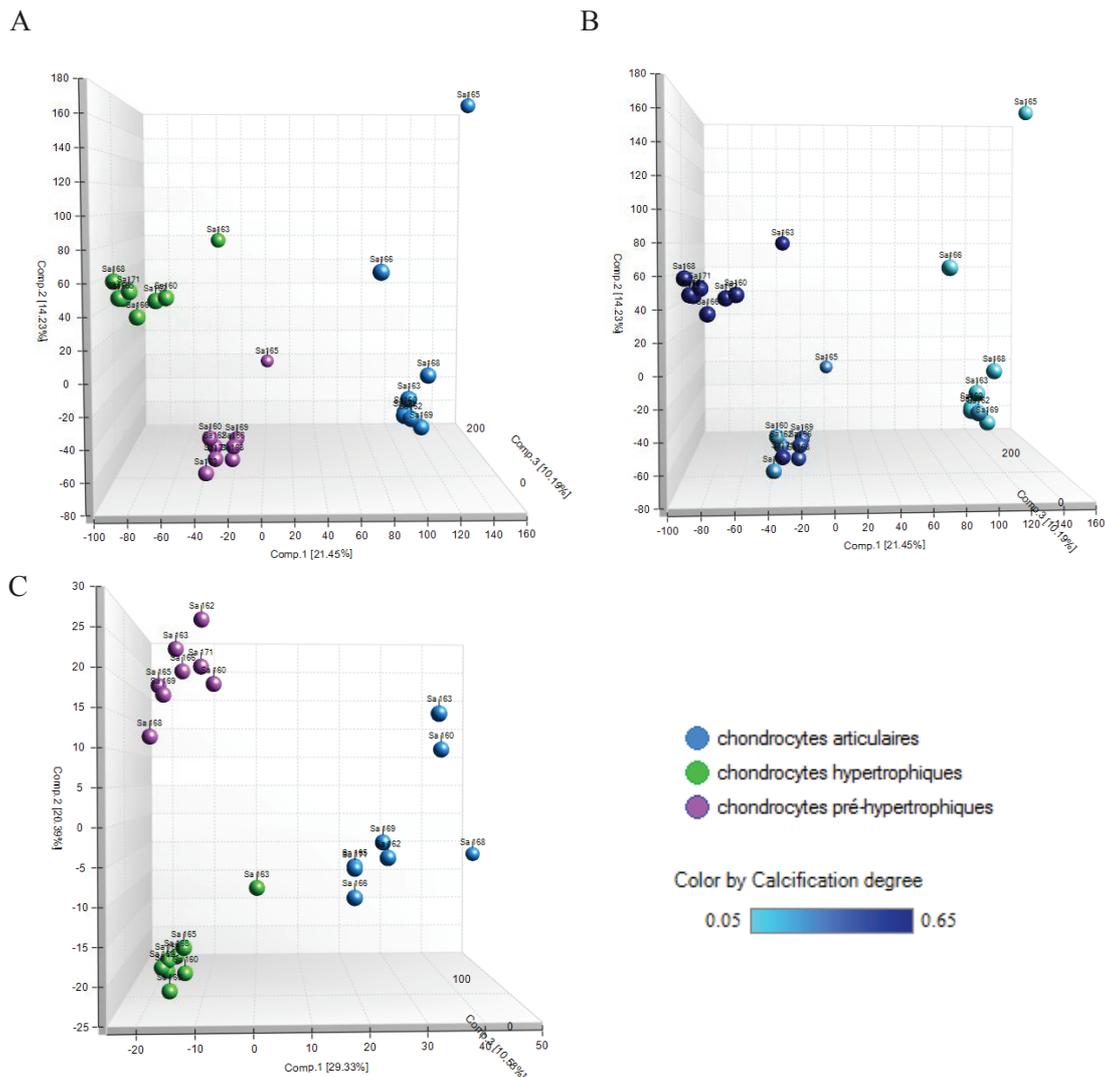


Figure 106: Analyses en Composantes Principales des données du microarray.

(A) Représentation des ACP normalisées et filtrées des données transcriptomiques du microarray (n=8 dans chaque groupe), (B) des données de calcification des échantillons et (C) des données des micro-ARN. Les chondrocytes articulaires sont figurés en bleu, les pré-hypertrophiques en violet et les hypertrophiques en vert.

Parallèlement, une étude similaire est réalisée sur les micro-ARN (miRNA) du modèle. Comme précédemment, une ACP permet de visualiser 3 groupes distincts de chondrocytes,

correspondant aux 3 phénotypes (Figure 106C). Dans cette analyse, 60,3% de la variabilité des données est portée par les 3 axes. Le premier axe, expliquant 29,33% de la variabilité, permet une séparation du groupe de chondrocytes articulaires par rapport aux deux autres groupes. Le second axe, expliquant 20,39% de la variabilité, permet une distinction entre le groupe des chondrocytes hypertrophiques et pré-hypertrophiques.

Comme pour l'analyse réalisée sur les 11 gènes d'intérêt (Figure 103B), nous retrouvons ici une distinction nette des 3 phénotypes de chondrocytes mais cette fois-ci à l'échelle des données de l'ensemble du génome et du miRnome, démontrant ainsi la robustesse et la reproductibilité du modèle.

3.2.1.5.3 Signature moléculaire des phénotypes chondrocytaires

Grâce à une représentation des données en *Vulcano Plot*, nous observons la répartition des gènes différentiellement exprimés entre deux conditions données ; chondrocytes hypertrophiques vs articulaires, pré-hypertrophiques vs articulaires et enfin pré-hypertrophiques vs hypertrophiques (Figure 107). A la base du graphique, sous le seuil de significativité ($p\text{-value} > 0,05$), le niveau d'expression des gènes ne présente pas de différence significative entre les deux conditions étudiées. A l'inverse, plus le point est éloigné de la base du *Vulcano Plot*, au-delà du seuil ($p\text{-value} < 0,05$), plus le gène est significativement surexprimé dans l'une des conditions. Ces graphiques nous montrent donc l'existence de nombreux gènes présentant une expression significativement différente selon le phénotype des chondrocytes.

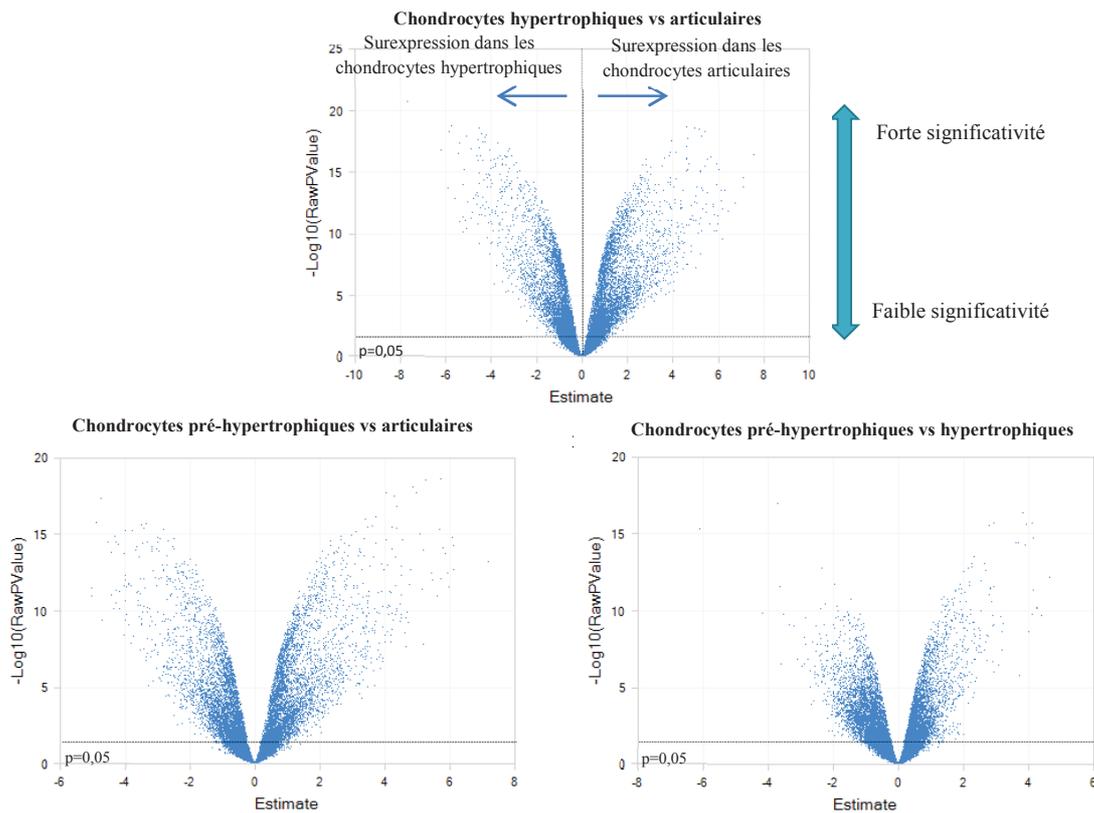


Figure 107: Vulcano Plot des données globales du microarray, comparant deux à deux les conditions du modèle.

Chaque point représente un gène donné suivant sa p-value (échelle en $-\log_{10}$) et son Fold Change (Estimate, échelle en \log_2) dans les conditions étudiées: chondrocytes hypertrophiques vs articulaires en haut, chondrocytes pré-hypertrophiques vs articulaires en bas à gauche et chondrocytes pré-hypertrophiques vs hypertrophiques en bas à droite. Sous le seuil de significativité ($p\text{-value} > 0,05$), le niveau d'expression des gènes ne présentent pas de différence significative entre les deux conditions étudiées. A l'inverse, au-delà du seuil ($p\text{-value} < 0,05$), les gènes sont significativement surexprimés dans l'une des conditions.

La signature moléculaire de chaque échantillon a ensuite été synthétisée par une cartographie des clusters de gènes exprimés (Figure 108A). Les gènes sous-exprimés sont représentés en vert et ceux surexprimés en rouge. Une nouvelle fois, 3 signatures distinctes apparaissent précisément parmi les données, reflétant une séparation nette à l'échelle moléculaire entre les phénotypes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

En prenant en compte un Fold Change supérieur à 1,3 et une p-value inférieure à 0,05, nous ressortons de l'analyse 1768 gènes spécifiquement exprimés par les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux articulaires, 1023 gènes spécifiquement exprimés par les chondrocytes pré-hypertrophiques par rapport aux articulaires et 1002 gènes spécifiquement exprimés par les chondrocytes pré-hypertrophiques par rapport aux hypertrophiques (Figure 108B).

Ces chondrocytes sont également définis par une signature de micro-ARN spécifique (Figure 109A), avec 47 miRNA spécifiquement exprimés par les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux articulaires, 134 miRNA spécifiquement exprimés par les chondrocytes pré-hypertrophiques par rapport aux articulaires et 59 miRNA spécifiquement exprimés par les chondrocytes pré-hypertrophiques par rapport aux hypertrophiques (Figure 109B).

Il est finalement possible de distinguer une signature à chaque stade de différenciation des chondrocytes de notre modèle, que ce soit à l'échelle du génome ou du miRnome.

Notre second objectif était donc d'identifier par cette approche sans a priori de nouvelles cibles impliquées à la fois dans :

- La différenciation hypertrophique des chondrocytes
- Et le remodelage pathologique de la jonction ostéocondrale

Afin de mettre en évidence de telles cibles, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle du microarray grâce au logiciel Ingenuity® Pathway Analysis (IPA), accessible à l'Institut de Recherches Servier.

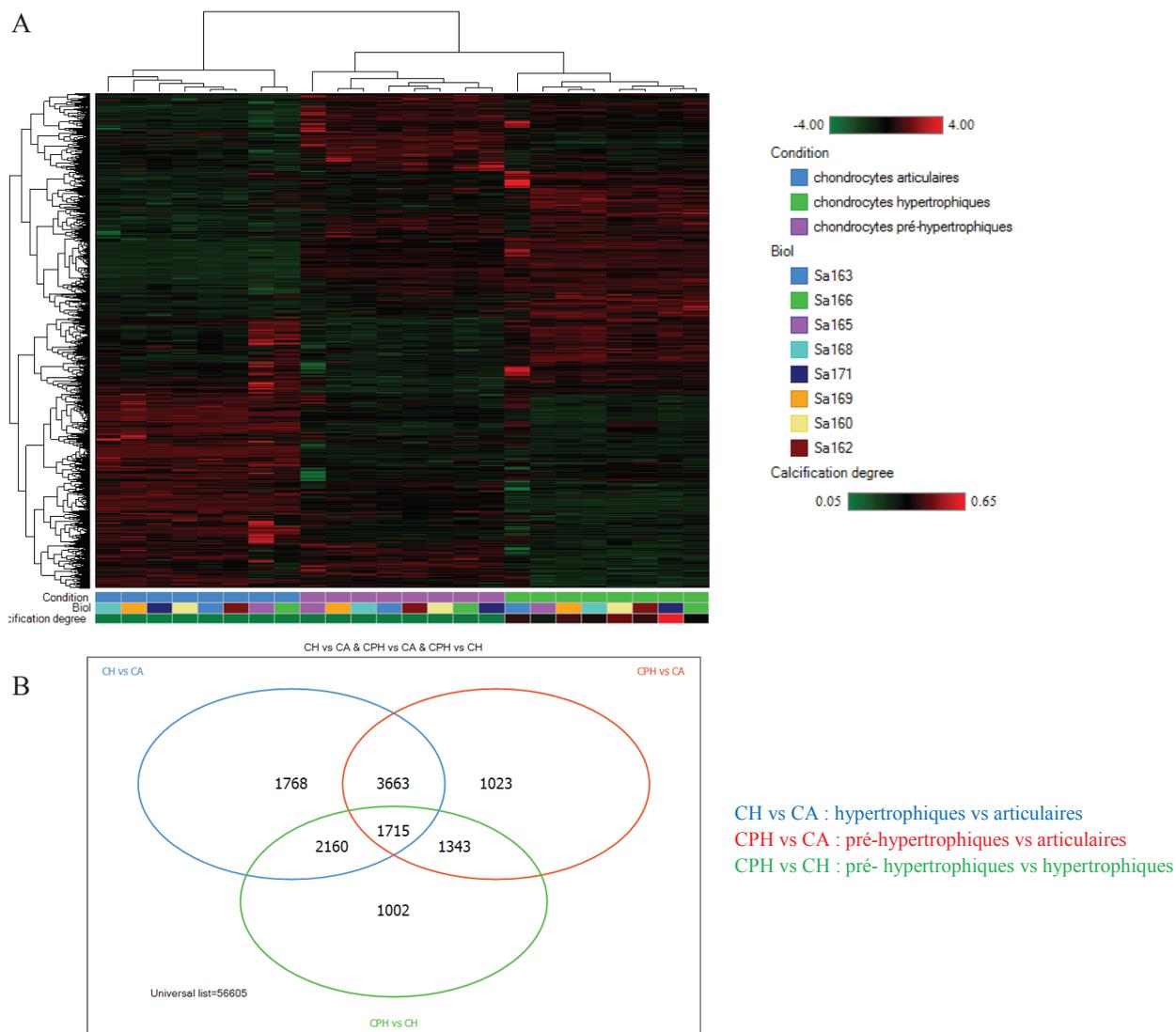


Figure 108: Signature moléculaire des échantillons de chondrocytes articulars, pré-hypertrophiques et hypertrophiques du microarray (n=8 dans chaque groupe).

(A) Cartographie des clusters de gènes caractérisant la signature moléculaire de chaque phénotype. Les gènes sont comparés deux à deux en fonction du degré de similitude entre leurs profils d'expression. Les gènes montrant la plus faible distance entre leurs profils sont groupés sous un « noeud ». Les gènes en vert sont sous-exprimés alors que les gènes en rouge sont surexprimés. (B) Représentation du nombre de gènes différentiellement exprimés entre les chondrocytes hypertrophiques et articulars (bleu, CH vs CA), entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et articulars (rouge, CPH vs CA) et entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques (vert, CPH vs CH). Fold Change > 1,3 et p-value < 0,05.

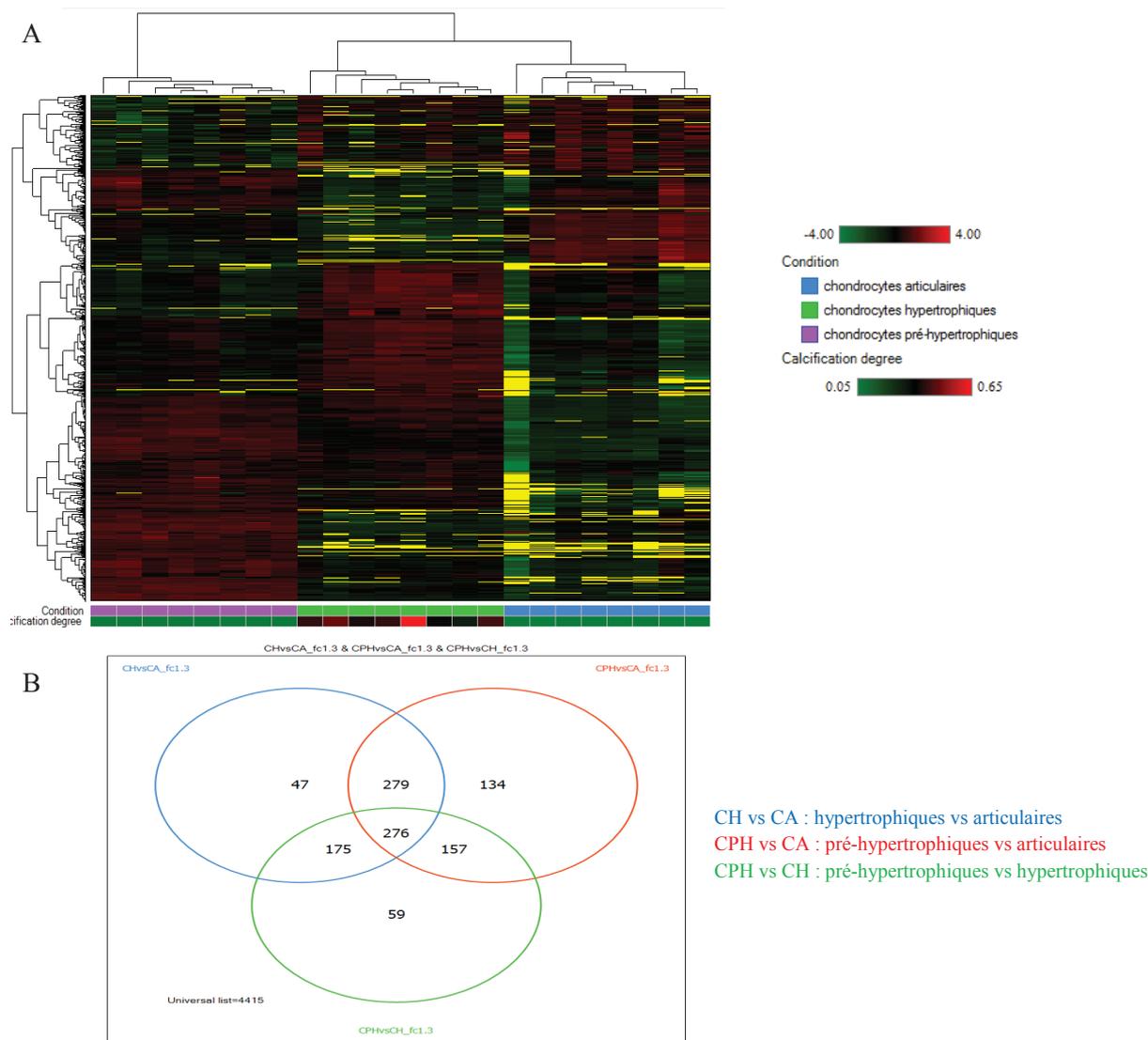


Figure 109: Signature moléculaire des échantillons de micro-ARN des chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques du microarray (n=8 dans chaque groupe).

(A) Cartographie des clusters de miRNAs caractérisant la signature moléculaire de chaque phénotype. Les miRNAs sont comparés deux à deux en fonction du degré de similitude entre leurs profils d'expression. Les miRNAs montrant la plus faible distance entre leurs profils sont groupés sous un « noeud ». Les miRNAs en vert sont sous-exprimés alors que les gènes en rouge sont surexprimés. La couleur jaune représente les données manquantes. (B) Représentation du nombre de micro-ARN différentiellement exprimés entre les chondrocytes hypertrophiques et articulaires (bleu, CH vs CA), entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et articulaires (rouge, CPH vs CA) et entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques (vert, CPH vs CH). Fold Change > 1,3 et p-value < 0,05.

3.2.1.5.4 Analyse fonctionnelle du microarray

Grâce à une base de données alimentée par des références de la littérature, le logiciel Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) réalise des regroupements de gènes associés à des « pathways », des fonctions biologiques, ou plus largement à des pathologies. En comparant les données d'un microarray à cette base de données, il est possible de reconstruire des réseaux interactifs entre les gènes. Ce logiciel permet aussi des recherches ciblées sur des gènes, des micro-ARN ou des thérapeutiques pour reconstruire des réseaux fonctionnels entre ces molécules dans un modèle d'étude.

Deux approches ont été utilisées pour l'analyse fonctionnelle de notre microarray par IPA (Tableau 22) :

- **Une analyse globale** : sans critère de sélection, afin de mettre en évidence les fonctions les plus représentées parmi les gènes dérégulés entre les chondrocytes articulaires et hypertrophiques.
- **Une analyse ciblée** : avec des critères de sélection, afin de mettre en évidence une ou des cibles impliquées dans une fonction d'intérêt en lien avec le domaine ostéo-articulaire.

Question biologique	Quelles sont les fonctions sur-représentées parmi les gènes dérégulés au cours de la différenciation hypertrophique ?	Quelles sont les fonctions, associées aux tissus ostéo-articulaires, sur-représentées parmi les gènes dérégulés ?
Type d'analyse	Globale	Ciblée
Critères de sélection	Aucun	Domaine ostéo-articulaire
Comparaisons réalisées	Hypertrophiques vs Articulaires	Hypertrophiques (vs Articulaires) vs Pré-hypertrophiques (vs Articulaires)

Tableau 22: Description des deux approches utilisées pour l'analyse fonctionnelle du microarray sur IPA.

Mise en place d'une analyse globale et d'une analyse ciblée des données de transcriptomique.

➤ Analyse globale

Une analyse globale nous a permis de mettre en évidence, sans critère défini, les « pathways », fonctions biologiques et pathologies, sur-représentés parmi les gènes différentiellement exprimés entre les chondrocytes hypertrophiques et articulaires (Figure 110). De manière intéressante, nous constatons que les gènes les plus dérégulés sont associés à des conditions pathologiques reliées à l'arthrose, telles que les maladies inflammatoires, musculo-squelettiques, métaboliques ou encore du tissu conjonctif. Nous retrouvons plus précisément des rôles associés à la polyarthrite rhumatoïde, en rapport avec les ostéoblastes, ostéoclastes, chondrocytes, macrophages, fibroblastes et les cellules endothéliales. Une dérégulation des gènes jouant un rôle dans le remodelage et le développement tissulaire ressortent également de cette analyse. Il existe donc une cohérence entre les fonctions biologiques dérégulées qui ont été identifiées et le modèle de la pathologie étudiée.

Top Canonical Pathways	
Name	
	Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis
	Axonal Guidance Signaling
	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation
	Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis
	Atherosclerosis Signaling
Top Diseases and Bio Functions	
▼ Diseases and Disorders	
Name	
	Connective Tissue Disorders
	Inflammatory Disease
	Skeletal and Muscular Disorders
	Metabolic Disease
	Inflammatory Response
▼ Physiological System Development and Function	
Name	
	Tissue Morphology
	Immune Cell Trafficking
	Hematological System Development and Function
	Connective Tissue Development and Function
	Tissue Development

Figure 110: Fonctions sur-représentées parmi les gènes différentiellement exprimés entre les chondrocytes articulaires et hypertrophiques de notre modèle.

Ces fonctions ont été mises en évidence par une analyse fonctionnelle globale du microarray par IPA. Nous notons notamment une dérégulation de gènes impliqués dans des pathologies inflammatoires, des pathologies musculo-squelettiques, métaboliques ainsi que des tissus conjonctifs. Les gènes dérégulés sont associés aux rôles des ostéoblastes, ostéoclastes, chondrocytes, macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales, décrits au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Des gènes jouant un rôle dans le remodelage et le développement tissulaire ressortent également de cette analyse globale.

➤ Analyse ciblée

Nous avons ensuite défini des critères de recherche plus spécifiques par les mots clés suivants sur IPA: « bone », « arth- », « osteo- », « connective tissue », « inflamm- ». Nous avons retrouvé dans les signatures des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, l'implication de fonctions/pathologies décrites par l'analyse globale, telles que les atteintes des tissus conjonctifs, la polyarthrite rhumatoïde ou les réponses inflammatoires (Figure 111). Notre attention s'est particulièrement focalisée sur les fonctions d'angiogenèse, de différenciation ostéoblastique, d'activation des cellules osseuses et de minéralisation osseuse, qui étaient sur-représentées chez les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques.

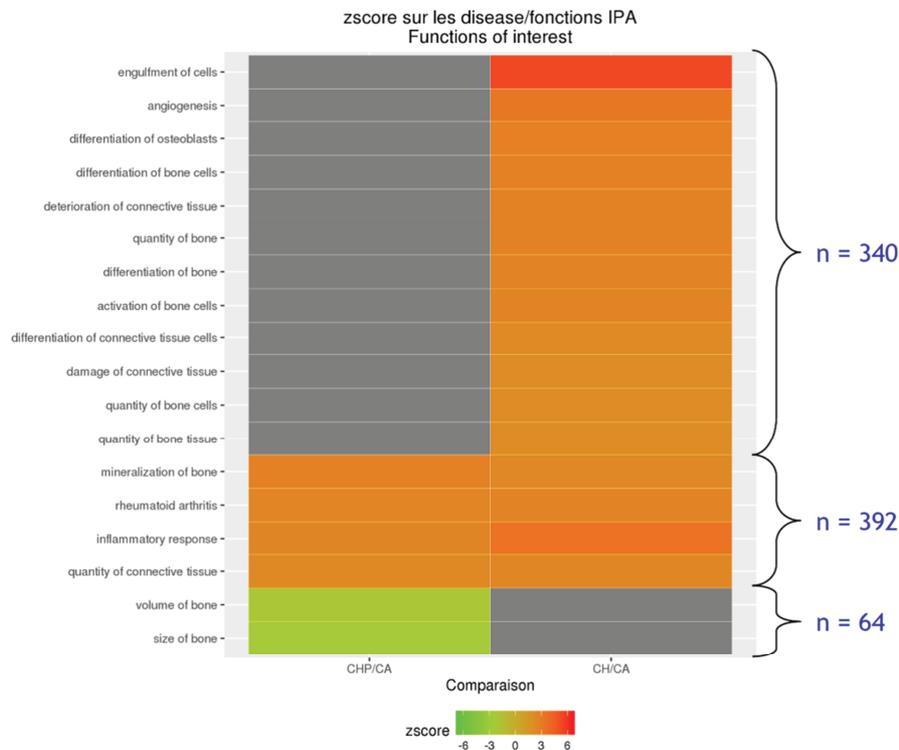


Figure 111: Fonctions ou pathologies d'intérêt représentées dans notre modèle chez les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques comparés aux articulaires, selon les mots clés « bone », « arth- », « osteo- », « connective tissue », « inflamm- ».

Le n représente le nombre de gènes dérégulés, regroupés dans les différentes fonctions mises en évidence par IPA. Les comparaisons ont été réalisées entre les chondrocytes pré-hypertrophiques vs articulaires (colonne de gauche, CHP/CA) et entre les chondrocytes hypertrophiques vs articulaires (colonne de droite, CH/CA). Certaines fonctions telles que l'angiogenèse, la phagocytose, la réponse inflammatoire, la différenciation ostéoblastique, l'activation des cellules osseuses et la minéralisation osseuse ressortent de cette analyse ciblée dans les chondrocytes hypertrophiques.

➤ **Fonction d'angiogenèse**

D'après la base de données d'IPA, 1821 gènes sont classés dans la fonction d'angiogenèse. Parmi ces derniers, nous avons identifié 189 gènes différentiellement exprimés entre les chondrocytes hypertrophiques et articulaires avec un Fold Change supérieur à 3 ($FC > 3$) ($p\text{-value} = 1,68E-32$), 144 gènes différentiellement exprimés entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et articulaires ($FC > 3$, $p\text{-value} = 5,99E-24$) et enfin 57 gènes différentiellement exprimés entre les chondrocytes hypertrophiques et pré-hypertrophiques ($FC > 3$, $p\text{-value} = 1,89E-11$).

En classant ces gènes par ordre croissant de dérégulation suivant leur Fold Change, nous avons identifié le gène codant la MMP-3 comme le plus dérégulé. Son expression est 135 fois plus importante dans les chondrocytes hypertrophiques que dans les articulaires. Le second gène le plus différentiellement exprimé est le gène PTPRZ1 dont l'expression est 72 fois supérieure dans les chondrocytes hypertrophiques que dans les chondrocytes articulaires. PTPRZ1 est également 25 fois plus exprimé dans les chondrocytes pré-hypertrophiques que dans les chondrocytes articulaires.

PTPRZ1 est un gène codant le récepteur PTP- ζ qui constitue un des récepteurs de l'interleukine-34 (IL-34). Le second récepteur de l'IL-34, CSF-1R, voit également l'expression de son gène augmenter de 4,3 fois dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux articulaires. En s'intéressant au réseau de l'IL-34 dans notre modèle, nous avons pu constater que son gène avait une expression augmentée de près de 9 fois dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux chondrocytes articulaires (Figure 112). Peu de connaissances sur l'IL-34 et son réseau fonctionnel sont actuellement disponibles dans les données de la littérature, comme le traduit ce petit réseau réalisé par IPA, comportant uniquement l'IL-34, ses deux récepteurs CSF-1R et PTPRZ1, et le facteur leukemia inhibitory factor (LIF).

En raison de l'implication des récepteurs de l'IL-34 dans la fonction d'angiogenèse et de leurs dérégulations importantes au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes, nous avons souhaité étudier plus en détails cette interleukine.

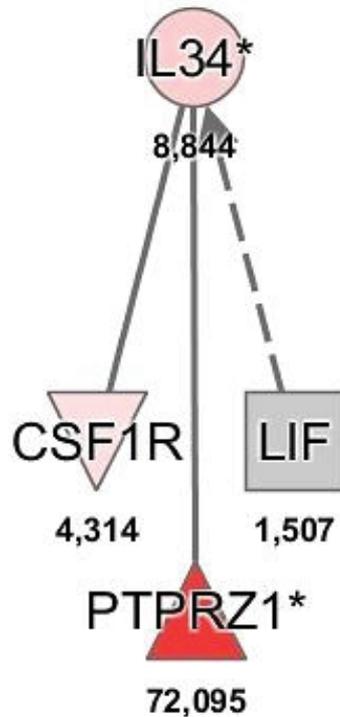


Figure 112: Réseau fonctionnel de l'IL-34 dans notre modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes.

La couleur rouge des acteurs de ce réseau (IL-34, CSF-1R et PTPRZ1) indique une surexpression de ces gènes (Fold Change > 3) dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux articulaires. Le chiffre représente la valeur exacte du Fold Change de l'expression génique. IL-34 : interleukine-34, CSF-1R : récepteur colony-stimulating factor 1, PTPRZ1 : récepteur protein-tyrosine phosphatase zeta, LIF : leukemia inhibitory factor.

L'objectif de cette dernière partie de thèse a donc été de rechercher le rôle que pourrait jouer l'IL-34 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes et du remodelage pathologique de la jonction ostéocondrale.

3.2.2 L'interleukine-34 (IL-34) : données bibliographiques

3.2.2.1 Découverte de l'IL-34

L'interleukine-34 est une cytokine décrite pour la première fois en 2008 par une équipe qui s'intéressait aux rôles peu connus des protéines sécrétées (Lin, H. et al. 2008). Grâce à leurs travaux de screening fonctionnel du protéome extracellulaire, ils ont mis en évidence une protéine non caractérisée qui stimulait la viabilité des monocytes humains, dénommée alors « interleukine-34 ».

Le gène codant l'IL-34 est hautement conservé parmi les vertébrés (Droin, N. & Solary, E. 2010). C'est un gène dit synténique, porté par le même chromosome dans les génomes humains et murins. La protéine humaine purifiée est constituée de 241 acides aminés (Figure 113), dont la séquence est conservée à 99,6%, 72% et 71%, respectivement entre l'homme et le chimpanzé, le rat et la souris. La protéine constitue un homodimère, composé de monomères d'une masse moléculaire de 39 kD. Il existe 2 isoformes d'IL-34 qui peuvent être obtenues par un épissage alternatif du gène. Ces isoformes se distinguent par l'ajout d'une glutamine entre les positions 80 et 81 de la protéine (Wei, S. et al. 2010). Il est intéressant de noter que l'IL-34 ne présente aucune similarité apparente avec d'autres protéines humaines. Aucune séquence structurale consensus n'a effectivement été décrite.

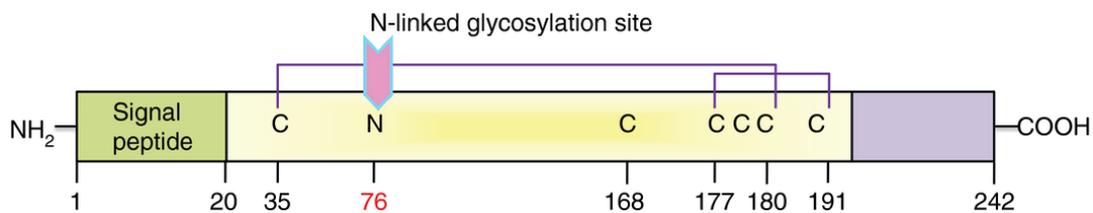


Figure 113: Représentation schématique de la structure de l'IL-34 humaine.

Cette protéine est constituée de 241 acides aminés, avec un peptide signal en N-terminal et un site de N-glycosylation indiqué en position 76. Les sites de formation de ponts disulfures sont figurés par les lignes violettes, permettant une organisation en homodimère. D'après Zhou, R. P. et al. (2016).

L'IL-34 est constitutivement exprimée par de nombreux tissus humains tels que le cœur, le cerveau, les poumons, le foie, les reins, le thymus, les testicules, les ovaires, la prostate, le petit intestin, le colon, et le plus abondamment dans la rate. Les fonctions exactes de l'IL-34 ne sont aujourd'hui que partiellement connues, mais son rôle a été particulièrement décrit dans la régulation de la survie, de la prolifération et de la différenciation des cellules souches de la lignée hématopoïétique monocyttaire, à l'origine des cellules dendritiques, des

ostéoclastes, des macrophages et des granulocytes (Figure 114) (Wei, S. et al. 2010, Zhou, R. P. et al. 2016).

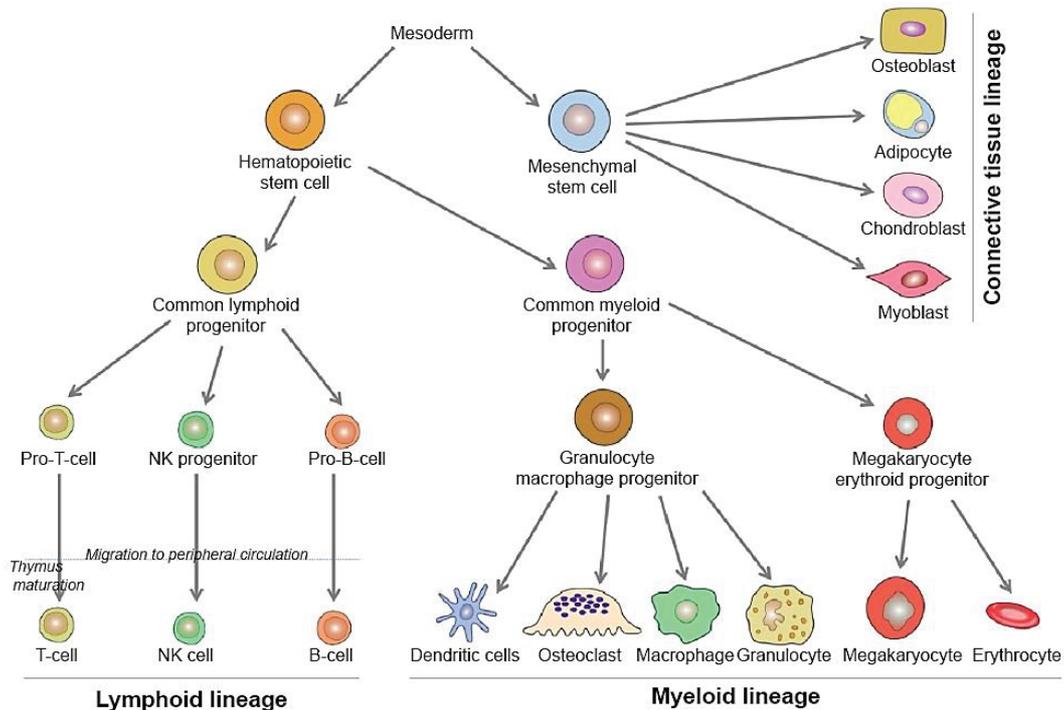


Figure 114: Schéma synthétique des voies de différenciation des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses.

Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine de la lignée lymphoïde (lymphocytes T, B et cellules NK) et de la lignée myéloïde (cellules dendritiques, ostéoclastes, macrophages, granulocytes, mégakaryocytes et érythrocytes), alors que les cellules souches mésenchymateuses sont à l'origine des tissus conjonctifs (os, cartilage, tissus adipeux et muscles). Le rôle de l'IL-34 a été décrit dans la régulation de la survie, de la prolifération et de la différenciation des cellules de la lignée hématopoïétique monocyttaire, capable de générer des cellules dendritiques, des ostéoclastes, des macrophages et des granulocytes. D'après Numan, M. S. et al. (2015).

3.2.2.2 Structures et fonctions des récepteurs de l'IL-34

Actuellement, deux récepteurs de l'IL-34 et un co-récepteur sont décrits dans la littérature (Figure 115): le récepteur colony-stimulating factor 1 (CSF-1R) en 2008 mis en évidence par Lin et al. (Lin, H. et al. 2008), le récepteur protein-tyrosine phosphatase zeta (PTP- ζ) en 2013 (Nandi, S. et al. 2013) et plus récemment la description de son co-récepteur, le syndecan-1 (CD138) en 2015 (Ségallyn, A. I. et al. 2015c).

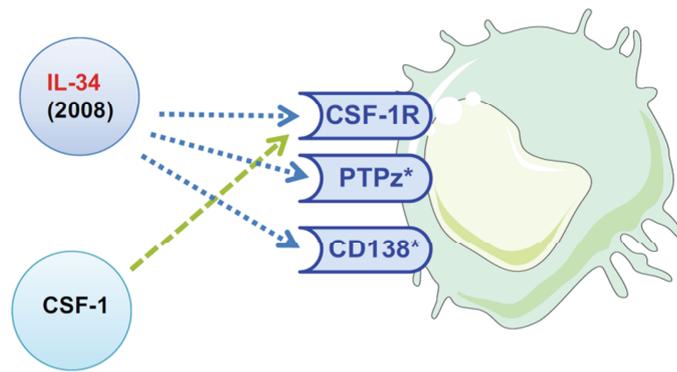


Figure 115: Récepteurs et co-récepteur de l'IL-34.

Alors que le colony-stimulating factor 1 (CSF-1) se lie uniquement au CSF-1R, l'IL-34 se lie au CSF-1R, au récepteur PTP- ζ et au syndecan-1 (CD138). L'asterisque* représente les chaînes de chondroïtine sulfates de PTP- ζ et CD138 où interagit l'IL-34 sur ses cellules cibles. D'après Guillonnet, C. et al. (2017).

3.2.2.2.1 Récepteur colony-stimulating factor 1 (CSF-1R)

Lorsque l'équipe de Lin a découvert l'IL-34, son récepteur CSF-1R a également été mis en évidence. Jusqu'ici, le ligand reconnu du CSF-1R était le colony-stimulating factor 1 (CSF-1), qui présente pourtant une affinité de liaison pour ce récepteur bien inférieure à celle d'IL-34. En effet, cette affinité de liaison a été évaluée par une analyse Biacore démontrant une constante de dissociation (K_D) d'environ 1 pM entre l'IL-34 et le CSF-1R et de 34 pM entre le CSF-1 et le CSF-1R (Lin, H. et al. 2008).

Avant la découverte de l'IL-34, les observations d'un phénotype plus sévère chez les souris déficientes pour CSF-1R (CSF-1R^{-/-}) par rapport aux souris déficientes pour CSF-1, appelées ostéopétrotiques (CSF-1^{op}/CSF-1^{op}) (Dai, X. M. et al. 2002), suggéraient l'existence d'un ou plusieurs ligands, autres que CSF-1. Malgré l'absence de similarité de séquence, avec seulement 11% d'homologie, la structure cristallographique du dimère d'IL-34 révèle une cytokine hélicoïdale analogue au CSF-1, qui est capable de se lier aux mêmes domaines N-terminaux du CSF-1R (Ma, X. et al. 2012) (Figure 116).

CSF-1R est une glycoprotéine de 165 kDa, exprimée par le proto-oncogène c-fms. Il s'agit d'un membre de la famille des récepteurs transmembranaires à tyrosine kinase de classe III (RTK-III), incluant le platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), le Fms-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) et le récepteur KIT dont le ligand est le stem cell factor (SCF) (Verstraete, K. & Savvides, S. N. 2012). Ces RTK-III sont composés d'une région extracellulaire comprenant 5 domaines immunoglobulin-like (D1-D5) correspondant au

domaine de liaison des ligands, un segment transmembranaire et un domaine intracellulaire composé de domaines kinases. La flexibilité de l'interdomaine entre les modules D2 et D3 est une caractéristique qui permet au récepteur CSF-1R des interactions spécifiques avec le CSF-1 et l'IL-34 (Ma, X. et al. 2012). L'activité biologique de l'IL-34 passe majoritairement par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes avec son récepteur alors que des interactions salines sont décrites pour le CSF-1. Ces ligands activent leur récepteur par dimérisation, ce qui entraîne l'autophosphorylation de résidus tyrosine du domaine intracellulaire (Pixley, F. J. & Stanley, E. R. 2004, Stanley, E. R. & Chitu, V. 2014), conduisant à l'activation des voies de signalisation impliquées principalement dans la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation, la migration et la sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires.

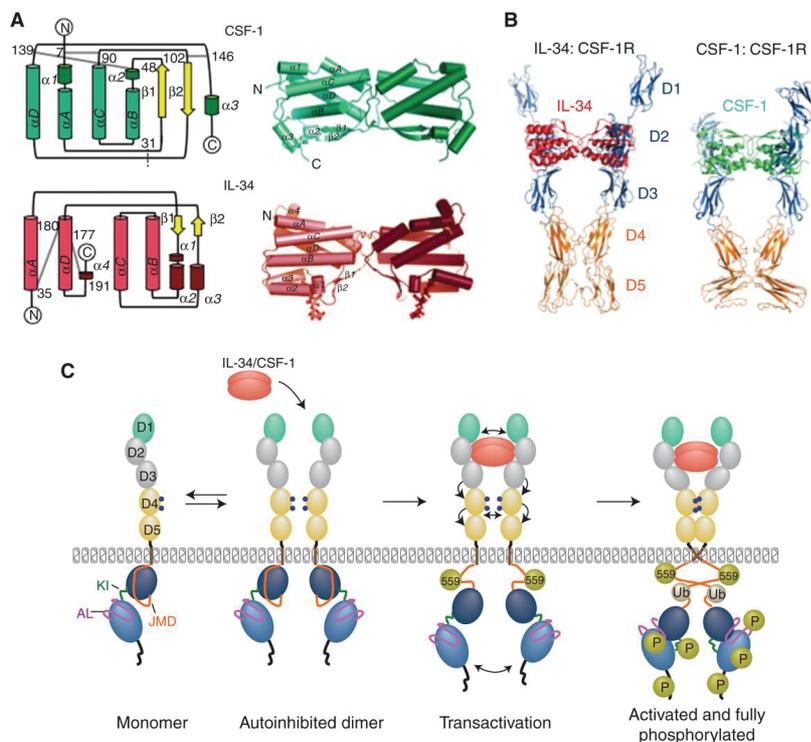


Figure 116: Structure du CSF-1, de l'IL-34 et des complexes ligand-récepteur CSF-1R.

(A) Diagrammes topologiques des monomères de CSF-1 et d'IL-34 (à gauche) et représentation de la structure des dimères en ruban (à droite). Les lignes noires des diagrammes topologiques représentent les ponts disulfures intramolécules et les lignes grises indiquent les ponts disulfures intermolécules, qui permettent la formation du dimère. (B) Structure du complexe IL-34/CSF-1R et CSF-1/CSF-1R, représentant les 5 domaines immunoglobulin-like extracellulaires du récepteur. (C) Modèle de l'activation du récepteur CSF-1R par la liaison de ses ligands entre les modules D2 et D3, entraînant la trans-activation du récepteur et une cascade d'autophosphorylations. Le domaine intracellulaire possède une activité tyrosine kinase qui comporte différents segments: le juxtamembrane domain (JMD, en orange), la kinase insert (KI, en vert), et l'activation loop (AL, en violet). Les sphères

dorées représentent les résidus tyrosine phosphorylés (P) et les sphères grises les sites d'ubiquitination (Ub) de la protéine. D'après Stanley, E. R. & Chitu, V. (2014).

Le récepteur CSF-1R est ubiquitaire dans l'organisme, avec une expression retrouvée dans de nombreux organes, récemment synthétisés dans la revue de Chitu, V. & Stanley, E. R. (2017) (Figure 117). On peut relever notamment la présence de ce récepteur dans les cellules souches hématopoïétiques, les monocytes, les macrophages résidents dans les tissus, les ostéoclastes, les cellules dendritiques, les progéniteurs de cellules endothéliales, les lymphocytes B, les cellules neuronales, les cellules épithéliales du tubule proximal rénal et du colon. Ce récepteur permet ainsi le contrôle de la survie, de la prolifération et de la différenciation de l'ensemble de ces types cellulaires. Ce constat nous suggère donc l'implication potentielle de la dérégulation de ce récepteur ou de ses ligands IL-34 et CSF-1 dans le développement de conditions pathologiques.

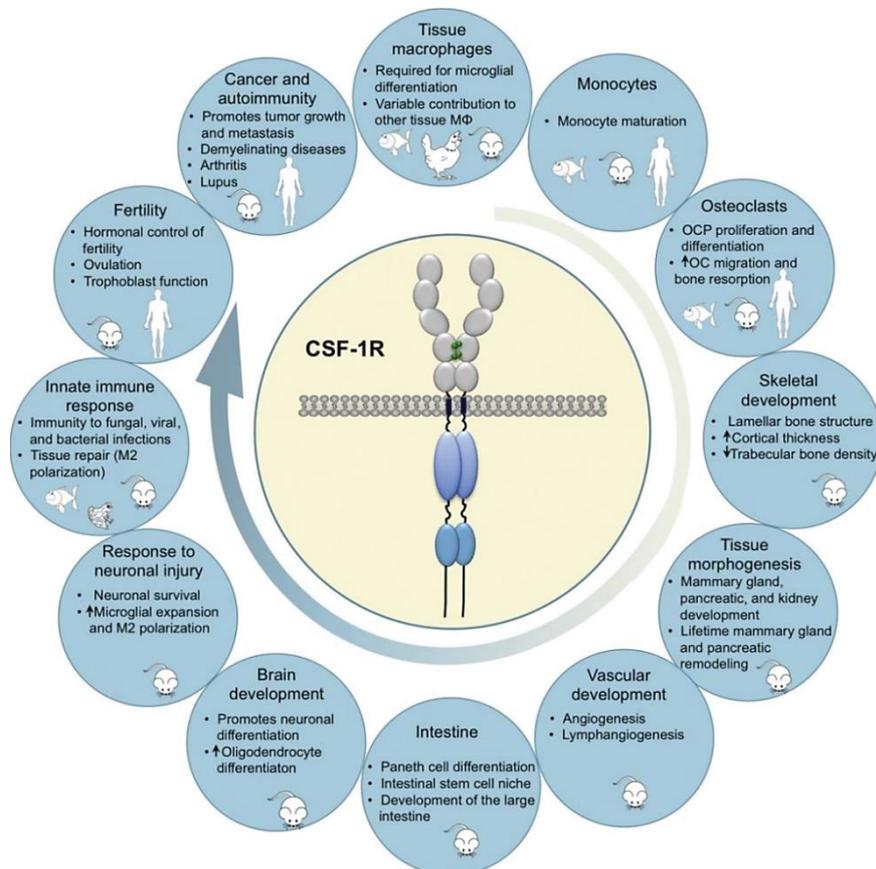


Figure 117: Rôles du récepteur CSF-1R décrits au cours du développement et dans la physiologie de l'organisme adulte.

Ces études ont été réalisées chez l'homme et dans différents organismes modèles (souris, poisson zèbre, xénope, poulet), représentés par des dessins dans chaque fonction étudiée : différenciation des macrophages résidents dans les tissus, des monocytes et des ostéoclastes, développement squelettique et vasculaire, morphogenèse des tissus, développement de

l'intestin et du cerveau, mise en place d'une réponse immunitaire innée, rôle dans la fertilité, le cancer et l'auto-immunité. D'après Chitu, V. & Stanley, E. R. (2017).

Il a été décrit que les souris déficientes pour le CSF-1R présentaient une ostéopétrose, en raison d'une production insuffisante d'ostéoclastes, un défaut du nombre de macrophages résidents dans les tissus, un retard de croissance, une fertilité réduite et des défauts squelettiques importants (Dai, X. M. et al. 2002).

Chez les souris déficientes pour le CSF-1 (CSF-1^{op}/CSF-1^{op}), l'expression d'un transgène codant l'IL-34 est capable d'abolir les défauts de fertilité et les atteintes osseuses, ainsi que de rétablir la présence d'ostéoclastes fonctionnels et de macrophages dans les tissus (Wei, S. et al. 2010). Ces travaux indiquent donc l'existence de fonctions redondantes assurées par ces deux cytokines, malgré leurs profils d'expression spatiotemporels différents. Il a été également décrit chez ces souris que l'absence d'ostéoclastes différenciés pouvait être compensée spontanément au cours du temps par la réponse des cellules hématopoïétiques à l'IL-34 dans la rate (Nakamichi, Y. et al. 2013).

Chez les souris déficientes pour l'IL-34, une étude a décrit un défaut du nombre de cellules microgliales et de cellules de Langerhans, qui constituent les deux populations de cellules myéloïdes majeures dans le cerveau et la peau, respectivement. En revanche, l'absence d'une ostéopétrose chez ces souris IL-34^{-/-} serait probablement due à une compensation par le CSF-1 (Wang, Y. et al. 2012).

3.2.2.2 Récepteur protein-tyrosine phosphatase zeta (PTP-ζ)

Dans le cerveau, l'IL-34 est fortement exprimée au cours du développement post-natal et chez l'adulte alors que son récepteur CSF-1R présente une expression très importante au cours du développement précoce et diminue drastiquement à l'âge adulte (Nandi, S. et al. 2012). L'existence d'une telle expression différentielle suggérait que la signalisation IL-34 pourrait également impliquer d'autres récepteurs. En effet, il a été montré que l'IL-34 était capable de se lier spécifiquement aux chaînes chondroïtine sulfates du domaine extracellulaire du récepteur protein-tyrosine phosphatase ζ (PTP-ζ), avec une constante de dissociation $K_D \sim 0,1 \mu\text{M}$. Le récepteur PTP-ζ est décrit sous différentes isoformes suite à un épissage alternatif de son gène PTPRZ1 ; des isoformes membranaires (longue et courte) et une isoforme soluble, le phosphacan (Figure 118) (Peles, E. et al. 1998). L'IL-34 ne peut pas se lier à l'isoforme membranaire courte car cette dernière ne contient pas de protéoglycanes à chondroïtine sulfates dans son domaine extracellulaire.

Le récepteur PTP- ζ est abondamment présent dans le cerveau et y joue un rôle important dans la survie neuronale, la formation synaptique et la croissance axonale. (Nandi, S. et al. 2013). Il a en effet été identifié dans les progéniteurs neuronaux, les cellules microgliales, mais aussi dans les cellules endothéliales (Koutsoumpa, M. et al. 2015), les cellules tubulaires rénales (Baek, J. H. et al. 2015) et dans les cellules épithéliales intestinales (Zwicker, S. et al. 2016).

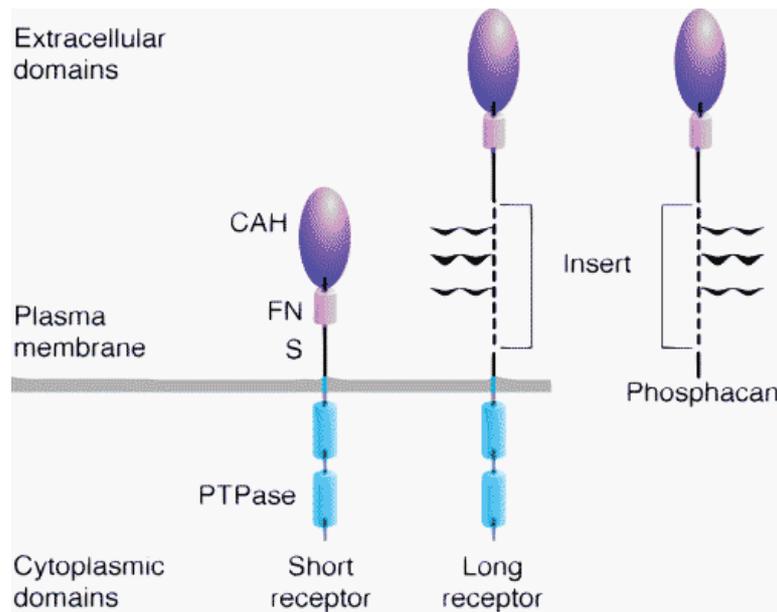


Figure 118: Structures des récepteurs protein-tyrosine phosphatase ζ membranaires (isoformes courte et longue) et du récepteur soluble (phosphacan).

L'isoforme membranaire courte du récepteur comporte un domaine anhydrase carbonique (CAH) et un motif de fibronectine de type III (FN). Ce récepteur contient aussi un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire, constitué de domaines tyrosine phosphatases (PTPase). Dans l'isoforme longue du récepteur, le domaine extracellulaire est composé de protéoglycanes à chondroïtine sulfates (lignes ondulées), qui permettent la fixation de l'IL-34. L'isoforme sécrétée, appelée phosphacan est constituée des mêmes domaines extracellulaires que l'isoforme membranaire longue, à savoir un domaine anhydrase carbonique, un motif de fibronectine de type III et des protéoglycanes à chondroïtine sulfates. L'IL-34 ne peut donc se fixer qu'à l'isoforme transmembranaire longue et au phosphacan, car ils comportent tous deux des protéoglycanes à chondroïtine sulfates. D'après les travaux de Peles, E. et al. (1998).

Sous sa forme monomérique, le récepteur PTP- ζ possède une activité tyrosine phosphatase constitutivement active, qui est inhibée par dimérisation suite à une interaction avec un ligand (Meng, K. et al. 2000). Cette inactivation du récepteur conduit à la phosphorylation des résidus tyrosine des effecteurs en aval de sa voie de signalisation. Comme CSF-1R, l'activation de ces cascades de signalisation participe à la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation et la migration.

D'autres ligands que l'IL-34 ont été décrits, tels que la pléiotrophine (PTN) (Maeda, N. et al. 1996), la midkine (MK) (Maeda, N. et al. 1999), la protéine membranaire contactine (Peles, E. et al. 1995), la protéine matricielle ténascine-R (Milev, P. et al. 1998) et récemment le vascular endothelium growth factor (VEGF) (Koutsoumpa, M. et al. 2015). Par l'intermédiaire de leur récepteur PTP- ζ , la pléiotrophine, la midkine et le VEGF régulent le mécanisme d'angiogenèse dans des contextes physiologiques et pathologiques (Papadimitriou, E. et al. 2016, Koutsoumpa, M. et al. 2015). Des études *in vitro* ont également démontré le rôle de la PTN dans l'activation de l'adhérence des ostéoblastes, de leur migration, leur prolifération, leur différenciation ainsi que leur synthèse de matrice extracellulaire (Yang, X. et al. 2003).

Chez les souris déficientes pour le récepteur PTP- ζ , aucun phénotype marqué n'est mis en évidence, excepté des anomalies d'apprentissage et de mémoire. (Harroch, S. et al. 2000).

En dehors du rôle bien connu de l'IL-34 dans le développement cérébral et le maintien de sa physiologie chez l'adulte, peu de données sont actuellement disponibles. Le rôle de l'interaction entre l'IL-34 et le PTP- ζ reste à explorer dans les autres tissus, en conditions physiologiques et pathologiques.

3.2.2.2.3 Syndecan-1 (CD138)

Les syndecans représentent une famille de 4 membres (syndecan-1 à 4). Ce sont des protéines transmembranaires, jouant différents rôles dans la signalisation cellulaire, comme les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, l'adhérence cellulaire, la migration, la prolifération, l'angiogenèse et la tumorigenèse (Pantazaka, E. & Papadimitriou, E. 2014).

Grâce à ses chaînes chondroïtine sulfates, le syndecan-1 est décrit comme un co-récepteur de facteurs de croissance (Figure 119), tels que l'epidermal growth factor (EGF) (Takazaki, R. et al. 2004), l'hepatocyte growth factor (HGF) (Kemp, L. E. et al. 2006), le vascular endothelial growth factor (VEGF) (Yu, S. et al. 2017), le platelet-derived growth factor (PDGF) (Fukai, N. et al. 2009) ou encore des membres de la famille du transforming growth factor (TGF- β) (Rider, C. C. 2006).

De la même façon, l'IL-34 est capable de lier le syndecan-1, présent à la surface de différents types cellulaires, tels que les cellules hématopoïétiques, mésenchymateuses et épithéliales (Ségaly, A. I. et al. 2015c). Ségaly et ses collaborateurs ont démontré que

l'IL-34 induisait la migration de cellules myéloïdes par un mécanisme dépendant du syndecan-1.

Ce protéoglycane synthétisé par les cellules tumorales du cancer du sein a été identifié comme un nouvel activateur de l'ostéoclastogenèse par sa capacité à interagir avec l'ostéoprotégérine et d'ainsi bloquer son activité biologique (Benad-Mehner, P. et al. 2013). Le syndecan-1 pourrait de ce fait jouer un rôle dans le remodelage osseux.

Une étude suggère que le syndecan-1 aurait la capacité de moduler la signalisation CSF-1R induite par l'IL-34, probablement en fonction de son niveau d'expression (Figure 120) (Ségaly, A. I. et al. 2015c). En effet, les interactions entre l'IL-34 et le CSF-1R seraient limitées lors d'une expression faible ou modérée de syndecan-1, qui est capable de séquestrer l'IL-34 à la surface cellulaire grâce à ces chaînes de chondroïtine sulfates. Inversement, une surexpression de syndecan-1 amplifierait significativement l'activation du CSF-1R par l'IL-34, en augmentant la proximité du ligand et de son récepteur.

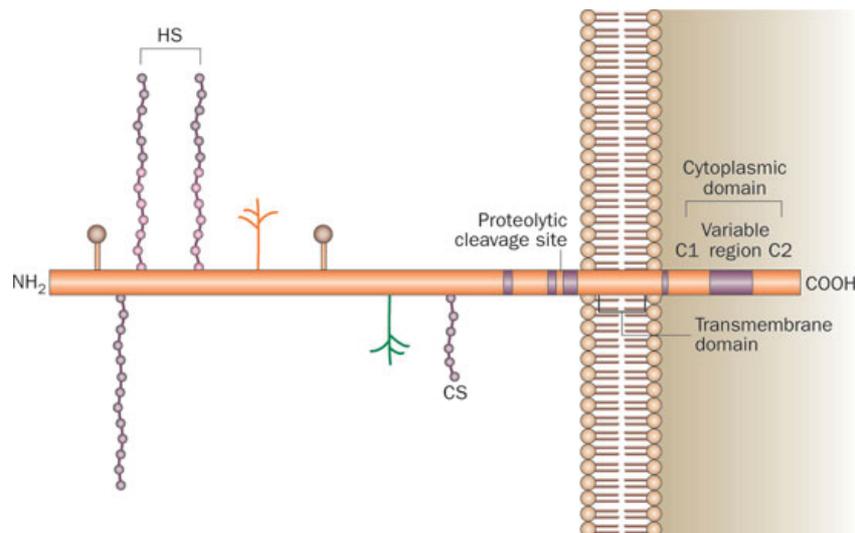


Figure 119: Structure du syndecan-1, un protéoglycane composé de chaînes chondroïtine sulfates et héparane sulfates.

Le syndecan-1 est composé de 3 domaines : des domaines transmembranaire et intracellulaire fortement conservés entre les différents types de syndecan et un domaine extracellulaire spécifique. Le domaine intracellulaire comporte deux régions constantes (C1 et C2), séparées par une région variable, propre à chaque syndecan. Les régions constantes interagissent avec de nombreuses protéines du cytosquelette et des molécules de signalisation. Dans son domaine extracellulaire, des chaînes de chondroïtine sulfates et d'héparane sulfates sont présentes et permettent la liaison d'une variété de facteurs de croissance, en conditions physiologiques en cas de remodelage tissulaire mais aussi pathologiques au cours de la tumorigenèse. CS : chondroïtine sulfates, HS : héparane sulfates. D'après Edwards, I. J. (2012).

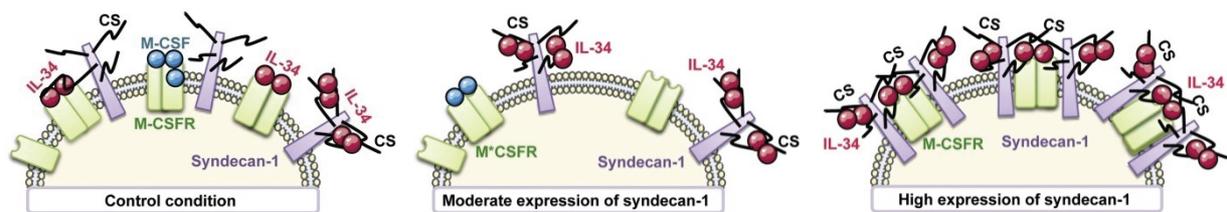


Figure 120: Schémas représentant l'implication éventuelle du syndecan-1 dans la biodisponibilité et l'activité de l'IL-34.

Potentielles interactions de l'IL-34 avec le CSF-1R et le syndecan-1 en condition contrôle (à gauche) et selon le niveau d'expression de syndecan-1. Lors d'une expression modérée de syndecan-1 (au milieu), qui est capable de séquestrer l'IL-34 à la surface cellulaire, les interactions entre l'IL-34 et le CSF-1R sont limitées. Inversement, une surexpression de syndecan-1 (à droite) amplifierait significativement l'activation du CSF-1R par l'IL-34, en augmentant la proximité du ligand et de son récepteur. Adapté de Ségaliny, A. I. et al. (2015c).

3.2.2.3 Signalisation intracellulaire de l'IL-34

La reconstruction du réseau moléculaire de l'IL-34, à partir des données actuelles de la littérature, nous suggère la complexité de la régulation des voies de signalisation induites par l'IL-34 (Figure 121). En se fixant sur ses récepteurs CSF-1R et PTP- ζ , l'IL-34 active une cascade de transducteurs (Ras, Raf, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) et paxillin) et de tyrosine kinases (extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), Src kinase, focal adhesion kinase (FAK), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), AKT (protéine kinase B)), qui sont capables de réguler rapidement l'expression de gènes cibles, permettant de moduler la prolifération cellulaire, la différenciation, l'angiogenèse, l'adhérence ou la migration. Il est intéressant de rappeler que la liaison d'IL-34 sur le syndecan-1 permettrait d'amplifier l'activation du récepteur CSF-1R. Ainsi, selon le degré d'expression de chacun de ces acteurs, la signalisation intracellulaire induite va pouvoir moduler significativement les fonctions des cellules cibles.

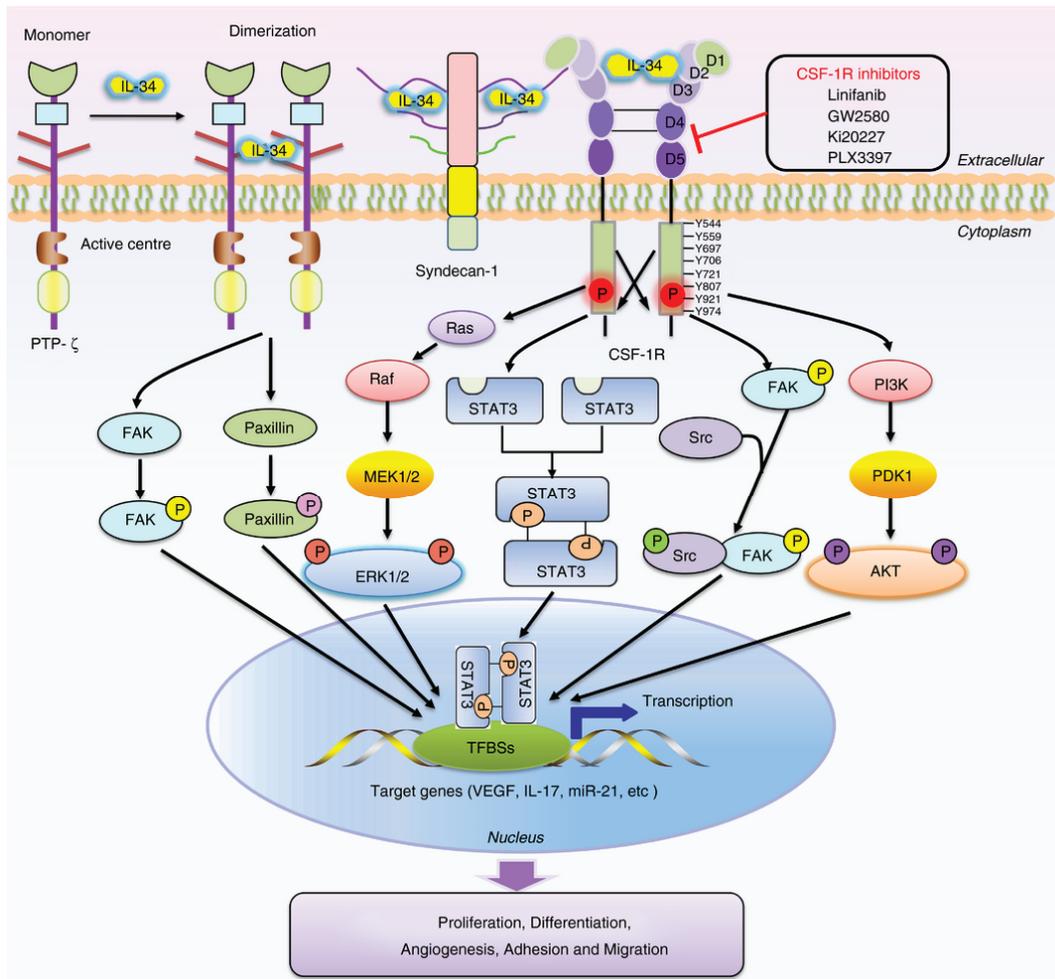


Figure 121: Régulation des voies de signalisation intracellulaires en aval des complexes IL-34/CSF-1R, IL-34/ PTP ζ et IL-34/syndecan-1.

L'IL-34 se fixe entre les modules D2 et D3 du domaine extracellulaire du récepteur CSF-1R et active une cascade de transducteurs (Ras, Raf, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)) et de tyrosine kinases tels que l'extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), Src kinase, la focal adhesion kinase (FAK), la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), l'AKT (protéine kinase B). Ces transducteurs régulent rapidement l'expression de gènes cibles, permettant ainsi de moduler des fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse, l'adhérence ou la migration. Le TFBS (transcription factor-binding sites) correspond au site de fixation des facteurs de transcription sur le promoteur des gènes cibles. Des inhibiteurs du récepteur CSF-1R connus pour apporter une protection contre l'érosion osseuse dans des modèles murins d'arthrite sont indiqués sur la figure (Linifanib, GW2580, Ki20227, PLX3397). A l'inverse, la liaison d'IL-34 sur le syndecan-1 permet d'amplifier l'activation du récepteur CSF-1R. Par sa liaison sur le monomère PTP- ζ , l'IL-34 va inhiber son activité phosphatase par dimérisation du récepteur, entraînant notamment la phosphorylation de la focal adhesion kinase (FAK) et de la paxillin, ce qui va conduire à l'activation de l'expression de gènes cibles et de fonctions cellulaires similaires à celles activées par la voie du CSF-1R. D'après Zhou, R. P. et al. (2016).

3.2.2.4 Implications pathologiques de l'IL-34

Une dérégulation de la sécrétion d'IL-34 et/ou de l'expression de ses récepteurs a été identifiée dans de nombreuses pathologies telles que l'obésité (Chang, E. J. et al. 2014), les hépatites C et fibroses hépatiques (Preisser, L. et al. 2014), les pathologies parodontales (Martinez, G. L. et al. 2017), cardiovasculaires et rénales (Tao, R. et al. 2017, Baek, J. H. et al. 2015, Sanchez-Niño, M. D. et al. 2016), les pathologies inflammatoires intestinales chroniques (Zwicker, S. et al. 2015 et 2016) les glioblastomes (Müller, S. et al. 2003), les cancers du poumon et de la prostate, en favorisant la progression tumorale et métastatique (Feng, Z. J. et al. 2010, Diamantopoulou, Z. et al. 2012, Ségaliny, A. I. et al. 2015b). L'implication du syndecan-1 est également décrite dans des cancers, tels que le myélome (Yang, Y. et al. 2002), le mélanome (Orecchia, P. et al. 2013) et les adénocarcinomes pancréatiques (Conejo, J. R. et al. 2000).

L'IL-34 a également été mise en cause dans des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (Wang, B. et al. 2017), l'arthrite psoriasique (Li, J. et al. 2017) et le lupus érythémateux systémique (Wang, H. et al. 2016). Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux rôles de l'IL-34 dans la polyarthrite rhumatoïde afin d'étudier les mécanismes d'action de cette cytokine et de ses récepteurs dans un contexte physiopathologique qui comporte de nombreuses similarités avec celui de l'arthrose.

➤ Rôles émergents de l'IL-34 en rhumatologie : cas de la polyarthrite rhumatoïde

Des études ont montré que les niveaux d'IL-34 étaient anormalement élevés dans les sérums et liquides synoviaux des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Wang, B. et al. 2017, Tian, Y. et al. 2013, Chemel, M. et al. 2012). Une corrélation a été mise en évidence entre cette augmentation des niveaux d'IL-34 et la progression de l'érosion osseuse ainsi que l'aggravation du score du pincement articulaire, reflétant la dégradation du cartilage au cours de la PR. Ces travaux ont suggéré l'IL-34 comme un potentiel marqueur de prédiction de la progression radiographique de la pathologie chez les patients souffrant d'une PR active (Chang, S. H. et al. 2015). Les données de la littérature ont en effet démontré que le niveau sérique d'IL-34 était significativement plus élevé chez les patients présentant des atteintes radiographiques avancées. Il existe également une corrélation positive entre les niveaux d'IL-34 et de MMP-3, associés à la sévérité de la destruction osseuse au cours de cette pathologie (Zhang, F. et al. 2015). En effet, les ostéoclastes sont impliqués dans de nombreuses pathologies dégénératives osseuses telles que la PR (Chang, S. H. et al. 2015). Il

s'agit de cellules spécialisées, qui se différencient à partir de la lignée hématopoïétique monocyttaire en réponse au RANKL et au CSF-1 (Figure 122) (Takahashi, N. et al. 2014).

Plus récemment, il a été montré que l'IL-34 était capable de se substituer au CSF-1 dans l'induction de l'ostéoclastogenèse RANKL-dépendante, en activant l'adhérence et la prolifération des progéniteurs ostéoclastiques (Baud'Huin, M. et al. 2010, Chen, Z. et al. 2011, Boström, E. A. & Lundberg, P. 2013). Des études ont montré que l'IL-34 murine recombinante associée au RANKL, n'activait pas seulement la différenciation des ostéoclastes mais permettait aussi l'acquisition de leur activité de résorption osseuse (Chen, Z. et al. 2011). L'IL-34 induit également la différenciation de cellules mononuclées circulantes humaines en ostéoclastes, en favorisant la migration chimiotactique de ces cellules (Hwang, S. J. et al. 2012). A l'inverse, une inhibition de l'IL-34 par un anticorps spécifique inhibe la formation d'ostéoclastes. Enfin, l'administration d'IL-34 augmente le nombre de précurseurs d'ostéoclastes CD11b⁺ et diminue la masse osseuse trabéculaire (Chen, Z. et al. 2011).

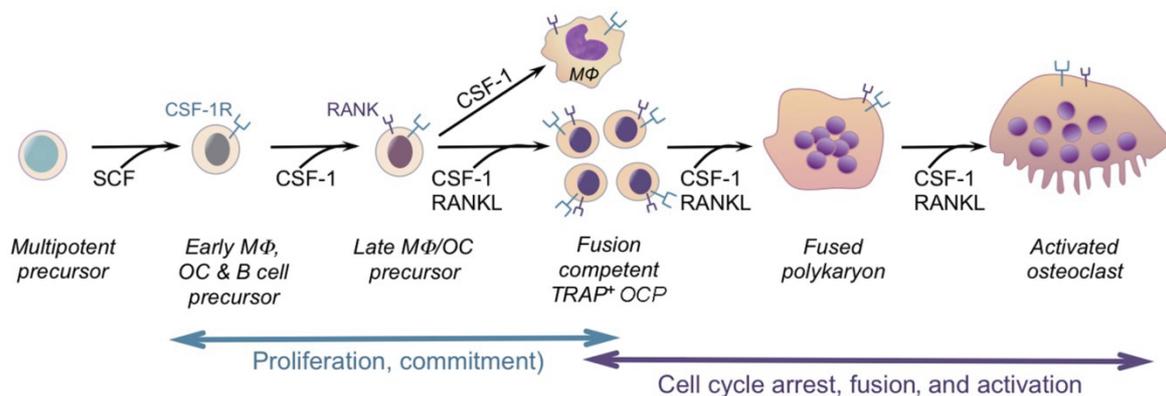


Figure 122: Rôle du CSF-1 et de RANKL dans la différenciation des ostéoclastes à partir de cellules souches hématopoïétiques multipotentes.

En réponse au stem cell factor (SCF), les précurseurs précoces de macrophages, d'ostéoclastes et de lymphocytes B expriment le récepteur CSF-1R à leur surface cellulaire. En présence de CSF-1, les cellules se différencient en précurseurs tardifs de macrophages et d'ostéoclastes et expriment le récepteur RANK. En réponse au CSF-1 seul, les précurseurs se différencient en macrophages. En réponse au CSF-1 combiné au RANKL, une différenciation ostéoclastique est induite, jusqu'à la formation d'ostéoclastes matures et activés, présentant une activité de résorption osseuse. D'après Chitu, V. & Stanley, E. R. (2017).

Dans des modèles expérimentaux d'arthrite chez la souris et le rat, l'utilisation de composés pharmacologiques bloquant le récepteur CSF-1R, tels que l'AFS98, un anticorps monoclonal anti-CSF-1R ou le GW2580, un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur, a récemment démontré leurs efficacités dans la réduction de l'infiltration de macrophages dans la membrane synoviale, la protection de l'intégrité du cartilage, l'inhibition de l'érosion

osseuse, associée à une déplétion d'ostéoclastes, et par une réduction de la douleur (Conway, J. G. et al. 2008, Toh, M. L. et al. 2014, Alvarado-Vazquez, P. A. et al. 2015).

En plus de son rôle activateur de l'ostéoclastogenèse, l'IL-34 produite par les fibroblastes et les synoviocytes humains a été décrite comme une cytokine associée à la sévérité de l'inflammation de la membrane synoviale (Hwang, S. J. et al. 2012, Chemel, M. et al. 2012). En effet, l'IL-34 induirait très fortement la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et de chimiokines, CXCL-8/IL-8, CXCL-10 et MCP-1 dans le sérum humain (Eda, H. et al. 2010).

L'IL-34 a également été suggérée comme une molécule modulatrice de l'angiogenèse en stimulant la sécrétion de VEGF, CXCL-10, MCP-1 et IL-8, qui ont montré leur implication dans la progression d'ostéosarcome en favorisant le développement du réseau vasculaire (Ségaliny, A. I. et al. 2015b).

L'inhibition du récepteur CSF-1R par un anticorps huAb1 supprime la production de chimiokines (CCL-2, GCP-2, CCL-7, CXCL-8, CXCL-10, MIG) dans des explants de membrane synoviale ainsi que la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α et de MMP-2 (Garcia, S. et al. 2016). L'inhibiteur de l'activité kinase du récepteur (GW2580) induit également une diminution significative des niveaux de chimiokines secrétées en réponse à l'IL-34 (Eda, H. et al. 2010). Dans un modèle murin d'arthrite, l'utilisation d'anticorps anti-CSF-1R (Ki20227) par voie orale permet de ralentir la progression de la pathologie et de diminuer significativement la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β et IL-6) (Ohno, H. et al. 2008).

En conclusion, dans le contexte physiopathologique de la polyarthrite rhumatoïde, les données de la littérature démontrent l'implication de l'IL-34 dans l'activation de l'ostéoclastogenèse et de l'angiogenèse, ainsi que dans l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de protéases matricielles. En induisant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et pro-cataboliques, l'IL-34 participerait donc aux atteintes tissulaires reconnues dans cette pathologie ; une destruction du cartilage articulaire, une érosion de l'os et une inflammation chronique de la membrane synoviale (Baud'Huin, M. et al. 2010, Chemel, M. et al. 2012, Boström, E. A. & Lundberg, P. 2013) (Figure 123).

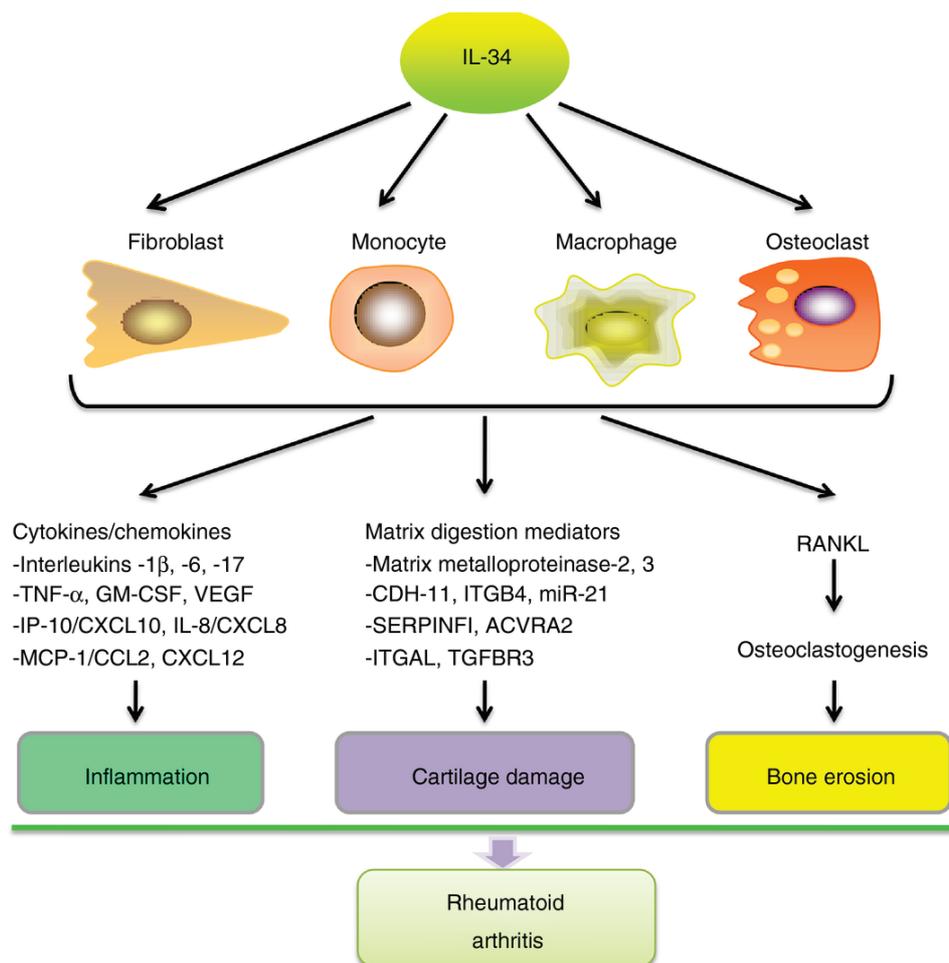


Figure 123: Rôle de l'IL-34 dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.

En induisant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines pro-inflammatoires et chimiokines) et de médiateurs pro-cataboliques (protéases matricielles, activation de l'ostéoclastogenèse) l'IL-34 exerce son activité biologique sur les atteintes du cartilage, l'érosion de l'os et l'inflammation chronique, caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde. D'après Zhou, R. P. et al. (2016).

A ce jour, rien n'est connu sur le rôle de l'IL-34 et de ses récepteurs dans l'arthrose, excepté une étude qui a démontré une augmentation de l'expression du récepteur PTP- ζ dans le cartilage et l'os sous-chondral des patients atteints d'arthrose modérée à sévère, parallèlement à l'augmentation des niveaux sériques de l'un de ses ligands, la pléiotrophine (Kaspiris, A. et al. 2013). L'expression de l'IL-34 dans le cartilage et son implication dans le processus arthrosique n'ont donc jamais été mises en évidence. Dans cette dernière partie de thèse, nous avons ainsi étudié la régulation de l'expression et de la synthèse de l'IL-34 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes murins et humains. Le rôle de cette cytokine dans l'induction de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines

et chimiokines), pro-angiogéniques et pro-cataboliques (protéases matricielles) a été évalué dans nos modèles de cultures primaires de chondrocytes et d'ostéoblastes.

3.2.3 Etude de la régulation et du rôle de l'IL-34 dans nos modèles *in vitro*

D'après l'analyse de l'étude microarray de notre modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes murins, les expressions d'IL-34 et de ses récepteurs CSF-1R et PTP- ζ sont fortement augmentées au cours de l'acquisition d'un phénotype hypertrophique (Fold Change de 8,8, 4,3 et 72 respectivement). Cependant, les résultats obtenus à partir d'une analyse microarray représentent des changements semi-quantitatifs de niveau d'expression qui nécessitent d'être validés par PCR quantitative.

3.2.3.1 Expression de l'IL-34 et de ses récepteurs au cours de la différenciation hypertrophiques des chondrocytes

3.2.3.1.1 Modèle murin

Nous avons validé par PCR quantitative, l'existence d'une induction significative de l'expression de l'IL-34 d'environ 5,5 fois dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux chondrocytes articulaires (Figure 124). Les expressions des gènes codant CSF-1R (Csf1r) et PTP- ζ (Ptpnz1) sont également augmentées respectivement de près de 15 fois et de plus de 200 fois. Leur expression basale est relativement faible dans les chondrocytes articulaires, comme le traduisent les valeurs de Ct (Cycle threshold) de PCR quantitative ; Ct_(IL34)=29,5, Ct_(Ptpnz1)=30,1 et Ct_(Csf1r)=33,8 (Tableau 23). Nous constatons également une augmentation significative de l'expression de ces gènes entre les chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques. Cependant, nous n'observons pas de différence significative pour l'expression d'IL-34 et de Csf1r entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, malgré une tendance à l'augmentation pour l'IL-34. En revanche, une induction de près de 6 fois est constatée pour l'expression de Ptpnz1 entre ces deux phénotypes.

Nous avons dosé la concentration d'IL-34 synthétisée par les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques dans les lysats cellulaires, qui comprennent les protéines intracellulaires et extracellulaires (membranaires et matricielles), et dans les surnageants de culture, obtenus à partir des milieux conditionnés récupérés après 24h d'incubation (Figure 125).

Comme pour son expression génique, la synthèse d'IL-34 est significativement augmentée au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes murins. En effet, la concentration d'IL-34 est en moyenne 6,5 fois supérieure dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques par rapport aux chondrocytes articulaires. Cependant, nous n'observons pas de différence significative dans la synthèse d'IL-34 entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

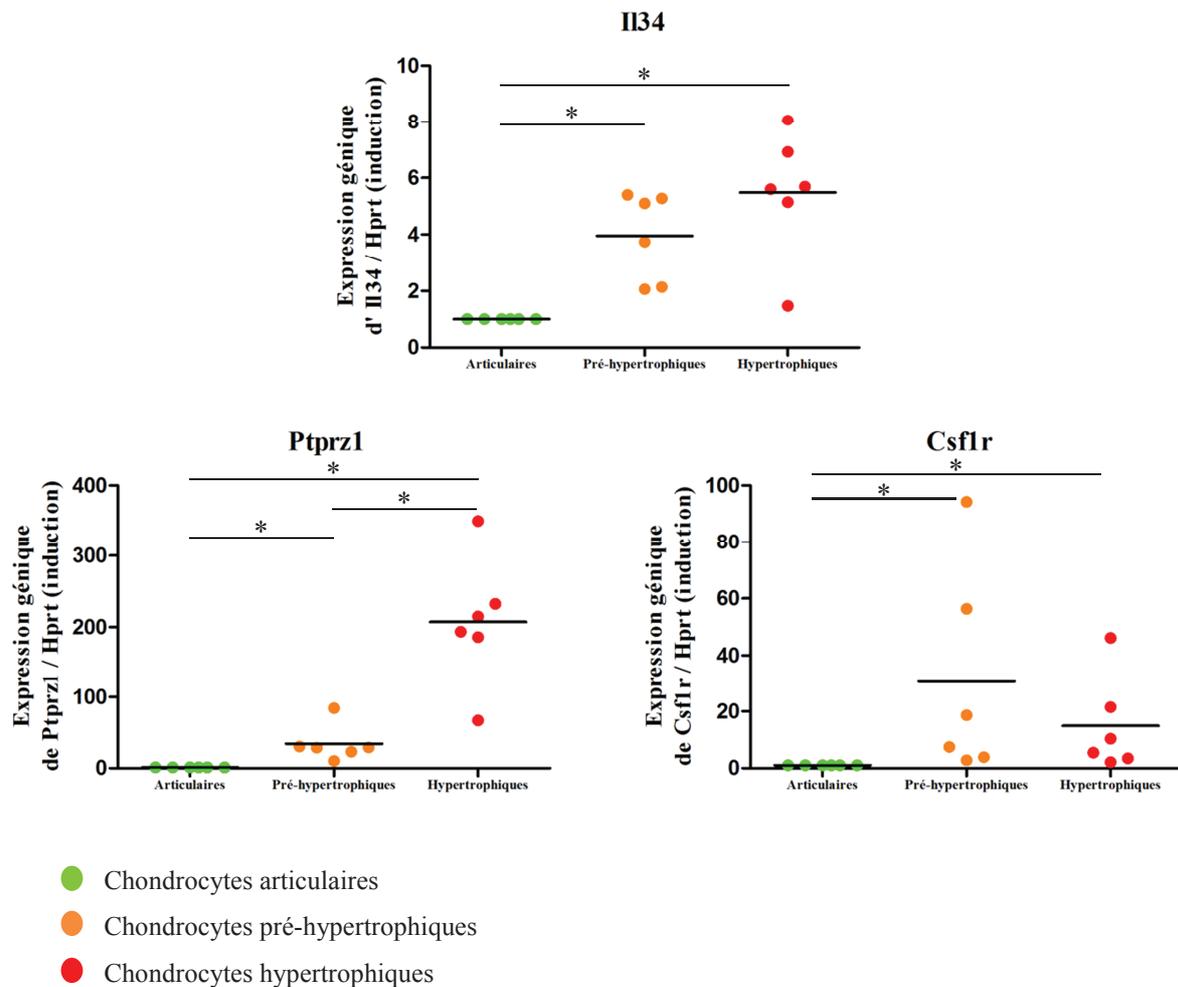


Figure 124: Expression des gènes codant l'IL-34 et ses récepteurs PTP- ζ et CSF-1R dans les chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes murins arrêtés à trois stades de différenciation, les chondrocytes articulaires (●), les chondrocytes pré-hypertrophiques (●) et les chondrocytes hypertrophiques (●). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport aux chondrocytes articulaires, dont l'expression basale est normalisée à 1. Le gène Hprt est le gène de référence de ces expériences. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

ARNm	Il34	Ptprz1	Csf1r
Ct articulaires	29,5	30,1	33,8

Tableau 23: Données des Ct (Cycle Threshold) moyens (n=6).

Ces valeurs correspondent au nombre de cycles de PCR quantitative à partir duquel l'expression des gènes est détectée dans les échantillons. Ces données permettent d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les chondrocytes articulaires, qui nous servent de condition contrôle, dont l'expression est normalisée à 1 dans cette étude.

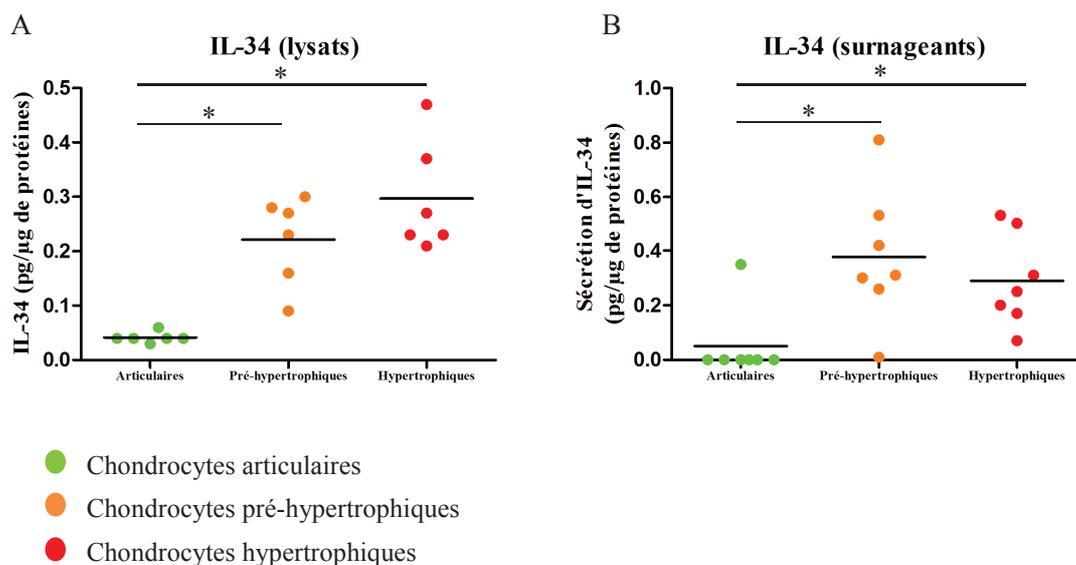


Figure 125: Synthèse d'IL-34 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes murins.

(A) Dosage par ELISA de la production d'IL-34 dans les lysats cellulaires, comprenant les compartiments intracellulaire, transmembranaire et la matrice extracellulaire. (B) Dosage par ELISA de la sécrétion d'IL-34 dans les surnageants de culture à partir des milieux conditionnés des chondrocytes récupérés après 24h d'incubation. La quantité d'IL-34 dosée (en pg) dans les lysats cellulaires et les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en μg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6 pour les lysats cellulaires et n=7 pour les surnageants). * p<0,05.

3.2.3.1.2 Modèle humain

Dans le modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains, il est intéressant de constater que nous retrouvons un profil d'expression de l'IL-34 similaire à celui observé dans les chondrocytes murins (Figure 126). En effet, nous notons une induction de l'expression de l'IL-34 d'environ 12 fois dans les chondrocytes cultivés en milieu de différenciation hypertrophique par rapport aux chondrocytes en condition basale ($Ct_{IL-34}=34,2$). De la même façon, nous observons une augmentation significative de l'expression

d'IL-34 de plus de 8 fois dans les chondrocytes cultivés en milieu de différenciation hypertrophique par rapport au milieu de différenciation chondrogénique. En revanche, les expressions des gènes codant les récepteurs CSF-1R et PTP- ζ n'ont pas été détectées par les couples d'amorces testés à ce jour.

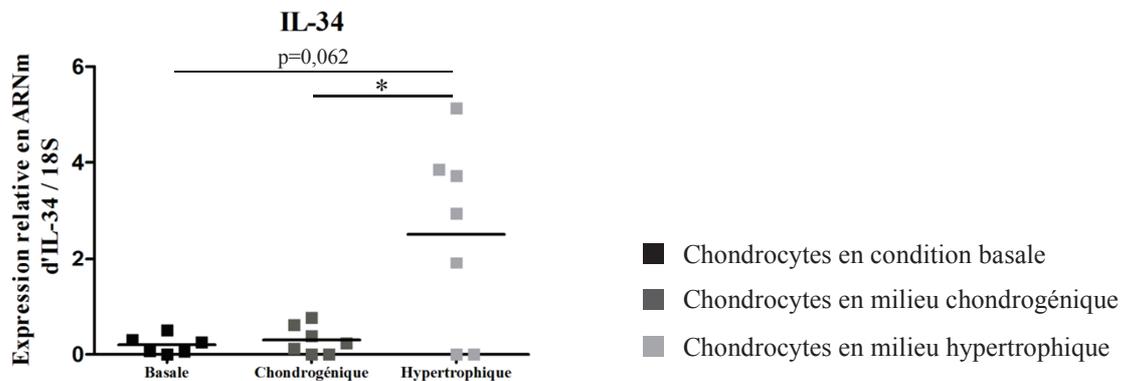


Figure 126: Expression du gène codant l'IL-34 au cours du processus de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains.

Les ARNm ont été extraits à partir des chondrocytes articulaires humains cultivés en culots, arrêtés à trois stades de culture. Tout d'abord au moment de la formation du culot cellulaire, reflétant l'expression génique d'IL-34 de chaque patient avant la mise en place du protocole de différenciation hypertrophique, soit la condition dite basale (■). Ces culots sont ensuite cultivés en milieu chondrogénique (■) pendant 6 semaines puis en milieu de différenciation hypertrophique (■) pendant 2 semaines supplémentaires. L'expression d'IL-34 est rapportée à l'expression du gène de référence 18S. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6 en condition basale, n=7 en milieu chondrogénique et hypertrophique). * p<0,05.

Nous avons dosé la concentration d'IL-34 synthétisée par les chondrocytes humains dans les lysats cellulaires et dans les surnageants de culture au cours de leur différenciation hypertrophique (Figure 127). Comme pour son expression génique, la synthèse d'IL-34 est significativement augmentée dans les chondrocytes humains cultivés en milieu de différenciation hypertrophique. Nous observons en moyenne une concentration d'IL-34 respectivement 17 fois et 29 fois supérieure dans les lysats cellulaires et les surnageants des chondrocytes cultivés en milieu de différenciation hypertrophique par rapport au milieu chondrogénique. Nous ne constatons en revanche aucune différence significative dans la synthèse d'IL-34 entre la condition basale et les chondrocytes différenciés en milieu chondrogénique.

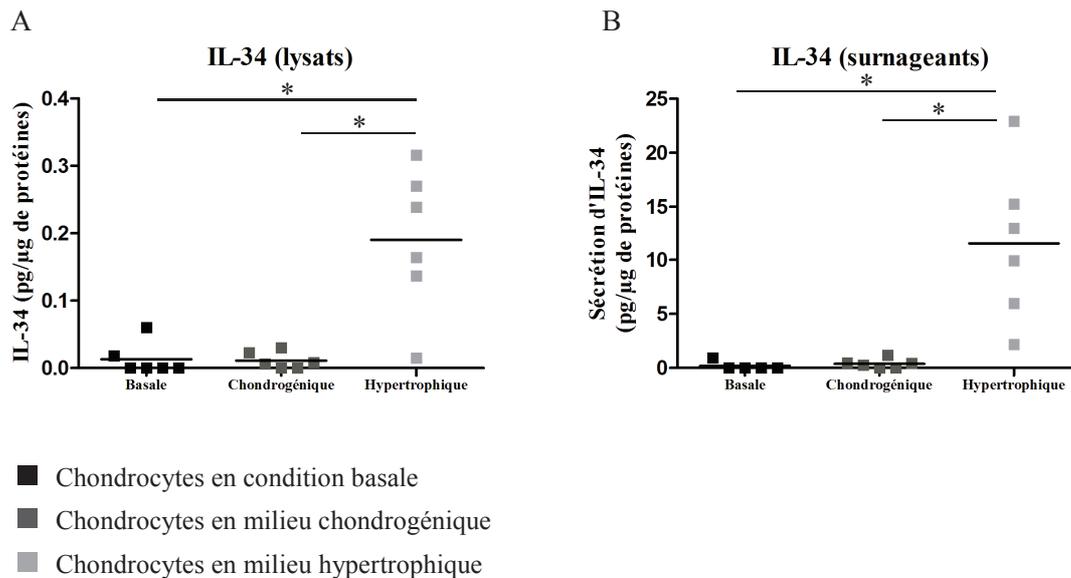


Figure 127: Synthèse d'IL-34 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes humains.

(A) Dosage par ELISA de la production d'IL-34 dans les lysats cellulaires, comprenant les compartiments intracellulaire, transmembranaire et la matrice extracellulaire du culot. (B) Dosage par ELISA de la sécrétion d'IL-34 dans les surnageants de culture à partir des milieux conditionnés des culots de chondrocytes récupérés après 24h d'incubation. La quantité d'IL-34 dosée (en pg) dans les lysats cellulaires et les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en μg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6). * p<0,05.

Au cours du processus de différenciation hypertrophique, les chondrocytes de notre modèle murin expriment davantage l'IL-34 et ses récepteurs. Les résultats issus de l'analyse microarray sont donc confirmés ici par PCR quantitative. Ces chondrocytes sécrètent également davantage d'IL-34 dans leurs milieux conditionnés et leurs matrices extracellulaires.

De manière intéressante, nous confirmons nos résultats dans le modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes humains, avec une expression et une synthèse d'IL-34 significativement augmentées dans les chondrocytes cultivés en milieu de différenciation hypertrophique.

Ce travail démontre donc pour la première fois une production d'IL-34 par des chondrocytes. L'expression et la synthèse de cette cytokine seraient ainsi induites au cours du processus de différenciation hypertrophique des chondrocytes murins et humains. Au vu de ces résultats, nous avons suggéré un rôle potentiel de l'IL-34 dans le remodelage du cartilage et de l'os sous-chondral. En effet, la proximité de ce dernier avec les chondrocytes

hypertrophiques, sécrétant abondamment cette cytokine, conduit à penser que l'IL-34 pourrait jouer un rôle dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale au cours du processus arthrosique. Dans ce but, nous avons évalué l'induction de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, pro-angiogéniques et pro-cataboliques dans des chondrocytes et des ostéoblastes murins en réponse à l'IL-34.

3.2.3.2 Réponses cellulaires des chondrocytes et des ostéoblastes murins à l'IL-34 murine recombinante

3.2.3.2.1 Chondrocytes articulaires

Nous avons tout d'abord étudié la réponse des chondrocytes articulaires à des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante, après 24h de stimulation. Les gènes cibles de l'IL-34 étudiés dans ces expériences ont été sélectionnés à partir de travaux décrits dans d'autres types cellulaires, tels que les fibroblastes, les monocytes, les synoviocytes et les ostéoclastes (Figure 123). Nous avons donc évalué l'induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines ; les interleukines IL-6 et IL-8, la monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) et le C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL-12), une protéase matricielle ; la matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), un facteur anti-angiogénique du cartilage ; le pigment epithelium-derived factor (PEDF) et un facteur d'ostéoclastogenèse ; le receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL). Malgré l'absence de lien connu entre l'IL-34 et la matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), nous avons également étudié l'induction de son expression dans les chondrocytes articulaires en réponse à l'IL-34. En effet, cette protéase matricielle a été largement décrite pour son implication dans la dégradation du cartilage et plus généralement dans la progression du processus arthrosique (Reboul, P. et al. 1996).

En réponse à des doses croissantes d'IL-34 (3, 30 et 100 ng/mL) pendant 24h, nous constatons que les chondrocytes articulaires ne présentent aucune variation significative de l'expression des gènes cibles étudiés. Seules les expressions des gènes codant la MCP-1, MMP-3 et MMP-13 sont représentées (Figure 128). De la même façon, nous n'observons pas de différence significative dans la production de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 évaluée par ELISA dans les surnageants des chondrocytes articulaires stimulés aux différentes doses d'IL-34 (Figure 129).

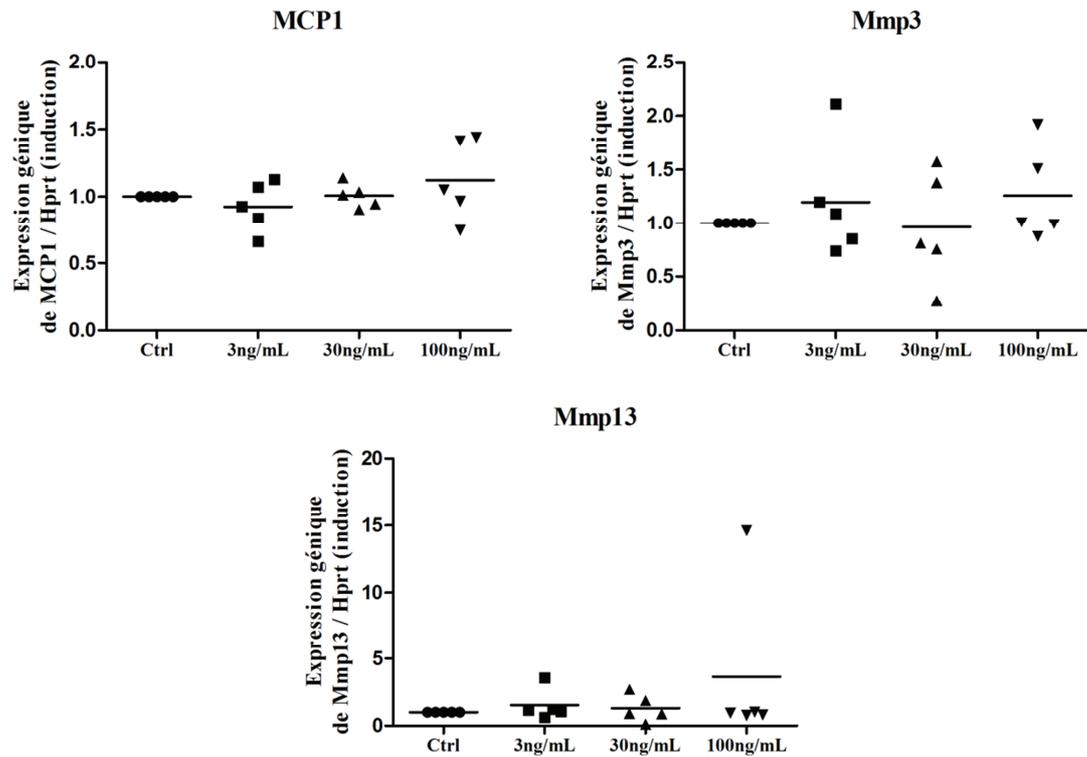


Figure 128: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expression des gènes codant la monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), la matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) et la matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) dans les chondrocytes articulaires.

Des chondrocytes articulaires murins ont été stimulés pendant 24h par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport à la condition contrôle sans IL-34 (Ctrl ●), dont l'expression basale est normalisée à 1. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=5).

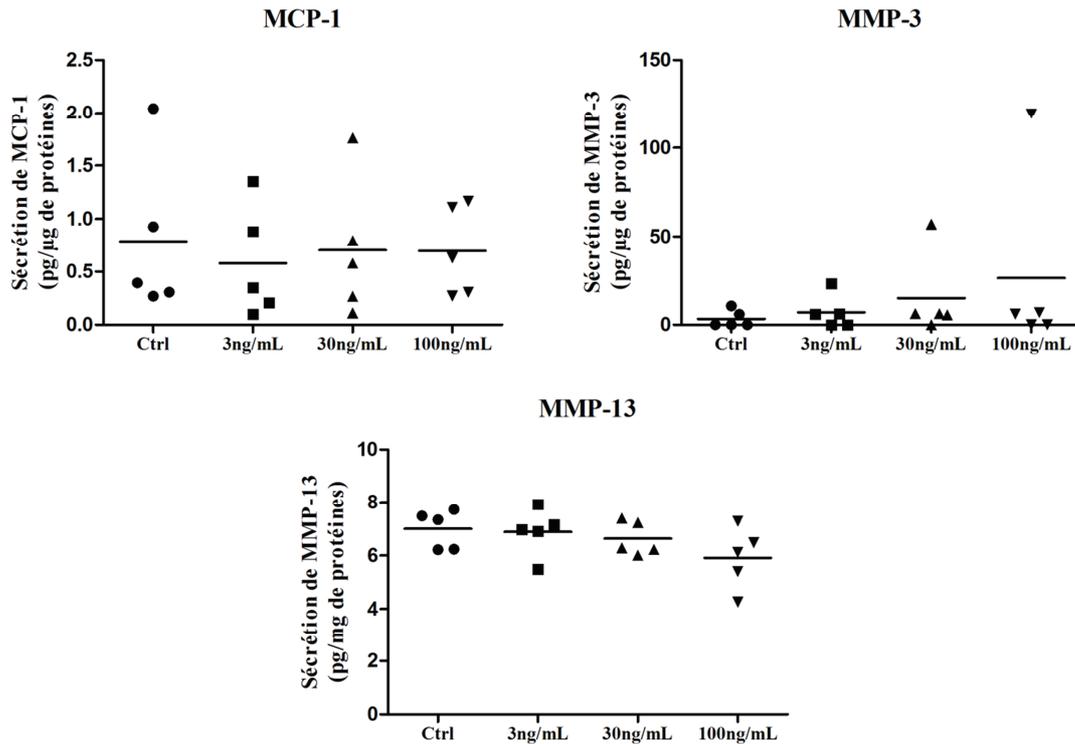


Figure 129: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des chondrocytes articulaires.

Dosage par ELISA de la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les surnageants de culture obtenus à partir des milieux conditionnés de chondrocytes articulaires après 24h de stimulation par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (0 (●), 3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). La quantité de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dosée (en pg) dans les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en μg ou mg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=5).

Finalement, les chondrocytes articulaires ne semblent pas répondre à la stimulation par l'IL-34, quelle que soit la dose utilisée. Nous n'observons pas d'induction de l'expression ni de la synthèse des facteurs cibles étudiés.

3.2.3.2.2 Chondrocytes pré-hypertrophiques

Nous avons ensuite analysé la réponse des chondrocytes pré-hypertrophiques aux doses croissantes d'IL-34. Pour ce faire, nous avons évalué l'induction de l'expression des gènes codant les molécules suivantes : IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, CXCL-12, MMP-3, MMP-13, RANKL, CSF-1R et PTP- ζ . Comme précédemment observé dans les chondrocytes articulaires, les chondrocytes pré-hypertrophiques ne présentent pas de variation significative de l'expression des gènes cibles ni de la production de MCP-1, MMP-3 et -13 en réponse à l'IL-34 à 3, 30 ou 100 ng/mL. Seules l'expression génique (Figure 130) et la sécrétion (Figure 131) de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 sont représentées.

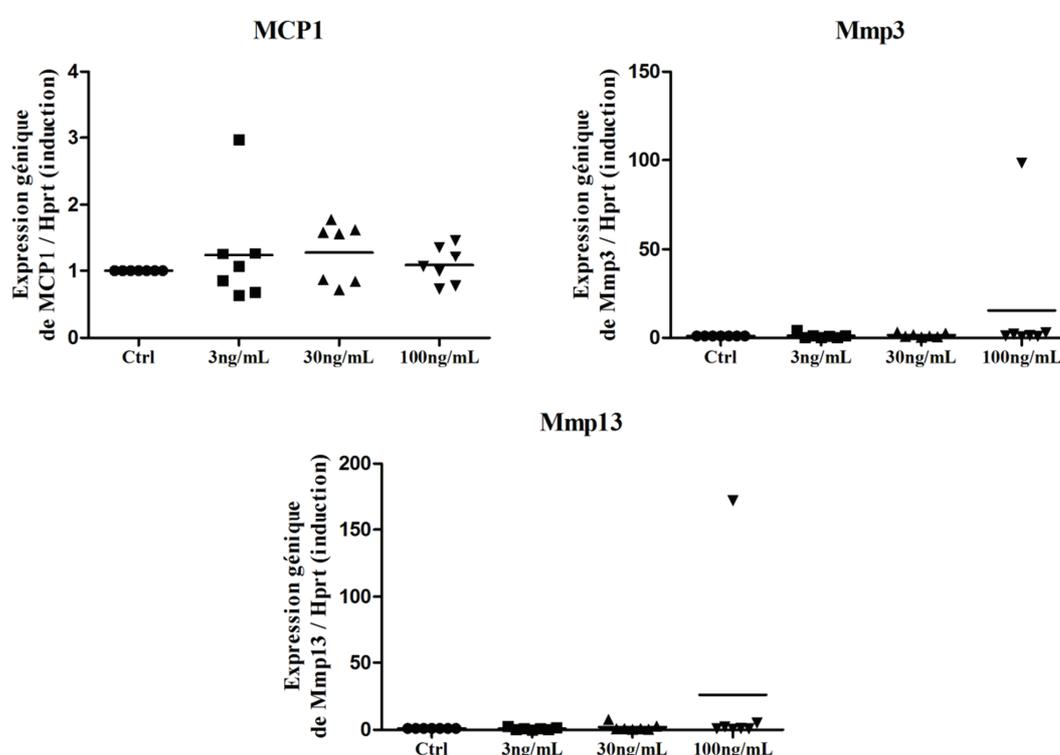


Figure 130: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expression de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes pré-hypertrophiques.

Des chondrocytes pré-hypertrophiques murins ont été stimulés pendant 24h par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport à la condition contrôle sans IL-34 (Ctrl ●), dont l'expression basale est normalisée à 1. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=7).

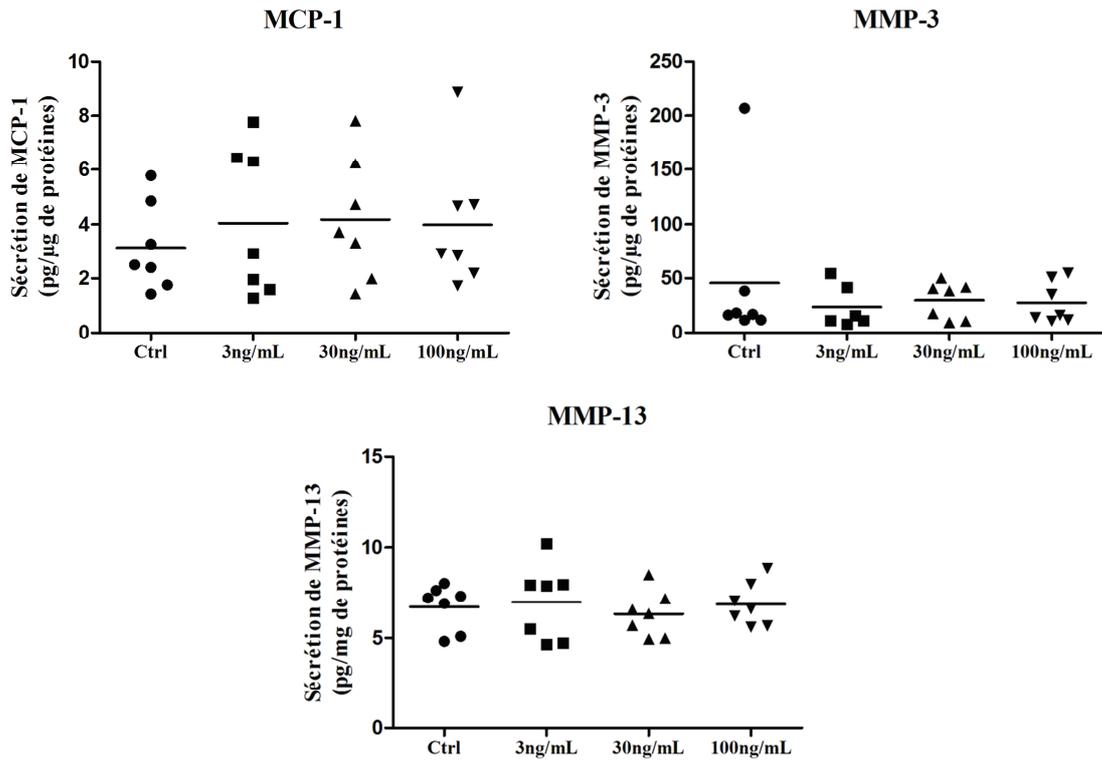


Figure 131: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des chondrocytes pré-hypertrophiques.

Dosage par ELISA de la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les surnageants de culture obtenus à partir des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques après 24h de stimulation par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (0 (●), 3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). La quantité de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dosée (en pg) dans les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en μg ou mg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=7).

En définitive, les chondrocytes pré-hypertrophiques, comme les articulaires, ne semblent pas répondre à la stimulation par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante.

3.2.3.2.3 Chondrocytes hypertrophiques

Enfin, nous avons évalué la réponse des chondrocytes hypertrophiques aux doses croissantes d'IL-34 en étudiant l'induction de l'expression des gènes codant les molécules suivantes : IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, CXCL-12, MMP-3, MMP-9, MMP-13, RANKL (Tnfsf11), CSF-1R et PTP- ζ (Figure 132). Aucune corrélation n'est connue actuellement entre l'IL-34 et la MMP-9. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation de cette protéase, qui est décrite pour son implication dans le remodelage de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose, en favorisant l'invasion vasculaire du cartilage non calcifié (Galasso, O. et al. 2012).

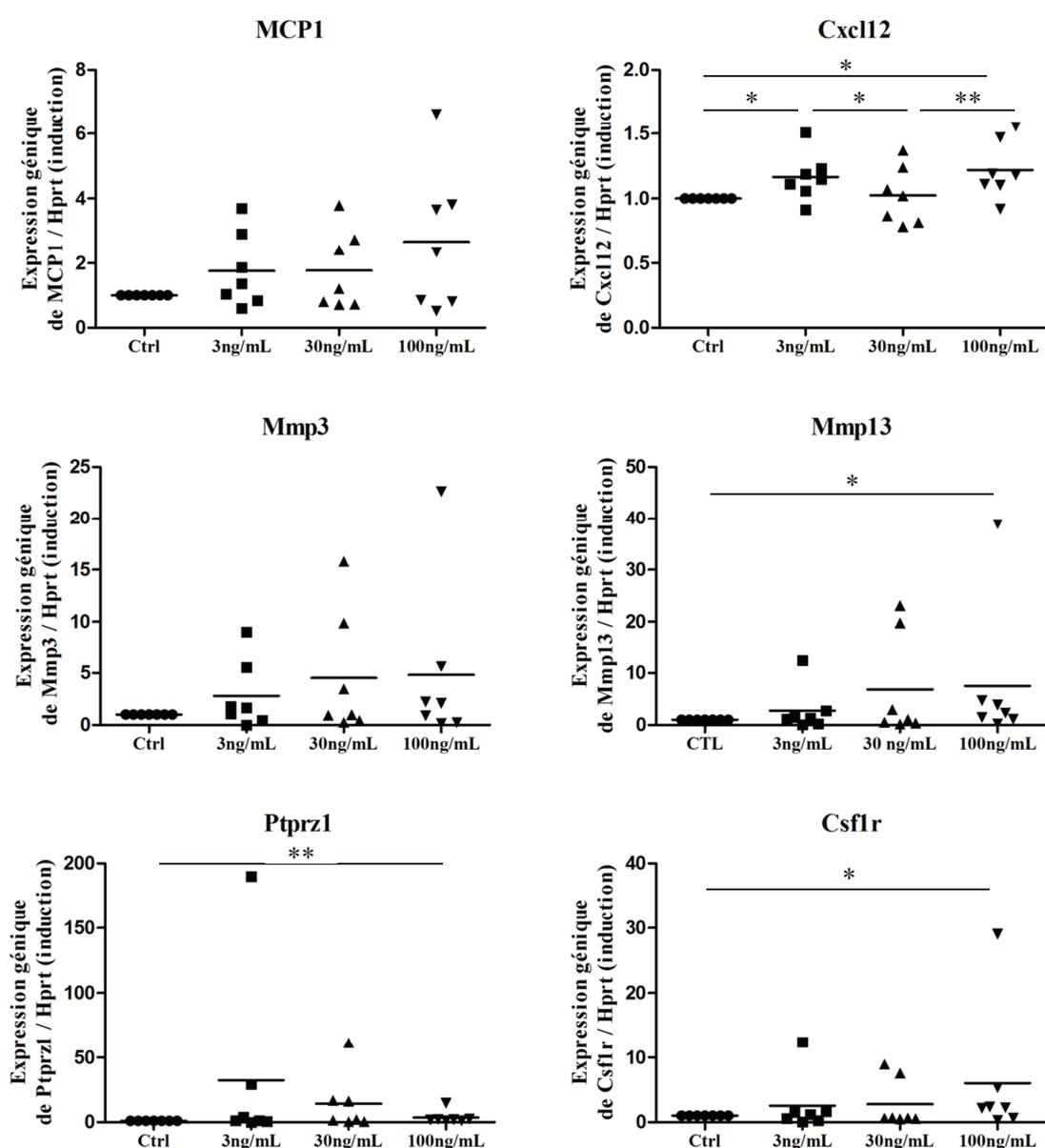


Figure 132: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expression de gènes cibles dans les chondrocytes hypertrophiques.

Des chondrocytes hypertrophiques murins ont été stimulés pendant 24h par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport à la condition contrôle sans IL-34 (Ctrl ●), dont l'expression basale est normalisée à 1. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=7).

En réponse à la dose maximale d'IL-34, les chondrocytes hypertrophiques modulent l'expression de chimiokines et de protéases matricielles. Nous constatons une tendance à l'augmentation de 2,7 fois pour MCP1 et de 1,2 fois pour Cxcl12, par rapport à la condition contrôle. De la même façon, nous observons une tendance à l'augmentation de l'expression de Mmp3 d'environ 5 fois et une augmentation significative de l'expression de Mmp13 d'environ 7,5 fois en réponse à la dose maximale d'IL-34. En revanche, Mmp9 n'est pas exprimée dans ces chondrocytes hypertrophiques, ni en condition contrôle, ni en présence d'IL-34. Enfin, puisque les chondrocytes hypertrophiques semblent capables d'induire une réponse cellulaire à l'IL-34, nous nous sommes intéressés à la boucle de régulation de ses récepteurs. Nous avons ainsi observé une augmentation significative de l'expression de Ptprz1 d'environ 4 fois et de Csf1r d'environ 6 fois, en réponse à 100 ng/mL d'IL-34. Les autres gènes cibles étudiés (Il6, Il8, Tnfa et Tnfsf11) ne sont pas induits en réponse à l'IL-34 dans les chondrocytes hypertrophiques.

La sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 a ensuite été évaluée par ELISA dans les milieux conditionnés de ces chondrocytes hypertrophiques (Figure 133). Nous avons ainsi mis en évidence une faible production de MCP-1 et de MMP-13 en réponse à l'IL-34. La sécrétion de MCP-1 est augmentée de 1,8 fois en réponse à la dose minimale de 3 ng/mL d'IL-34 et de 2,7 fois en réponse à 100 ng/mL, par rapport à la situation contrôle. De même, la sécrétion de MMP-13 est augmentée de 1,2 fois en réponse à 30 ng/mL d'IL-34. A l'inverse, comme pour son expression génique, nous n'observons pas de différence significative de la sécrétion de MMP-3.

Finalement, contrairement aux chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques, les chondrocytes hypertrophiques sont capables de répondre à une stimulation par l'IL-34 en favorisant notamment l'expression de chimiokines ; MCP-1 et CXCL-12, de protéases matricielles, majoritairement MMP-13 et en augmentant la sécrétion de MCP-1 et de MMP-13. L'IL-34 est également capable d'amplifier son action biologique en augmentant l'expression de ses propres récepteurs dans les chondrocytes hypertrophiques.

Dans notre modèle *in vitro* de chondrocytes murins, l'IL-34 est donc capable d'induire des réponses pro-inflammatoires et pro-cataboliques dans les chondrocytes hypertrophiques exclusivement.

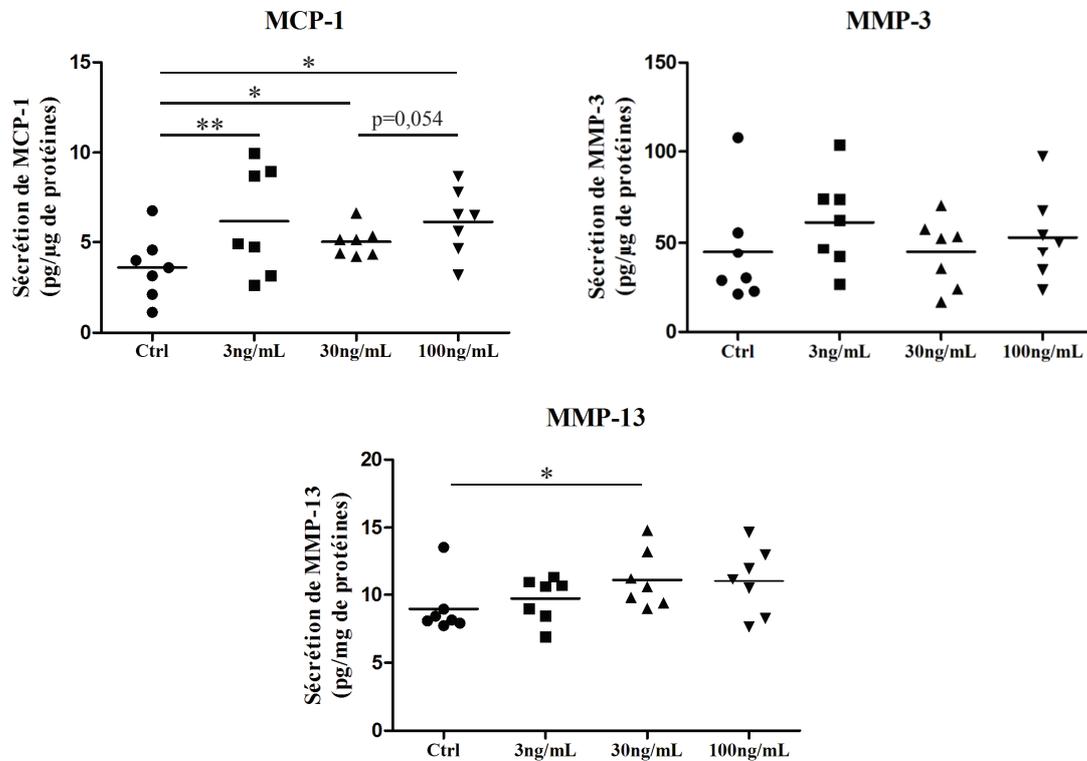


Figure 133: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des chondrocytes hypertrophiques.

Dosage par ELISA de la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les surnageants de culture obtenus à partir des milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques après 24h de stimulation par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (0 (●), 3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). La quantité de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dosée (en pg) dans les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en μg ou mg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=7).

3.2.3.2.4 Ostéoblastes

Il nous est apparu essentiel d'étudier le potentiel rôle de l'IL-34 sur les ostéoblastes. Dans l'articulation, ces derniers sont physiologiquement présents à proximité des chondrocytes hypertrophiques, que nous avons montrés être une source sécrétrice d'IL-34. Nous avons donc évalué la réponse des ostéoblastes aux doses croissantes d'IL-34 murine recombinante en étudiant l'induction de l'expression des gènes codant les molécules suivantes : IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, CXCL-12, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, RANKL (Tnfsf11), VEGF, PEDF, CSF-1R et PTP- ζ (Figure 134). Nous avons constaté un effet de l'IL-34 dès la dose minimale (3 ng/mL) par une augmentation significative de l'expression de Mmp3, Mmp9 et Mmp13, respectivement de 16 fois, de 12,5 fois et de 22 fois par rapport à la condition contrôle. Une induction significative de l'expression de Tnfa, d'environ 20,6 fois, a également été observée en réponse à 3 ng/mL d'IL-34. Les expressions de MCP1, Vegf et Il8 (non représentée ici), impliquées dans la régulation de l'angiogenèse et de l'inflammation, sont augmentées significativement en réponse à la stimulation par l'IL-34. A l'inverse, un facteur anti-angiogénique, le PEDF, a une expression significativement diminuée. Le gène Tnfsf11 codant le facteur d'ostéoclastogenèse RANKL a quant à lui une expression significativement augmentée d'en moyenne 3,5 fois par rapport à la situation contrôle. Enfin, une tendance à l'augmentation de l'expression de Csf1r d'environ 37 fois et de Ptpz1 d'environ 2,5 fois, a été observée en réponse à 3 ng/mL d'IL-34. En revanche, à forte dose (100 ng/mL), l'expression de Ptpz1 est significativement diminuée par 2. Les autres gènes cibles étudiés (Il6, Cxcl12 et Mmp2) ne sont pas induits en réponse à l'IL-34 dans les ostéoblastes.

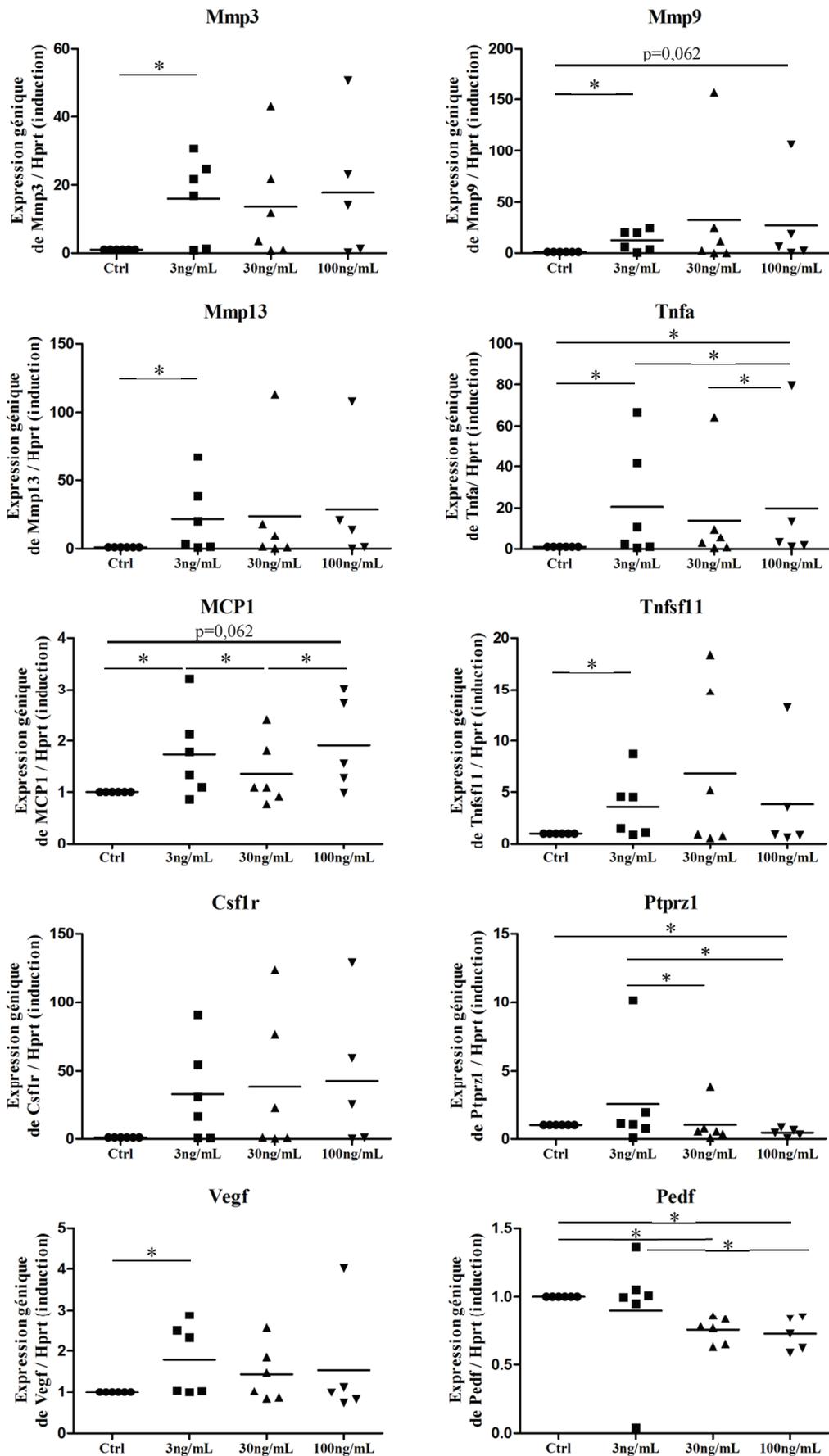


Figure 134: Effets-dose de l'IL-34 sur l'expression de gènes cibles dans les ostéoblastes.

Des ostéoblastes murins ont été stimulés pendant 24h par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression (Fold Change) par rapport à la condition contrôle sans IL-34 (Ctrl ●), dont l'expression basale est normalisée à 1. Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6 pour la condition contrôle et les doses 3 et 30 ng/mL d'IL-34, n=5 pour la dose 100 ng/mL d'IL-34).

La sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 a ensuite été évaluée par ELISA dans les milieux conditionnés de ces ostéoblastes (Figure 135). Nous notons que leurs productions sont significativement amplifiées en réponse à l'IL-34, de façon doses dépendantes. Nous avons dosé une sécrétion 2,8 fois supérieure pour MCP-1, 2,2 fois pour MMP-3 et 1,5 fois pour MMP-13 en réponse à la dose maximale d'IL-34, par rapport à la condition contrôle.

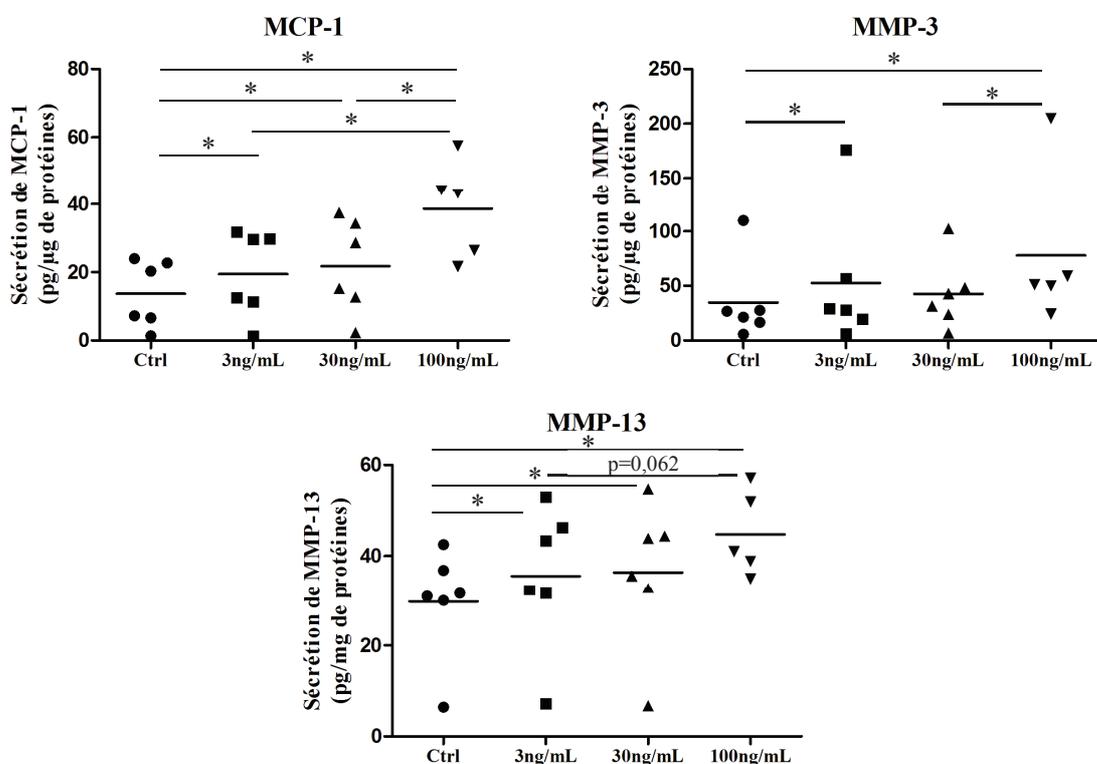


Figure 135: Effets-dose de l'IL-34 sur la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les milieux conditionnés des ostéoblastes.

Dosage par ELISA de la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dans les surnageants de culture obtenus à partir des milieux conditionnés d'ostéoblastes après 24h de stimulation par des doses croissantes d'IL-34 murine recombinante (0 (●), 3 (■), 30 (▲) et 100 (▼) ng/mL). La quantité de MCP-1, MMP-3 et MMP-13 dosée (en pg) dans les surnageants a été rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (en μg ou mg). Les résultats sont représentés en nuage de points avec la moyenne des données (n=6 pour la condition contrôle et les doses 3 et 30 ng/mL d'IL-34, n=5 pour la dose 100 ng/mL d'IL-34).

En définitive, les ostéoblastes induisent une réponse cellulaire notable suite à leur stimulation par l'IL-34 en favorisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de facteurs pro-angiogéniques (TNF- α , MCP-1, IL-8 et VEGF), mais aussi en augmentant l'expression de protéases matricielles (MMP-3, MMP-9 et MMP-13) et d'un facteur d'ostéoclastogenèse (RANKL). A l'inverse, l'expression d'un facteur anti-angiogénique, le PEDF, est significativement diminuée en réponse à l'IL-34. De la même façon que dans les chondrocytes hypertrophiques, l'IL-34 présente à de faibles doses est capable d'amplifier l'expression de ses récepteurs CSF-1R et PTP- ζ dans les ostéoblastes. A forte dose, nous observons en revanche une régulation négative de l'expression du récepteur PTP- ζ . A l'échelle protéique, nous avons montré que l'IL-34 favorisait la sécrétion de MCP-1, MMP-3 et MMP-13.

Dans ce modèle *in vitro* d'ostéoblastes murins, l'IL-34 est donc capable d'induire des réponses pro-inflammatoires, pro-angiogéniques et pro-cataboliques. L'augmentation de l'expression de RANKL évoque également une potentielle activation du processus d'ostéoclastogenèse. Grâce à cette étude, nous pouvons ainsi suggérer un rôle de l'IL-34 dans le remodelage pathologique du cartilage et de l'os sous-chondral au cours du processus arthrosique.

3.2.4 Présence des récepteurs de l'IL-34 dans les tissus arthrosiques humains

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'expression des récepteurs de l'IL-34 dans des tissus articulaires de patients arthrosiques, ayant subi une arthroplastie totale de genou. Dans ce but, nous avons étudié par immunohistochimie la présence des récepteurs CSF-1R et PTP- ζ sur des coupes histologiques comprenant le cartilage et l'os sous-chondral de patients OA.

Ces immunomarquages nous révèlent une présence très marquée du récepteur CSF-1R à la jonction ostéochondrale dans les chenaux vasculaires, qui comportent des cellules endothéliales, des cellules mononucléaires sanguines, des ostéoblastes et des ostéoclastes (Figure 136A-C-E). Un marquage important est également visualisé dans les vaisseaux de l'os sous-chondral, les ostéocytes, les ostéoblastes bordant les travées osseuses (Figure 136C) et les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse (non visualisées). Notons l'existence d'un marquage CSF-1R plus rare dans le cartilage arthrosique. En effet, un nombre limité de chondrocytes positifs pour le marquage CSF-1R est observé dans les couches profondes du cartilage articulaire (Figure 136A).

De la même façon, nous avons pu constater la présence du récepteur PTP- ζ à la jonction ostéochondrale, dans les chenaux vasculaires, les vaisseaux de l'os, les ostéocytes, les ostéoblastes et les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse (Figure 137C-E). Contrairement au CSF-1R, le récepteur PTP- ζ semble être observé plus régulièrement dans les chondrocytes du cartilage articulaire arthrosique, et notamment dans les clusters qui contiennent des chondrocytes hypertrophiques (Figure 137A). D'ailleurs, rappelons que l'expression de PTP- ζ dans le modèle murin est davantage induite que celle de CSF-1R avec la différenciation hypertrophique.

Néanmoins, notons que les immunomarquages positifs pour ces récepteurs sont bien plus rares dans le cartilage que dans l'os sous-chondral. Malgré la mise en évidence de la présence des récepteurs CSF-1R et PTP- ζ dans les tissus articulaires arthrosiques, des études complémentaires s'avèrent nécessaires afin d'affiner l'étude de l'expression de ces récepteurs dans chacun des tissus de l'articulation OA en fonction du stade de progression de la pathologie.

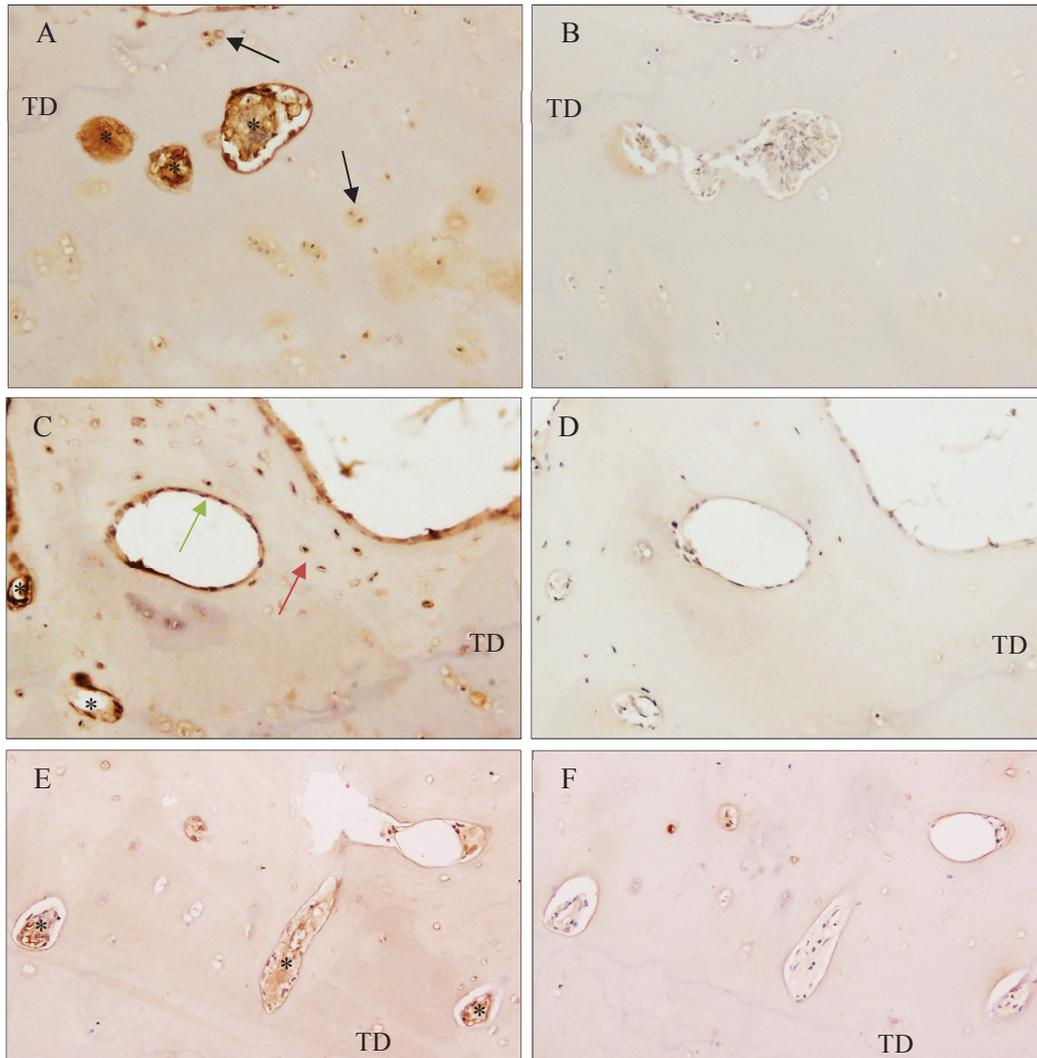


Figure 136: Expression de CSF-1R détectée par immunohistochimie sur des coupes d'articulations arthrosiques.

Photographies représentatives des observations réalisées sur les coupes de tissus provenant de 6 patients OA. (A) Marquage de CSF-1R dans des chondrocytes (flèches noires) des couches profondes du cartilage articulaire et calcifié, à proximité de la tidemark (TD). Un marquage dans les chenaux vasculaires (*) est également constaté. (C) Marquage de CSF-1R observé dans les ostéocytes (flèche rouge), les ostéoblastes (flèche verte) bordant les travées osseuses et dans les vaisseaux (*) de l'os sous-chondral. (E) Marquage de CSF-1R dans les chenaux vasculaires (*) atteignant la tidemark dans les couches profondes du cartilage. (B-D-F) Marquages négatifs de l'IgG isotype.

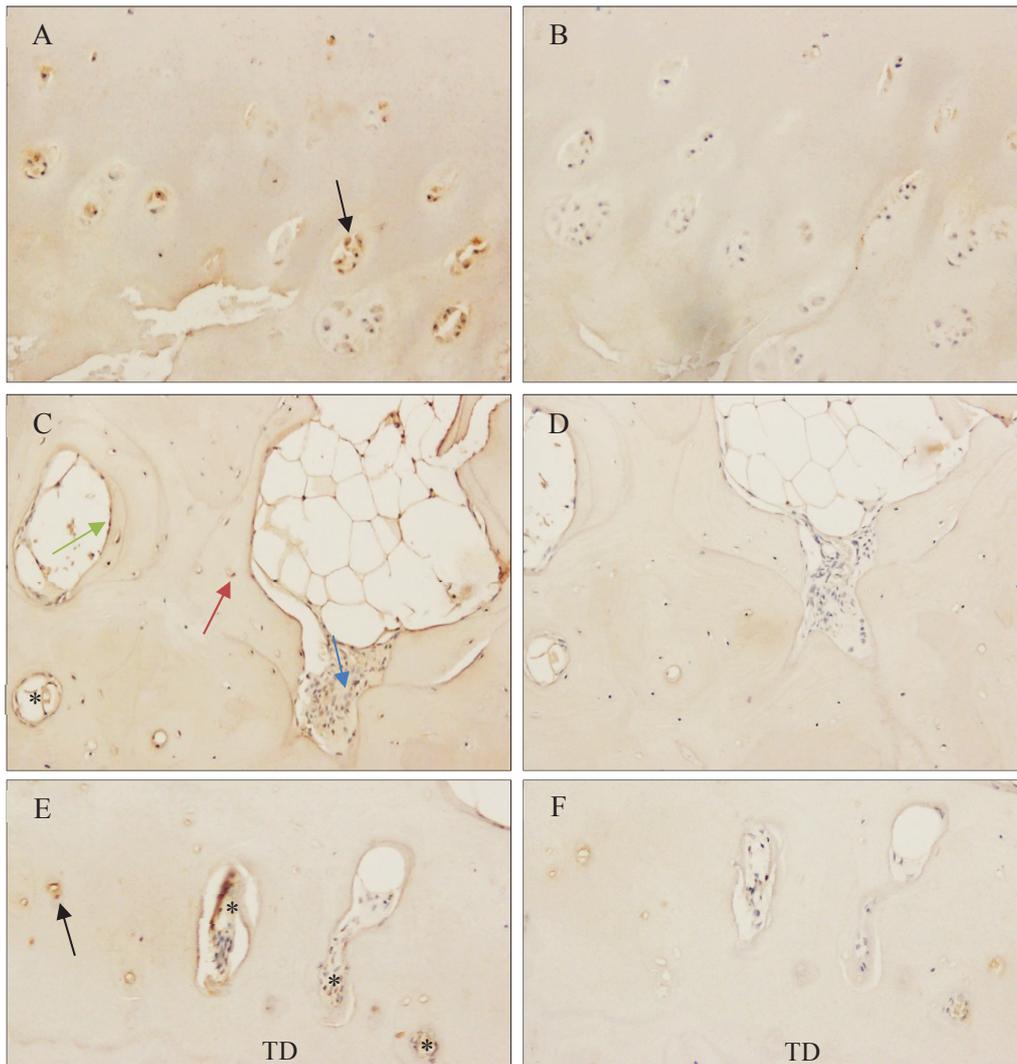


Figure 137: Expression de PTP- ζ détectée par immunohistochimie sur des coupes d'articulations arthrosiques.

Photographies représentatives des observations réalisées sur les coupes de tissus provenant de 3 patients OA. (A) Marquage de PTP- ζ dans les clusters de chondrocytes (flèche noire) en surface du cartilage articulaire. (C) Marquage de PTP- ζ observé dans les ostéocytes (flèche rouge), les ostéoblastes (flèche verte), les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse (flèche bleue) et les vaisseaux (*) de l'os sous-chondral. (E) Marquage de PTP- ζ dans les chondrocytes (flèche noire) des couches profondes du cartilage et les chenaux vasculaires (*) atteignant la tidemark. (B-D-F) Marquages négatifs de l'IgG isotype.

3.2.5 Conclusions et discussion

Par ces travaux, nous avons démontré pour la première fois la capacité des chondrocytes murins et humains à produire de l'IL-34 au cours de leur différenciation hypertrophique. Nous avons également mis en évidence l'expression des récepteurs CSF-1R et PTP- ζ dans nos modèles *in vitro* de chondrocytes et d'ostéoblastes murins, dont les expressions étaient jusqu'ici très peu décrites dans ces types cellulaires (Wittrant, Y. et al. 2009, Kaspiris, A. et al. 2013, Zhou, R. P. et al. 2016). Enfin, l'action biologique de l'IL-34 n'avait jamais été étudiée dans les chondrocytes et les ostéoblastes. Nous avons pu mettre en évidence une induction de l'expression de protéases matricielles (MMP-3, MMP-9, MMP-13), de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α , MCP-1, CXCL-12), d'un facteur pro-angiogénique (VEGF) et d'un facteur activant l'ostéoclastogenèse (RANKL) dans les ostéoblastes murins et dans une moindre mesure dans les chondrocytes hypertrophiques, en réponse à une stimulation par l'IL-34 murine recombinante. Nous pouvons ainsi suggérer un rôle autocrine de l'IL-34 sur les chondrocytes hypertrophiques et paracrine sur les ostéoblastes.

L'absence de réponse cellulaire des chondrocytes articulaires de notre modèle à l'IL-34 recombinante était peu surprenante d'après les niveaux d'expression très faibles des récepteurs de l'IL-34 en PCR quantitative ($Ct_{(Ptpz1)}=30,1$ et $Ct_{(Csf1r)}=33,8$). De la même façon, la réponse induite par l'IL-34 dans les chondrocytes hypertrophiques, inférieure à celle des ostéoblastes, pourrait être expliquée par les niveaux d'expression des récepteurs CSF-1R et PTP- ζ plus faibles ($Ct_{(Csf1r)} \text{ hypertrophiques} = 27,5$ vs. $Ct_{(Csf1r)} \text{ ostéoblastes} = 25,8$ et $Ct_{(Ptpz1)} \text{ hypertrophiques} = 25,8$ vs. $Ct_{(Ptpz1)} \text{ ostéoblastes} = 23,7$) pour une même quantité d'ARN reverse transcrit et une expression du gène de référence Hprt similaire.

Il serait intéressant de valider ces résultats dans le modèle *in vitro* de chondrocytes humains. Malgré l'absence de détection par qPCR de l'expression des récepteurs CSF-1R et PTP- ζ , nous avons pu montrer leur présence par immunohistochimie dans le cartilage et l'os sous-chondral de patients OA. En effet, les ostéoblastes, les ostéocytes et les chondrocytes hypertrophiques, observés dans les clusters en surface du cartilage articulaire et dans les couches les plus profondes, expriment ces récepteurs. De manière intéressante, nous avons également mis en évidence la présence de ces récepteurs dans les chenaux vasculaires, présents à la jonction ostéochondrale, dans les vaisseaux de l'os sous-chondral et dans la moelle osseuse comportant les cellules souches hématopoïétiques.

Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence les cellules cibles de l'IL-34 dans l'articulation arthrosique et d'évaluer les réponses cellulaires induites par cette interleukine dans les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes murins.

3.2.5.1 Inflammation de la membrane synoviale

Nous pouvons nous interroger sur le rôle de l'inflammation de la membrane synoviale dans l'action de l'IL-34 au cours de l'OA. Les connaissances actuelles nous démontrent qu'au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR), la membrane synoviale sécrète de l'IL-34, qui manifeste d'importants effets autocrines en induisant l'expression de cytokines, de chimiokines et de MMP par ses cellules cibles présentes dans la membrane synoviale; les synoviocytes (macrophages, fibroblastes) et les cellules endothéliales (Hwang, S. J. et al. 2012). La membrane synoviale devient alors une source majeure de cytokines, telles que le TNF- α ou l'IL-1 β , qui pourraient contribuer à l'activation ostéoclastique en amplifiant l'expression de CSF-1 dans les chondrocytes (Campbell, I. K. et al. 1993) et l'expression de CSF-1 et d'IL-34 dans les synoviocytes fibroblastiques (Hwang, S. J. et al. 2012, Chemel, M. et al. 2012) et les ostéoblastes (Eda, H. et al. 2011). Ces études ont suggéré que l'IL-34 pourrait être un effecteur à travers lequel le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-17 exerceraient leurs effets pro-inflammatoires. Les gènes cibles activés, tels que ceux codant l'IL-6, l'IL-8 et MMP-3, sont impliqués dans le maintien de la synovite et l'activation d'un phénotype pro-catabolique des chondrocytes. Une telle implication de la membrane synoviale dans l'amplification de l'activité biologique de l'IL-34 reste à démontrer au cours de l'OA. Néanmoins des arguments vont en faveur de cette hypothèse car, comme dans la PR, l'IL-34 est sécrétée par la membrane synoviale. Cette interleukine est dosée dans les liquides synoviaux (100 pg/mL) (Chemel, M. et al. 2012) et les sérums (40 pg/mL) (Moon, S. J. et al. 2013) de patients arthrosiques. Ces niveaux d'IL-34 sont d'ailleurs positivement corrélés aux niveaux d'IL-6 dans le sérum de ces patients OA et PR (Moon, S. J. et al. 2013). Notre étude suggère que l'IL-34 sécrétée par les chondrocytes hypertrophiques en surface du cartilage, au niveau des clusters, pourrait agir sur les cellules de la membrane synoviale et promouvoir l'inflammation. Il est d'ailleurs décrit qu'une inflammation synoviale est toujours observée en regard de la dégradation du cartilage (Lindblad, S. & Hedfors, E. 1987).

3.2.5.2 Rôle de l'IL-34 dans la physiopathologie de l'arthrose

D'après les données de la littérature, nos résultats suggèrent que l'IL-34 produite au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes favoriserait le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale par divers mécanismes (Figure 138); en établissant un environnement favorable à la dégradation de la MEC du cartilage et de l'os sous-chondral (MMP-3, MMP-9, MMP-13) et en activant l'angiogenèse par la prolifération des cellules endothéliales (VEGF) (Ségaliny, A. I. et al. 2015b). Enfin, l'IL-34 favoriserait l'ostéoclastogenèse en induisant l'expression de RANKL par les ostéoblastes et en activant la différenciation des cellules myéloïdes de la moelle osseuse et des monocytes circulants en ostéoclastes (Toh, M. L. et al. 2014). En induisant l'expression de MCP-1 et CXCL-12, l'IL-34 promouvrait l'angiogenèse, le recrutement de progéniteurs endothéliaux (Ségaliny, A. I. et al. 2015b) et ostéoclastiques par chimioattraction (Hwang, S. J. et al. 2012). L'activation des chondrocytes articulaires par le contexte inflammatoire et le stress mécanique dans l'articulation OA conduit à la synthèse de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, qui amplifient l'inflammation et la dégradation des tissus. Enfin, un rôle de la membrane synoviale dans l'entretien de l'inflammation et la production d'IL-34 n'est pas à exclure d'après les données de la littérature.

L'IL-34 produite par les chondrocytes murins et humains de nos modèles a été détectée dans les surnageants de culture et dans les lysats cellulaires, comprenant les protéines intracellulaires et les protéines matricielles. Ces observations nous suggèrent que l'IL-34 est sécrétée par les chondrocytes mais est également présente dans leurs matrices extracellulaires et/ou à la surface des cellules. Lorsque l'IL-34 est piégée dans la MEC, cette cytokine est capable de générer une activité biologique locale en interagissant avec les protéoglycanes à chaîne de chondroïtine sulfates (Ségaliny, A. I. et al. 2015c) et/ou avec ses récepteurs présents à la surface des cellules à proximité. Au cours des processus cataboliques de la MEC, cette IL-34 pourrait être libérée et agir sur l'ensemble de ses cellules cibles.

produite par les chondrocytes hypertrophiques en clusters à la surface du cartilage. Ces mécanismes stimulent les cellules synoviales et amplifient la synovite en activant la synthèse de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, dont l'IL-34 en réponse au TNF- α et à l'IL-1 β . L'ensemble de ces mécanismes faciliterait la dégradation de la MEC du cartilage et de l'os sous-chondral, la progression des chenaux vasculaires vers le cartilage articulaire et par conséquent un remodelage excessif de la jonction ostéocondrale. Figure adaptée à partir des travaux de Neftci, M. et al. (2016).

3.2.5.3 Lien entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes et l'ostéoclastogenèse

Les ostéoblastes produisent constitutivement du CSF-1 et les progéniteurs ostéoclastiques qui expriment les récepteurs RANK et CSF-1R sont capables de se différencier en ostéoclastes matures et fonctionnels en présence de RANKL et de CSF-1 (Takahashi, N. et al. 2014). Comme il a été décrit pour l'IL-34, le VEGF (Niida, S. et al. 1999) et le HGF (Adamopoulos I. E. et al. 2006) peuvent se substituer au CSF-1 pour promouvoir l'ostéoclastogenèse RANKL-dépendante. Dans notre modèle de différenciation hypertrophique, il est intéressant de relever une augmentation de l'expression de HGF d'environ 2,1 fois dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux articulaires. Nous avons également observé une induction significative de la sécrétion de VEGF au cours de l'hypertrophie, ce qui traduit la capacité des chondrocytes hypertrophiques de notre modèle à produire d'autres molécules susceptibles d'activer l'ostéoclastogenèse. De la même manière, nous avons constaté que les chondrocytes hypertrophiques sécrétaient de grandes quantités de CXCL-12 (SDF-1 α), une molécule connue pour sa capacité à favoriser l'ostéoclastogenèse (Kim, H. R. et al. 2014). Notons également, qu'au cours de la différenciation hypertrophique, les chondrocytes expriment fortement les gènes codant la MCP-1 (3,4 fois par qPCR), le RANKL (5,8 fois par qPCR) et le CSF-1 (2,2 fois dans le microarray) par rapport aux chondrocytes articulaires. En accord avec nos travaux, une étude a montré une augmentation de l'expression de RANK, RANKL, CSF-1, CSF-1R, cathépsine K et TRAP dans les cartilages arthrosiques. Les auteurs ont suggéré l'acquisition d'un phénotype « osteoclast-like » par les chondrocytes OA (Zhou, S. et al. 2016). Nous retrouvons également une induction de l'expression de la cathépsine K au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes de notre modèle, avec une induction de 3,5 fois entre le stade hypertrophique et articulaire, suggérant que les chondrocytes hypertrophiques de notre modèle pourraient acquérir un phénotype « osteoclast-like » pro-catabolique, qui favoriserait un remodelage pathologique de la jonction ostéocondrale.

Récemment, l'équipe de Ségaliny (Ségaliny, A. I. 2015a) a mis en avant un niveau de complexité supérieur dans la régulation du système IL-34/CSF-1/CSF-1R en démontrant l'existence d'une interaction hétérodimérique entre l'IL-34 et le CSF-1. La formation d'un tel hétérodimère a montré des effets additifs sur la prolifération et la viabilité cellulaire par l'activation du récepteur CSF-1R, à de faibles concentrations de cytokines.

3.2.5.4 Le récepteur PTP- ζ

Le récepteur PTP- ζ est exprimé dans la synoviale au cours de la PR mais à de faibles niveaux par rapport à CSF-1R (Garcia, S. et al. 2016), ce qui restreint son rôle dans la réponse cellulaire à l'IL-34 dans ce tissu. Kaspiris et al. ont également décrit une présence de PTP- ζ à peine détectable dans le cartilage alors que son expression est fortement augmentée dans l'os sous-chondral des patients souffrant d'une arthrose modérée à sévère (Kaspiris, A. et al. 2013). Dans notre étude immunohistochimique, nous avons fait un constat similaire avec un immunomarquage de PTP- ζ dans les tissus de patients OA moins intense et plus diffus que le marquage CSF-1R. Il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression de l'IL-34 et de ses récepteurs suivant le stade d'OA des patients afin d'évaluer l'impact de cette cytokine dans la progression de la pathologie.

En réponse à un stress mécanique, la présence du récepteur PTP- ζ est augmentée dans les chondrocytes des zones prolifératives et hypertrophiques ainsi que dans les ostéoblastes et les ostéocytes de la zone d'ossification dans un modèle de déformation de la colonne vertébrale de rat (Kaspiris, A. et al. 2016). Nous avons développé au laboratoire un modèle de stress mécanique, dans lequel nous avons montré une sécrétion d'IL-34 par les ostéoblastes soumis à une compression (donnée non montrée). Parallèlement à l'augmentation de la sécrétion d'IL-34, les ostéoblastes comprimés expriment davantage le gène *Ptprz1* par PCR quantitative, ce qui est en accord avec les résultats de l'étude de Kaspiris mentionnée ci-dessus. Nous pouvons ainsi imaginer une amplification de la signalisation de l'IL-34 par son récepteur PTP- ζ dans un contexte d'arthrose, où l'articulation est soumise à d'importantes contraintes mécaniques.

En confrontant les études de la littérature et nos données personnelles, nous pouvons émettre l'hypothèse que la différenciation hypertrophique des chondrocytes et le stress mécanique observés dans l'articulation arthrosique seraient les mécanismes moteurs de la progression de l'arthrose, en participant notamment à la dérégulation de la signalisation de l'IL-34 à la jonction ostéochondrale.

3.2.5.5 Co-récepteur de l'IL-34 : le syndecan-1

Dans notre modèle, l'expression du syndecan-1 est significativement augmentée de 1,5 fois dans les chondrocytes hypertrophiques par rapport aux pré-hypertrophiques. De manière intéressante, une étude a montré une augmentation de l'expression de ce protéoglycane dans le cartilage d'un modèle de souris transgéniques, portant une mutation dans le gène codant le collagène de type II (Salminen-Mankonen, H. et al. 2005). Ce modèle murin développe naturellement une arthrose, caractérisée par une induction précoce de l'expression de syndecan-1 dans les chondrocytes hypertrophiques organisés en clusters et dans les chondrocytes des couches plus superficielles, adjacentes aux zones articulaires endommagées. Une augmentation de l'expression de syndecan-1 a également été décrite dans le cartilage de patients arthrosiques (Barre, P. E. et al. 2000). Les auteurs ont suggéré un lien entre l'expression de syndecan-1 et la prolifération des chondrocytes, conduisant à l'apparition de clusters dans le cartilage arthrosique. Enfin, des travaux sur le myélome multiple ont démontré la capacité des cellules cancéreuses à internaliser et à dégrader l'ostéoprotégérine (OPG) via une interaction avec le syndecan-1 (Standal, T. et al. 2002). Les cellules tumorales du cancer du sein ont aussi manifesté leur capacité à interagir avec l'OPG par l'intermédiaire du syndecan-1 (Benad-Mehner, P. et al 2013). Nous comprenons en conséquence le rôle majeur de ce protéoglycane dans l'activation de l'ostéolyse chez les patients. Dans le cartilage arthrosique, l'IL-34 pourrait contribuer à l'ostéoclastogenèse par son interaction avec le syndecan-1, entraînant par conséquent la migration de précurseurs d'ostéoclastes ou plus généralement de cellules myéloïdes, comme l'a décrit l'équipe de Ségaliny (Ségaliny, A. I. et al. 2015c).

3.2.5.6 L'IL-34 et le microARN-21

Une étude a démontré l'existence d'une corrélation positive entre les niveaux d'IL-34 dans les liquides synoviaux de patients PR et l'expression du microARN-21 par les fibroblastes de la synoviale (Yang, S. et al. 2016). Il a été montré que la stimulation de ces fibroblastes par l'IL-34 induisait fortement l'expression de miR-21 via l'activation de la voie de signalisation STAT3. Une autre étude a mis en évidence une augmentation de l'expression de miR-21 dans les cartilages de patients arthrosiques, associée à une diminution de l'expression du growth differentiation factor 5 (GDF-5), considéré comme un facteur clé de la chondrogenèse (Zhang, Y. et al. 2014). D'après les auteurs, le miR-21 participerait au développement de l'arthrose en inhibant directement l'expression du GDF-5 dans les

chondrocytes articulaires. En confrontant nos résultats issus de l'analyse microarray avec ces données de la littérature, il est intéressant de noter une augmentation de l'expression du miR-21 d'environ 2 fois entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et articulaires et de 1,75 fois entre les chondrocytes hypertrophiques et articulaires. Notons que le miR-21 ressort de l'analyse parmi les miR les plus dérégulés au cours de la différenciation hypertrophique. L'augmentation de l'expression de miR-21 semble progressive au cours du processus de différenciation hypertrophique, comme nous l'observons pour l'expression de l'IL-34. Parallèlement à cette induction de miR-21, l'expression de GDF-5 diminue au cours de la différenciation hypertrophique, de 1,8 fois entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et articulaires, de 3,3 fois entre les chondrocytes hypertrophiques et articulaires et de 1,8 fois entre les chondrocytes hypertrophiques et pré-hypertrophiques. Ainsi, nous retrouvons dans notre modèle, une induction de l'expression de l'IL-34 au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes, associée à l'augmentation de l'expression du miR-21 et de l'inhibition de l'expression de GDF-5. Ces résultats suggèrent un rôle supplémentaire de l'IL-34 dans la physiopathologie de l'arthrose en inhibant indirectement le GDF-5 par une induction de miR-21. Leurs implications restent toutefois à vérifier expérimentalement.

3.2.5.7 Lien entre l'IL-34, l'obésité et l'arthrose

Il est reconnu que l'IL-34 est exprimé par les tissus adipeux humains (Chang, E. J. et al. 2014). Les pré-adipocytes et les adipocytes humains sécrètent de l'IL-34, dont la production est amplifiée en réponse au TNF- α et à l'IL-1 β . Les patients obèses présentent des niveaux sériques d'IL-34 plus élevés que les sujets contrôles. Ces niveaux d'IL-34 sont corrélés au développement d'une insulino-résistance et d'une inflammation chronique (Chang, E. J. et al. 2014). Il est actuellement bien établi que l'obésité constitue l'un des facteurs de risque de l'apparition d'une arthrose, associée à la fois à la surcharge pondérale (Reijman, M. et al. 2006), due aux contraintes mécaniques subies par les articulations, et aux troubles métaboliques engendrés (Sowers, M. et al. 2009). L'IL-34 sécrétée par le tissu adipeux pourrait affecter les tissus articulaires par la voie systémique. Nous ne pouvons pas exclure non plus une action plus locale par l'intermédiaire des tissus adipeux intra-articulaires, qui présentent un profil pro-inflammatoire chez les patients arthrosiques. L'action sur l'os et la jonction ostéochondrale pourrait aussi impliquer le tissu adipeux médullaire. Ainsi, nous pouvons nous questionner sur l'implication des tissus adipeux intra-articulaires et du tissu adipeux de la moelle osseuse dans la sécrétion de l'IL-34 et dans la progression de l'« arthrose métabolique » chez les patients obèses.

En conclusion, l'interleukine-34 semble constituer une cible d'intérêt, impliquée dans le développement de la physiopathologie de l'arthrose, en raison de ses effets pléiotropes dans l'articulation. Grâce à cette étude, nous avons pu mettre en évidence le rôle potentiel de l'IL-34 dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale. Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'approfondir la compréhension de l'implication de cette cytokine à l'échelle globale de l'articulation.

4. Conclusion générale et perspectives

Des discussions ont été proposées pour chaque partie de ce manuscrit. Nous concluerons donc sur une vision plus générale de l'impact de la différenciation hypertrophique des chondrocytes et du remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale dans le processus arthrosique et de l'intérêt de rechercher de nouvelles cibles impliquées dans ces mécanismes.

Il y a plus de 60 ans, Trueta, J. & Harrison, M. H. M. (1953) concluaient que ce qui caractérise l'arthrose « n'est pas tant la présence d'une dégénérescence du cartilage mais la réaction vasculaire que provoque cette dégénérescence ». Depuis, l'implication physiopathologique de l'angiogenèse ostéochondrale n'a été que très peu étudiée, dominée par des recherches se concentrant principalement sur les enzymes protéolytiques et les cytokines pro-inflammatoires agissant sur les couches superficielles du cartilage et la membrane synoviale.

Le rôle du remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale a donc longtemps été sous-estimé, négligeant ses conséquences sur la dégradation du cartilage, son ossification, le remodelage de l'os sous-chondral et le recrutement de progéniteurs (endothéliaux, ostéoclastiques, ostéoblastiques...). Ces phénomènes constituent pourtant des événements précoces au cours de la physiopathologie de l'arthrose. Il existe donc une réelle nécessité d'inhiber la différenciation hypertrophique des chondrocytes et/ou l'angiogenèse ostéochondrale, jouant un rôle essentiel dans les altérations de la matrice extracellulaire des tissus à l'interface entre l'os et le cartilage mais aussi dans l'entretien de l'inflammation de la cavité articulaire. Une meilleure compréhension de ces mécanismes et des acteurs moléculaires impliqués permettraient ainsi de développer de nouveaux moyens thérapeutiques pour ralentir voire bloquer la progression de l'arthrose, actuellement incontrôlable.

De nombreuses techniques sont aujourd'hui développées (microfractures, « mosaicplastie », transplantation de cellules souches, implantation de biomatériaux...) afin de réparer et de régénérer le cartilage arthrosique. Toutefois cette régénération n'est aujourd'hui que partielle, avec l'obtention de tissus fibro-cartilagineux ou osseux, incapables de restaurer les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. En comprenant davantage la régulation de la différenciation chondrocytaire, cela permettrait par exemple de mieux contrôler le phénotype des cellules souches mésenchymateuses transplantées ou de moduler le niveau de différenciation des cellules recrutées au cours des processus de réparation tissulaire.

Le développement de modèle de différenciation hypertrophique comme celui que nous avons mis en place au laboratoire, permet de mieux caractériser le mécanisme de différenciation hypertrophique et d'identifier des molécules sécrétées par les chondrocytes hypertrophiques, responsables de la progression de la pathologie. La poursuite de l'analyse du transcriptome et du miRnome de notre modèle va permettre d'accroître nos connaissances sur les mécanismes transcriptionnels qui se mettent en place au cours de la différenciation hypertrophique, et ainsi mettre en évidence de potentielles cibles impliquées dans le processus arthrosique, comme nous avons pu commencer à le percevoir avec l'interleukine-34.

Il n'y a actuellement aucune étude clinique rapportée dans la littérature qui cible l'angiogenèse au cours de l'arthrose. Néanmoins, l'utilisation de thérapies ciblant l'angiogenèse (ex : signalisation du VEGF) dans les traitements contre le cancer pourrait fournir de nouvelles connaissances sur l'efficacité potentielle de ces thérapies dans l'arthrose. De manière intéressante, un « case report » a récemment suggéré que l'inhibition de la voie du HGF par le crizotinib, utilisé dans le traitement contre le cancer du poumon, avait induit une diminution des symptômes cliniques d'arthrose chez un patient au bout de 16 mois de traitement, en réduisant l'expression du VEGF (Remon, J. et al. 2015). Cette observation apporte un argument supplémentaire de l'intérêt d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans l'angiogenèse et le remodelage ostéocondral afin de développer des thérapeutiques ciblées.

Références bibliographiques

- Acharya, C. et al. (2014).** Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: Interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biology* 37, 102–111.
- Adamopoulos, I. E. et al. (2006).** Hepatocyte growth factor can substitute for M-CSF to support osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350, 478–483.
- Adams, J. & Lawler, J. (1993).** The thrombospondin family. *Current Biology* 3, 188–190.
- Agah, A. et al. (2002).** The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *The American journal of pathology* 161, 831–839.
- Aigner, T. et al. (2006a).** Osteoarthritis: Pathobiology—targets and ways for therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 128–149.
- Aigner, T. et al. (2006b).** IL-1 β and BMPs - Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *European Cells and Materials* 12, 49–56.
- Akiyama, H. et al. (2002).** The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development* 16, 2813–2828.
- Akiyama, H. et al. (2004).** Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes & development* 18, 1072–1087.
- Altaf, F. M. et al. (2006).** Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *eCells&Materials Journal*. 12, 64-69; discussion 69-70.
- Alvarado-Vazquez, P. A. et al. (2015).** Intra-articular administration of an antibody against CSF-1 receptor reduces pain-related behaviors and inflammation in CFA-induced knee arthritis. *Neuroscience Letters* 584, 39–44.
- Amend, S. R. et al. (2015).** Thrombospondin-1 Regulates Bone Homeostasis Through Effects on Bone Matrix Integrity and Nitric Oxide Signaling in Osteoclasts: Thrombospondin-1 Regulates Bone Homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* 30, 106–115.
- Anderson, J. C. et al. (2007).** ABT-510, a modified type 1 repeat peptide of thrombospondin, inhibits malignant glioma growth in vivo by inhibiting angiogenesis. *Cancer Biology and Therapy* 6, 454-462.
- Anderson, J. J. & Felson, D. T. et al. (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. *American Journal of Epidemiology* 128, 179-189.
- Andriacchi, T. P. et al. (2004).** A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. *Annals of biomedical engineering* 32, 447–457.

- Appleton, C. T. G. et al. (2007).** Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 56, 1854–1868.
- Arkill, K. P. & Winlove, C. P. (2008).** Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, 708–714.
- Ashraf, S. et al. (2011a).** Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 63, 2700–2710.
- Ashraf, S. et al. (2011b).** Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70, 523–529.
- Atsumi, T. et al. (1990).** A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differentiation and Development* 30, 109–116.
- Atukorala, I. et al. (2016).** Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease? *Annals of the Rheumatic Diseases* 75, 390–395.
- Augello, A. & De Bari, C. (2010).** The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Human Gene Therapy* 21, 1226–1238.
- Aury-Landas, J. et al. (2016).** Genetic Determinism of Primary Early-Onset Osteoarthritis. *Trends in Molecular Medicine* 22, 38–52.
- Ayotte, D. C. et al. (2001).** Direction-dependent resistance to flow in the endplate of the intervertebral disc: an ex vivo study. *Journal of Orthopaedic Research* 19, 1073–1077.
- Baek, J. H. et al. (2015).** IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. *Journal of Clinical Investigation* 125, 3198–3214.
- Baenziger, N. L. et al. (1971).** A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68, 240–243.
- Bailey, A. J. et al. (2002).** Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 176–182.
- Baker, L. H. et al. (2008).** Randomized, Phase II Study of the Thrombospondin-1-Mimetic Angiogenesis Inhibitor ABT-510 in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology* 26, 5583–5588.
- Bakker, A. C. et al. (2001).** Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, 128–136.
- Ballegaard, C. et al. (2014).** Knee pain and inflammation in the infrapatellar fat pad estimated by conventional and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in obese patients with osteoarthritis: A cross-sectional study. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 933–940.

- Ballock, R. T. & Reddi A. H. (1994).** Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *Journal of Cell Biology* 126, 1311-1318.
- Bank, R. A. et al. (1997).** A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biology* 16, 233–243.
- Baron, J. et al. (2015).** Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nature Reviews Endocrinology* 11, 735–746.
- Barre, P.E. et al. (2000).** Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of syndecan-1 and -4 messages in cartilage and cultured chondrocytes from osteoarthritic joints. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 34-43.
- Bashir, A. et al. (1997).** Glycosaminoglycan in articular cartilage: in vivo assessment with delayed Gd (DTPA)(2-)-enhanced MR imaging. *Radiology* 205, 551–558.
- Baud’Huin, M. et al. (2010).** Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *The Journal of Pathology* 221, 77–86.
- Bay-Jensen, A. C. et al. (2016)** The Need for Predictive, Prognostic, Objective and Complementary Blood-Based Biomarkers in Osteoarthritis (OA). *EBioMedicine* 7, 4–6.
- Bein, K. & Simons, M. (2000).** Thrombospondin Type 1 Repeats Interact with Matrix Metalloproteinase 2: REGULATION OF METALLOPROTEINASE ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32167–32173.
- Benad-Mehner, P. et al (2013).** Targeting syndecan-1 in breast cancer inhibits osteoclast functions through up-regulation of osteoprotegerin. *Journal of Bone Oncology* 15, 3, 18-24.
- Benito, M. J. (2005).** Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64, 1263–1267.
- Beswick, A. D. et al. (2012).** What proportion of patients report long-term pain after total hip or knee replacement for osteoarthritis? A systematic review of prospective studies in unselected patients. *British Medical Journal Open* 2, e000435.
- Bezerra, M. C. et al. (2005).** RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 161–170.
- Billinghurst, R. C. et al. (1997).** Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Clinical Investigation* 99, 1534.
- Blair, H. C. et al. (2007).** Balanced Regulation of Proliferation, Growth, Differentiation, and Degradation in Skeletal Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116, 165–173.
- Blair-Levy, J. M. et al. (2008).** A type I collagen defect leads to rapidly progressive osteoarthritis in a mouse model. *Arthritis & Rheumatism* 58, 1096–1106.

- Blaney Davidson, E. N. et al. (2009).** Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *The Journal of Immunology* 182, 7937-7945.
- Blaney Davidson, E. N. et al. (2007).** TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 15, 597-604.
- Blanke, M. et al. (2009).** Transplanted Chondrocytes Inhibit Endochondral Ossification Within Cartilage Repair Tissue. *Calcified Tissue International* 85, 421-433.
- Blom, A. B. et al. (2004).** Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, 627-635.
- Boegård, T. et al. (1998a).** Correlation between radiographically diagnosed osteophytes and magnetic resonance detected cartilage defects in the tibiofemoral joint. *Annals of the Rheumatic Diseases* 57, 401-407.
- Boegård, T. et al. (1998b).** Correlation between radiographically diagnosed osteophytes and magnetic resonance detected cartilage defects in the patellofemoral joint. *Annals of the Rheumatic Diseases* 57, 395-400.
- Bonnet, C. S. & Walsh, D. A. (2005).** Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 44, 7-16.
- Bonucci, E. (2012).** Bone mineralization. *Frontiers in Bioscience* 17, 100-28.
- Bornstein, P. (1992).** Thrombospondins: structure and regulation of expression. *The FASEB Journal* 6, 3290-3299.
- Bornstein, P. (1995).** Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of Cell Biology* 130, 503-506.
- Bornstein, P. (2009).** Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling* 3, 189-200.
- Bosman, F. T. & Stamenkovic, I. (2003).** Functional structure and composition of the extracellular matrix: Structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology* 200, 423-428.
- Boström, E. A. & Lundberg, P. (2013).** The Newly Discovered Cytokine IL-34 Is Expressed in Gingival Fibroblasts, Shows Enhanced Expression by Pro-Inflammatory Cytokines, and Stimulates Osteoclast Differentiation. *PLOS ONE* 8, e81665.
- Botter, S. M. et al. (2009).** ADAMTS5^{-/-} mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: implications for a link between cartilage and subchondral bone changes. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 636-645.

- Botter, S. M. et al. (2009).** ADAMTS5^{-/-} mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: implications for a link between cartilage and subchondral bone changes. *Osteoarthritis and Cartilage* 17, 636–645.
- Bredella, M. A. et al. (2011).** Vertebral Bone Marrow Fat Is Positively Associated With Visceral Fat and Inversely Associated With IGF-1 in Obese Women. *Obesity* 19, 49–53.
- Bridgewater, L. C. et al. (1998).** Chondrocyte-specific Enhancer Elements in the Col11a2 Gene Resemble the Col2a1 Tissue-specific Enhancer. *Journal of Biological Chemistry* 273, 14998–15006.
- Brown, T. D. et al. (1984).** Finite element studies of some juxtarticular stress changes due to localized subchondral stiffening. *Journal of Biomechanics* 17, 11–24.
- Buckland-Wright, C. (2004).** Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, 10–19.
- Burr, D. B. & Radin, E. L. (2003).** Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthrosis? *Rheumatic Disease Clinics of North America* 29, 675–85.
- Burton, D. W. et al. (2005).** Chondrocyte calcium-sensing receptor expression is up-regulated in early guinea pig knee osteoarthritis and modulates PTHrP, MMP-13, and TIMP-3 expression. *Osteoarthritis and Cartilage* 13, 395–404.
- Buschmann, M. D. et al. (1996).** Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. *Journal of Cell Science* 109, 499–508.
- Calabro, N. E. et al. (2014).** Thrombospondin-2 and extracellular matrix assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 2396–2402.
- Campbell, I. K. et al. (1993).** Production of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) by human articular cartilage and chondrocytes. Modulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1182, 57–63.
- Campbell, N. E. et al. (2010).** The Thrombospondin-1 Mimetic ABT-510 Increases the Uptake and Effectiveness of Cisplatin and Paclitaxel in a Mouse Model of Epithelial Ovarian Cancer. *Neoplasia* 12, 275–283.
- Campbell, N. et al. (2011).** ABT-898 Induces Tumor Regression and Prolongs Survival in a Mouse Model of Epithelial Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 10, 1876–1885.
- Caplan, A. I. & Bruder, S. P. (2001).** Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine* 7, 259–264.
- Carlson, C. B. et al. (2005).** Structure of the calcium-rich signature domain of human thrombospondin-2. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 910–914.
- Carlson, C. B. et al. (2008).** Thrombospondins: from structure to therapeutics: Structures of thrombospondins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 672–686.

- Carrino, J. A. et al. (2006).** MRI of bone marrow edema-like signal in the pathogenesis of subchondral cysts. *Osteoarthritis and Cartilage* 14, 1081–1085.
- Cecil, D. L. & Terkeltaub, R. (2008).** Transamidation by Transglutaminase 2 Transforms S100A11 Calgranulin into a Pro-catabolic Cytokine for Chondrocytes. *The Journal of Immunology* 180, 8378–8385.
- Cecil, D. L. et al. (2005a).** Inflammation-Induced Chondrocyte Hypertrophy Is Driven by Receptor for Advanced Glycation End Products. *The Journal of Immunology* 175, 8296–8302.
- Cecil, D. L. et al. (2005b).** Role of interleukin-8 in PiT-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 52, 144–154.
- Cecil, D. L. et al. (2009).** The Pattern Recognition Receptor CD36 Is a Chondrocyte Hypertrophy Marker Associated with Suppression of Catabolic Responses and Promotion of Repair Responses to Inflammatory Stimuli. *The Journal of Immunology* 182, 5024–5031.
- Cerejo, R. et al. (2002).** The influence of alignment on risk of knee osteoarthritis progression according to baseline stage of disease. *Arthritis & Rheumatism* 46, 2632–2636.
- Chaipinyo, K. et al. (2002).** Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. *Journal of Orthopaedic Research* 20, 1070–1078.
- Chang, E. J. (2014).** IL-34 is associated with obesity, chronic inflammation, and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99(7), E1263-1271. doi: 10.1210/jc.2013-4409.
- Chang, S. H. et al. (2015).** Baseline serum interleukin-34 levels independently predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 35, 71–79.
- Chapman, K. et al. (2008).** A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Human Molecular Genetics* 17, 1497–1504.
- Chemel, M. et al. (2012).** Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71, 150–154.
- Chen, H. et al. (1996).** Binding and degradation of thrombospondin-1 mediated through heparan sulphate proteoglycans and low-density-lipoprotein receptor-related protein: localization of the functional activity to the trimeric N-terminal heparin-binding region of thrombospondin-1. *Biochemical Journal* 15; 318 (Pt 3), 959-963.
- Chen, Y. et al. (2015).** Bone turnover and articular cartilage differences localized to subchondral cysts in knees with advanced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 2174–2183.
- Chen, Z. et al. (2011).** The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLOS ONE* 6, e18689.

- Cheng, A. & Genever, P. G. (2010).** SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *Journal of Bone and Mineral Research* 25, 2680–2689.
- Chevalier, X. & Richette, P. (2005).** Cartilage articulaire normal: anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC-Rhumatologie-Orthopédie* 2, 41–58.
- Chitu, V. & Stanley, E. R. (2017).** Regulation of Embryonic and Postnatal Development by the CSF-1 Receptor. *Current Topics in Developmental Biology* 123, 229–275.
- Cirillo, D. J. et al. (2006).** Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the women's health initiative. *Arthritis & Rheumatism* 54, 3194–3204.
- Clark, J. M. & Huber, J. D. (1990).** The structure of the human subchondral plate. *Journal of Bone and Joint Surgery-British* 72, 866-873.
- Clark, J. M. (1990).** The structure of vascular channels in the subchondral plate. *Journal of Anatomy* 171, 105-115.
- Conejo, J. R. et al. (2000).** Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *International journal of cancer* 88, 12–20.
- Conway, J. G. et al. (2008).** Effects of the cFMS Kinase Inhibitor 5-(3-Methoxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)benzyl)pyrimidine-2,4-diamine (GW2580) in Normal and Arthritic Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326, 41–50.
- Couchourel, D. et al. (2009).** Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis & Rheumatism* 60, 1438–1450.
- Courties, A. et al. (2017).** Metabolic syndrome-associated osteoarthritis: *Current Opinion in Rheumatology* 29, 214–222.
- Daans, M. et al. (2011).** GDF5 deficiency in mice is associated with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70, 208–213.
- Dai, X. M. et al. (2002).** Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111–120.
- Dameron, K. M. et al. (1994).** Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582–1584.
- Dawson, D. W. et al. (1997).** CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *The Journal of Cell Biology* 138, 707–717.
- Dawson, D. W. et al. (1999).** Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis. *Science* 285, 245–248.

- De Bandt, M. et al. (2003).** Blockade of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, Suppresses Joint Destruction in the K/BxN Model of Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology* 171, 4853–4859.
- Del Carlo, M. & Loeser, R. F. (2008).** Cell death in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* 10, 37–42.
- Demoor, M. et al. (2012).** Deciphering chondrocyte behaviour in matrix-induced autologous chondrocyte implantation to undergo accurate cartilage repair with hyaline matrix. *Pathologie Biologie* 60, 199–207.
- Dequeker, J. et al. (1997).** Bone density and local growth factors in generalized osteoarthritis. *Microscopy Research and Technique* 37, 358–371.
- Diamantopoulou, Z. et al. (2012).** Loss of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase β/ζ (RPTP β/ζ) Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Journal of Biological Chemistry* 287, 40339–40349.
- Dicesare, P. E. et al. (1994).** Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. *The FEBS Journal* 223, 927–937.
- Diepold, J. et al. (2015).** Sex-differences of the healthy infra-patellar (Hoffa) fat pad in relation to intermuscular and subcutaneous fat content – Data from the *Osteoarthritis Initiative*. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 200, 30–36.
- Dieppe, P. et al. (1993).** Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 52, 557–563.
- Dijkgraaf L. C. et al. (1996a).** Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 54, 332-338.
- Dijkgraaf, L. C. et al. (1996b).** Function, biochemistry, and metabolism of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 54, 95–100.
- DiPietro, L. A. & Polverini, P. J. (1993).** Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *The American journal of pathology* 143, 678-684.
- Dobnig, H. & Turner, R. T. 1995).** Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136, 3632-3638.
- Domowicz, M. S. et al. (2009).** Aggrecan modulation of growth plate morphogenesis. *Developmental Biology* 329, 242–257.
- Dong, Y. F. et al. (2006).** Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *Journal of Cellular Physiology* 208, 77–86.

- Dreier, R. (2010).** Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Research & Therapy* 12, 216.
- Droin, N. & Solary, E. (2010).** Editorial: CSF1R, CSF-1, and IL-34, a ‘menage à trois’ conserved across vertebrates. *Journal of Leukocyte Biology* 87, 745–747.
- Dufour, E. & Larsson, N. G. (2004).** Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1658, 122–132.
- Duval, E. et al. (2009).** Hypoxia-inducible factor 1 α inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: Hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1 α -dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 60, 3038–3048.
- Ebbinghaus, S. et al. (2007).** Phase 2 Study of ABT-510 in Patients with Previously Untreated Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 13, 6689–6695.
- Eda, H. et al. (2010).** Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine* 52, 215–220.
- Eda, H. et al. (2011).** Proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , induce expression of interleukin-34 mRNA via JNK- and p44/42 MAPK-NF- κ B pathway but not p38 pathway in osteoblasts. *Rheumatology International* 31, 1525–1530.
- Edwards, I. J. (2012).** Proteoglycans in prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 21; 9, 196-206. doi: 10.1038/nrurol.2012.19.
- Eisenstein, R. et al. (1973).** The resistance of certain tissues to invasion: penetrability of explanted tissues by vascularized mesenchyme. *The American journal of pathology* 73, 765-772.
- El Hajjaji, H. et al. (2004).** Treatment with calcitonin prevents the net loss of collagen, hyaluronan and proteoglycan aggregates from cartilage in the early stages of canine experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, 904–911.
- Englund, M. et al. (2008).** Incidental meniscal findings on knee MRI in middle-aged and elderly persons. *The New England Journal of Medicine* 359, 1108-1115.
- Englund, M. et al. (2009).** Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The multicenter osteoarthritis study. *Arthritis & Rheumatism* 60, 831–839.
- Enomoto, H. et al. (2003).** Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *The American Journal of Pathology* 162, 171–181.
- Evangelou, E. et al. (2009).** Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis & Rheumatism* 60, 1710–1721.

- Eymard, F. et al. (2014).** Induction of an Inflammatory and Prodegradative Phenotype in Autologous Fibroblast-like Synoviocytes by the Infrapatellar Fat Pad From Patients With Knee Osteoarthritis: Involvement of the IFP in OA Synovitis. *Arthritis & Rheumatology* 66, 2165–2174.
- Eymard, F. et al. (2017).** Knee and hip intra-articular adipose tissues (IAATs) compared with autologous subcutaneous adipose tissue: a specific phenotype for a central player in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 76, 1142–1148.
- Fan, J. et al. (2009).** Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 15, 75–86.
- Fawns, H. T. & Landells, J. W. (1953).** Histochemical studies of rheumatic conditions: I. Observations on the fine structures of the matrix of normal bone and cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases* 12, 105-113.
- Fazzalari, N. L. et al. (1998).** Three-dimensional confocal images of microdamage in cancellous bone. *Bone* 23, 373–378.
- Fears, C. Y. et al. (2005).** Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Contributes to the Antiangiogenic Activity of Thrombospondin-2 in a Murine Glioma Model. *Cancer Research* 65, 9338–9346.
- Feigin, V. et al. (2016).** Global, Regional, and National Disability-adjusted Life Years (Dalys) for 315 Diseases and Injuries and Healthy Life Expectancy (Hale), 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388, 1603–1658.
- Felson, D. T. et al. (2001).** The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Annals of Internal Medicine* 3; 134, 541-549.
- Felson, D. T. et al. (2003).** Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Annals of Internal Medicine* (5 Pt 1): 330-336.
- Felson, D. T. et al. (2007).** Low levels of vitamin D and worsening of knee osteoarthritis: Results of two longitudinal studies. *Arthritis & Rheumatism* 56, 129–136.
- Feng, Z. J. et al. (2010).** Lung cancer cell migration is regulated via repressing growth factor PTN/RPTP β/ζ signaling by menin. *Oncogene* 29, 5416-5426.
- Fenwick, S. A. et al. (1999).** Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 441-452.
- Filip, A. et al. (2015).** A simple two dimensional culture method to study the hypertrophic differentiation of rat articular chondrocytes. *Bio-medical materials and engineering* 25(1 Suppl):87-102. doi: 10.3233/BME-141252.
- Fischer, L. et al. (2002).** Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 84, 816–831.

- Fleitas, T. et al. (2013).** VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology* 15, 897–902.
- Foster, J. W. et al. (1994).** Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372, 525-530.
- Fox, D. B. & Warnock, J. J. (2011).** Cell-based Meniscal Tissue Engineering: A Case for Synoviocytes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 469, 2806–2816.
- Fransès, R. E. et al. (2010).** Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA. *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 563–571.
- Franz-Odendaal, T. A., et al. (2006).** Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics* 235, 176–190.
- Fuerst, M. et al. (2009).** Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 60, 2694–2703.
- Fukai, N. et al. (2009).** Syndecan-1: an inhibitor of arterial smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1356-1362. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.190132.
- Funck-Brentano, T. & Cohen-Solal, M. (2015).** Subchondral bone and osteoarthritis: *Current Opinion in Rheumatology* 27, 420–426.
- Galasso, O. et al. (2012).** Recent findings on the role of gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and -9) in osteoarthritis. *Advances in Orthopedics* doi: 10.1155/2012/834208.
- Gao, Q. et al. (2016).** Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits cell cycle progression and induces senescence in endothelial cells. *Cell Death and Disease* 7, e2368.
- Garcia, S. et al. (2016).** Colony-stimulating factor (CSF) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 18:75 doi: 10.1186.
- Garimella, R. et al. (2004).** Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. *Bone* 34, 961-970.
- Gelb, D. E. et al. (1990).** The production of transforming growth factor-beta by chick growth plate chondrocytes in short term monolayer culture. *Endocrinology* 127, 1941-1947.
- Gelse, K. et al. (2003).** Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1531–1546.
- Gelse, K. et al. (2011).** Thrombospondin-1 Prevents Excessive Ossification in Cartilage Repair Tissue Induced by Osteogenic Protein-1. *Tissue Engineering Part A* 17, 2101–2112.

- Gerber, H. P. et al. (1999).** VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine* 5, 623-628.
- Ghosh, P. et al. (1991).** Recent advances in animal models for evaluating chondroprotective drugs. *The Journal of Rheumatology* 27, 143-146.
- Glasson, S. S. et al. (2005).** Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 31; 434, 644-648.
- Glasson, S. S. et al. (2007).** The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis and Cartilage* 15, 1061–1069.
- Glasson, S. S. et al. (2010).** The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 18 Suppl 3:S17-23.
- Glasson, S. S. et al. (2004).** Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis and Rheumatism* 50, 2547-58.
- Gnainsky, Y. et al. (2007).** Gene expression during chemically induced liver fibrosis: effect of halofuginone on TGF-beta signaling. *Cell and Tissue Research* 328, 153-166.
- Goldring, M. B. & Goldring, S. R. (2007).** Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology* 213, 626–634.
- Goldring, M. B. & Marcu, K. B. (2009).** Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 11, 224 doi:10.1186/ar2592.
- Goldring, M. B. et al. (2011).** Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European Cells and Materials* 21, 202–220.
- Golightly, Y. M. et al. (2007).** Relationship of limb length inequality with radiographic knee and hip osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 15, 824–829.
- Good, D. J. et al. (1990).** A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 6624–6628.
- Gordon, M. S. et al. (2008).** A phase 1 trial of 2 dose schedules of ABT-510, an antiangiogenic, thrombospondin-1-mimetic peptide, in patients with advanced cancer. *Cancer* 113, 3420–3429.
- Goyal, N. et al. (2010).** Immunohistochemical analysis of ageing and osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Molecular Histology* 41, 193–197.
- Greenaway, J. et al. (2007).** Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *Journal of Cellular Physiology* 210, 807–818.

- Gregory, C. A. et al. (2004).** An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* 329, 77–84.
- Grotle, M. et al. (2008).** Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskeletal Disorders* 9:132 doi:10.1186/1471-2474-9-132.
- Gruber, H. E. et al. (2008).** Disruption of the thrombospondin-2 gene alters the lamellar morphology but does not permit vascularization of the adult mouse lumbar disc. *Arthritis Research & Therapy* 10, R96.
- Gruber, R. et al. (2004).** Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 15, 29–35.
- Guévremont, M. et al. (2003).** Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research* 18, 1073–1081.
- Guillonau, C. et al. (2017).** Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, 2569–2586.
- Guo, X. et al. (2006).** Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomedical Materials* 1, 206-215.
- Guo, X. et al. (2009).** The Wnt/ β -Catenin Pathway Interacts Differentially with PTHrP Signaling to Control Chondrocyte Hypertrophy and Final Maturation. *PLOS ONE* 4, e6067.
- Gupta, K. et al. (1999).** Ramakrishnan, S. & Hebbel, R. P. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3, 147–158.
- Hahn-Dantona, E. et al. (2001).** The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Levels of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) by Mediating Its Cellular Catabolism. *Journal of Biological Chemistry* 276, 15498–15503.
- Halade, G. V. et al. (2010).** High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 1162–1169.
- Hamilton, J. L. et al. (2016).** Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain: Targeting VEGF And VEGFRS For Treatment Of Osteoarthritis And Pain. *Journal of Bone and Mineral Research* 31, 911–924.
- Hankenson, K. D. et al. (2000).** Increased marrow-derived osteoprogenitor cells and endosteal bone formation in mice lacking thrombospondin 2. *Journal of Bone and Mineral Research* 15, 851–862.

- Happonen, K. E. et al. (2010).** Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis: Regulation of Complement by COMP. *Arthritis & Rheumatism* 62, 3574–3583.
- Hardouin, P. et al. (2016).** Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Frontiers in Endocrinology* 7 doi: 10.3389/fendo.2016.00085.
- Harroch, S. et al. (2000).** No obvious abnormality in mice deficient in receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7706-7715.
- Harvey, W. F. et al. (2008).** Knee alignment differences between Chinese and Caucasian subjects without osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67, 1524–1528.
- Haviv, F. et al. (2005).** Thrombospondin-1 Mimetic Peptide Inhibitors of Angiogenesis and Tumor Growth: Design, Synthesis, and Optimization of Pharmacokinetics and Biological Activities †. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 2838–2846.
- Hawker, G. A. et al. (2014).** All-Cause Mortality and Serious Cardiovascular Events in People with Hip and Knee Osteoarthritis: A Population Based Cohort Study. *PLOS ONE* 9, e91286.
- Hayami, T. et al. (2003).** Expression of the cartilage derived anti-angiogenic factor chondromodulin-I decreases in the early stage of experimental osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 30, 2207-2217.
- Hayami, T. et al. (2004).** The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: Reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis & Rheumatism* 50, 1193–1206.
- Haywood, L. et al. (2003).** Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48, 2173–2177.
- Heidari, B. et al. (2011).** Association between serum vitamin D deficiency and knee osteoarthritis. *International Orthopaedics* 35, 1627–1631.
- Heijink, A. et al. (2012).** Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 20, 423–435.
- Heino, T. J. et al. 2009).** Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technology and Health Care*. 17, 49-56.
- Hellemans, J. et al. (2007).** qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8, R19.
- Higashikawa, A. et al. (2009).** Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene. *Arthritis & Rheumatism* 60, 166–178.

- Hill, C. L. et al. (2005).** Cruciate ligament integrity in osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism* 52, 794–799.
- Hiraki, Y. et al. (1991).** Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 971-977.
- Hiraki, Y. et al. (1997).** Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32419–32426.
- Hoekstra, R. et al. (2005).** Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of the Thrombospondin-1–Mimetic Angiogenesis Inhibitor ABT-510 in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 23, 5188–5197.
- Holmen, S. L. et al. (2004).** Decreased BMD and Limb Deformities in Mice Carrying Mutations in Both Lrp5 and Lrp6. *Journal of Bone and Mineral Research* 19, 2033–2040.
- Honorati, M. C. et al. (2006).** Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage* 14, 345–352.
- Houard, X. et al. (2013).** Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* 15, 375. doi:10.1007/s11926-013-0375-6.
- Hsieh, J. L. et al. (2010).** Intraarticular gene transfer of thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 28, 1300–1306.
- Hu, D. P. et al. (2017).** Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development* 144, 221–234.
- Hunter, D. J. et al. (2006).** Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: A longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 54, 1529–1535.
- Hunter, D. J. et al. (2007).** Cartilage markers and their association with cartilage loss on magnetic resonance imaging in knee osteoarthritis: the Boston Osteoarthritis Knee Study. *Arthritis Research & Therapy* 9, R108.
- Hunter, D. J. et al. (2009).** Bone marrow lesions from osteoarthritis knees are characterized by sclerotic bone that is less well mineralized. *Arthritis Research & Therapy* 11:R11. doi: 10.1186/ar2601.
- Hunter, G. K. et al. (1993).** Calcification of chick vertebral chondrocytes grown in agarose gels: a biochemical and ultrastructural study. *Journal of Cell Science* 104, 1031–1038.

- Hurwitz, H. et al. (2004).** Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 350, 2335–2342.
- Hwang, J. et al. (2008).** Increased hydraulic conductance of human articular cartilage and subchondral bone plate with progression of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 58, 3831–3842.
- Hwang, S. J. et al. (2012).** Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Research & Therapy* 14, R14.
- Imhof, H. et al. (1997).** Degenerative joint disease: cartilage or vascular disease? *Skeletal Radiology* 26, 398–403.
- Imhof, H. et al. (2000).** Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Investigative Radiology*. 35, 581-8.
- Inada, M. et al. (1999).** Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Developmental Dynamics* 214, 279–290.
- Iruela-Arispe, M. L. et al. (1993).** Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Developmental Dynamics* 197, 40-56.
- Isenberg, J. et al. (2006).** Thrombospondin-1 antagonizes nitric oxide-stimulated vascular smooth muscle cell responses. *Cardiovascular Research* 71, 785–793.
- Isenberg, J. S. et al. (2008).** Differential effects of ABT-510 and a CD36-binding peptide derived from the type 1 repeats of thrombospondin-1 on fatty acid uptake, nitric oxide signaling, and caspase activation in vascular cells. *Biochemical Pharmacology* 75, 875–882.
- Isenberg, J. S. et al. (2009).** Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nature Reviews Cancer* 9, 182–194.
- Iwamoto, M. et al. (1993).** Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. *Experimental Cell Research*. 207:413-420.
- Javaid, M. K. et al. (2010).** Pre-radiographic MRI findings are associated with onset of knee symptoms: the most study. *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 323–328.
- Jiang, S. et al. (2005).** Antimalarial activities and therapeutic properties of febrifugine analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 1169-1176.
- Jikko, A. et al. (1993).** Characterization of the mineralization process in cultures of rabbit growth plate chondrocytes. *Developmental Biology* 156, 372-380.
- Jimenez, B. et al. (2000).** Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature Medicine* 6, 41-48.
- Johnson, V. L. & Hunter, D. J. (2014).** The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 28, 5–15.

- Jou, I. M. et al. (2005).** Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 52, 339–344.
- Kadri, A. et al. (2008).** Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 58, 2379–2386.
- Kamekura, S. et al. (2005).** Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis and Cartilage* 13, 632–641.
- Kamekura, S. et al. (2006).** Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis & Rheumatism* 54, 2462–2470.
- Karsdal, M. A. et al. (2014).** The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments? *Annals of the Rheumatic Diseases* 73, 336–348.
- Karsenty, G. (2008).** Transcriptional Control of Skeletogenesis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9, 183–196.
- Kaspiris, A. et al. (2013).** Expression of the growth factor pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta in the serum, cartilage and subchondral bone of patients with osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 80, 407–413.
- Katagiri, T. & Watabe, T. (2016).** Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8: a021899.
- Kato, M. et al. (2002).** Cbfa1 -independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of Cell Biology* 157, 303–314.
- Katsuragawa, Y. et al. (2010).** Changes of human menisci in osteoarthritic knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 1133–1143.
- Kaur, S. et al. (2010).** Thrombospondin-1 Inhibits VEGF Receptor-2 Signaling by Disrupting Its Association with CD47. *Journal of Biological Chemistry* 285, 38923–38932.
- Kazerounian, S. et al. (2008).** Thrombospondins: from structure to therapeutics: Thrombospondins in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 700–712.
- Kellgren, J. H. & Lawrence, J. S. (1957).** Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 16, 494–502.
- Kemp, L. E. et al. (2006).** Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochemical Society Transactions* 34, 414–417.
- Kevorkian, L. et al. (2004).** Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 50, 131–141.

- Kiani, C. et al. (2002).** Structure and function of aggrecan. *Cell Research* 12, 19-32.
- Kim, D. Y. et al. (2003).** Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *The Veterinary Journal* 166, 52–57.
- Kim, H. A. et al. (2006).** The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 54, 2152–2163.
- Kim, H. R. et al. (2014).** Reciprocal Activation of CD4+ T Cells and Synovial Fibroblasts by Stromal Cell-Derived Factor 1 Promotes RANKL Expression and Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis: SDF-1-Induced Osteoclastogenesis in RA. *Arthritis & Rheumatology* 66, 538–548.
- Kirsch, T. et al. (2000).** Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 8, 294–302.
- Klein-Wieringa, I. R. et al. (2011).** The infrapatellar fat pad of patients with osteoarthritis has an inflammatory phenotype. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70, 851–857.
- Klinger, P. et al. (2011).** Chondromodulin 1 stabilizes the chondrocyte phenotype and inhibits endochondral ossification of porcine cartilage repair tissue. *Arthritis & Rheumatism* 63, 2721–2731.
- Ko, F. C. et al. (2013).** In Vivo Cyclic Compression Causes Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Changes in Mouse Tibiae: In Vivo Compression Effects on Mouse Tibial Cartilage and Bone. *Arthritis & Rheumatism* 65, 1569–1578.
- Komori, T. (2010).** Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and Tissue Research* 339, 189–195.
- Koutsoumpa, M. et al. (2015).** Receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta is a functional binding partner for vascular endothelial growth factor. *Molecular Cancer* 14: 19 doi: 10.1186/s12943-015-0287-3.
- Krampera, M. et al. (2005).** HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood* 106, 59–66.
- Krasnokutsky, S. et al. (2011).** Quantitative magnetic resonance imaging evidence of synovial proliferation is associated with radiographic severity of knee osteoarthritis: Quantitative MRI Evidence and Radiographic Severity of Knee OA. *Arthritis & Rheumatism* 63, 2983–2991.
- Kratchmarova, I. et al. (2005).** Mechanism of Divergent Growth Factor Effects in Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Science* 308, 1472–1477.
- Krishna, S. M. & Golledge, J. (2013).** The role of thrombospondin-1 in cardiovascular health and pathology. *International Journal of Cardiology* 168, 692–706.

- Kruger, E. A. & Figg, W. D. (2000).** TNP-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9, 1383–1396.
- Kusumbe, A. P. et al. (2014).** Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 507, 323–328.
- Kyriakides, T. R. et al. (1998).** Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *Journal of Cell Biology* 140, 419–430.
- Lai, Y. et al. (2014).** ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF- α in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 73, 1575–1584.
- Lajeunesse, D. & Reboul, P. (2003).** Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Current opinion in rheumatology* 15, 628–633.
- Lawler, J. & Detmar, M. (2004).** Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1038–1045.
- Lawler, J. (2000).** The functions of thrombospondin-1 and-2. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 634–640.
- Lawler, J. et al. (1998).** Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *Journal of Clinical Investigation* 101, 982–992.
- Le Pen, C. et al. (2005).** Financial cost of osteoarthritis in France. *Joint Bone Spine* 72, 567–570.
- Leboy, P. S. et al. (1989).** Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 264, 17281–17286.
- Leong, D. J. et al. (2010).** Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. *Matrix Biology* 29, 420–426.
- Li, J. et al. (2017).** New Interleukins in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Patients, The Possible Roles of Interleukin-33 to Interleukin-38 in Disease Activities and Bone Erosions. *Dermatology* 233, 37–46.
- Li, S. S. et al. (2002).** T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *European Journal of Immunology* 32, 1069–1079.
- Lian, J. B. et al. (2012).** MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology* 8, 212–227.

- Liao, L. et al. (2017).** Deletion of Runx2 in Articular Chondrocytes Decelerates the Progression of DMM-Induced Osteoarthritis in Adult Mice. *Scientific Reports* 7, 2371. Doi:10.1038/s41598-017-02490-w.
- Lin, H. et al. (2008).** Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320, 807–811.
- Lindahl, A. et al. (2015).** From gristle to chondrocyte transplantation: treatment of cartilage injuries. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370: 20140369.
- Lindblad, S. & Hedfors, E. (1987).** Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 30, 1081–1088.
- Linde, K. N. et al. (2017).** Bone Mineral Density is Lower in Patients with Severe Knee Osteoarthritis and Attrition. *Calcified Tissue International* doi: 10.1007/s00223-017-0315-y.
- Little, C. B. et al. (2009).** Matrix metalloproteinase 13–deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis & Rheumatism* 60, 3723–3733.
- Litwic, A. et al. (2013).** Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin* 105, 185–199.
- Liu, G. et al. (2009).** Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *The Journal of cell biology* 185, 67–75.
- Liu, Y. et al. (2012).** Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *Journal of Clinical Investigation* 122, 3101–3113.
- Liu-Bryan, R. et al. (2005).** TLR2 Signaling in Chondrocytes Drives Calcium Pyrophosphate Dihydrate and Monosodium Urate Crystal-Induced Nitric Oxide Generation. *The Journal of Immunology* 174, 5016–5023.
- Loeser, R. F. (2010).** Age-Related Changes in the Musculoskeletal System and the Development of Osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine* 26, 371–386.
- Loeser, R. F. et al. (2005).** Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 52, 2376–2385.
- Loeser, R. F. et al. (2012).** Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatism* 64, 1697–1707.
- Lohmander, L. S. et al. (2009).** Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: a population-based prospective cohort study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68, 490–496.

- Long, M. W. (2001).** Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 27, 677–690.
- Lopez-Dee, Z. P. et al. (2015).** Thrombospondin-1 in a Murine Model of Colorectal Carcinogenesis. *PLOS ONE* 10, e0139918. doi, 10.1371/journal.pone.0139918.
- Lories, R. J. & Luyten, F. P. (2011).** The bone–cartilage unit in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 7, 43–49.
- Ludin, A. et al. (2013).** Injection of vascular endothelial growth factor into knee joints induces osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis and Cartilage* 21, 491–497.
- Luyten, F. P. et al. (2009).** Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone* 44, 522–527.
- Lyons, T. J. et al. (2006).** The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskeletal Disorders* 7, 52 doi.org/10.1186/1471-2474-7-52.
- Lyons-Giordano, B. et al. (1991).** The effects of interleukin-1 on the expression of thrombospondin and fibronectin by rabbit articular chondrocytes. *Experimental Cell Research* 195, 462-467.
- Ma, X. et al. (2012).** Structural Basis for the Dual Recognition of Helical Cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* 20, 676–687.
- Madry, H. et al. (2010).** The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18, 419–433.
- Maeda, N. et al (1999).** A Receptor-like Protein-tyrosine Phosphatase PTPz/RPTPb Binds a Heparin-binding Growth Factor Midkine. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 12474-12479
- Maeda, N. et al. (1996).** 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase ζ /RPTP β , binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *Journal of Biological Chemistry* 271, 21446–21452.
- Magne, D. et al. (2003).** Phosphate Is a Specific Signal for ATDC5 Chondrocyte Maturation and Apoptosis-Associated Mineralization: Possible Implication of Apoptosis in the Regulation of Endochondral Ossification. *Journal of Bone and Mineral Research* 18, 1430–1442.
- Mahjoub, M. et al. (2012).** Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporosis International* 23, 841–846.
- Makihira, S. et al. (2003).** Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage. *Endocrinology* 144, 2480-2488.

- Malek, M. H. & Olfert, I. M. (2009).** Global deletion of thrombospondin-1 increases cardiac and skeletal muscle capillarity and exercise capacity in mice: Muscle phenotype of TSP-1 null mice. *Experimental Physiology* 94, 749–760.
- Malinin, T. & Ouellette, E. A. (2000).** Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 483–491.
- Mankin, H. et al. (1971).** Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 53, 523–537.
- Mansfield, K. et al. (1999).** Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. *Journal of Cellular Physiology* 179, 276–286.
- Mapp, P. I. & Walsh, D. A. (2012).** Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 8, 390–398.
- Mapp, P. I. et al. (2008).** Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, 61–69.
- Mapp, P. I. et al. (2010).** Effects of a metalloproteinase inhibitor on osteochondral angiogenesis, chondropathy and pain behavior in a rat model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 593–600.
- Margosio, B. et al. (2003).** Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood* 102, 4399–4406.
- Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J. P. (2010).** Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues. *Eklemler Hastalik Cerrahisi* 21, 2–14.
- Martig, S. et al. (2007).** MRI characteristics and histology of bone marrow lesions in dogs with experimentally induced osteoarthritis. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 48, 105–112.
- Martin, I. et al. (1997).** Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 138, 4456–4462.
- Martinez G. L. et al. (2017).** Salivary Colony Stimulating Factor-1 and Interleukin-34 in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology* 88:e140–e149. doi:10.1902/jop.2017.170081.
- Massicotte, F. et al. (2006).** Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone* 38, 333–341.
- Matsumoto, T. et al. (2009).** Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble flt-1. *Arthritis & Rheumatism* 60, 1390–1405.

- Mattot, V. et al. (1995).** Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *Journal of Cell Science* 108, 529–535.
- McAlindon, T. et al. (2013).** Effect of Vitamin D Supplementation on Progression of Knee Pain and Cartilage Volume Loss in Patients With Symptomatic Osteoarthritis: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Medical Association* 309, 155-162.
- McInnes, I. B. et al. (1996).** Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *Journal of Experimental Medicine* 184, 1519–1524.
- Melrose, J. et al. (2008).** Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. *Arthritis Research & Therapy* 10, R79 doi: 10.1186/ar2453.
- Melrose, J. et al. (2016).** The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation. *Matrix Biology* 52–54, 363–383.
- Meng, K. et al. (2000).** Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of β -catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase β/ζ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 2603–2608.
- Mente, P. L. & Lewis, J. L. (1994).** Elastic modulus of calcified cartilage is an order of magnitude less than that of subchondral bone. *Journal of Orthopaedic Research* 12, 637–647.
- Messent, E. A. et al. (2005a).** Tibial cancellous bone changes in patients with knee osteoarthritis. A short-term longitudinal study using Fractal Signature Analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* 13, 463–470.
- Messent, E. A. et al. (2005b).** Cancellous bone differences between knees with early, definite and advanced joint space loss; a comparative quantitative macroradiographic study. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 39-47.
- Milev, P. et al. (1998).** High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase- ζ/β with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6998–7005.
- Miller, R. R. & McDevitt, C. A. (1988).** Thrombospondin is present in articular cartilage and is synthesized by articular chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 153, 708–714.
- Miller, R. R. & McDevitt, C. A. (1991).** Thrombospondin in ligament, meniscus and intervertebral disc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1115, 85–88.
- Mirochnik, Y. et al. (2008).** Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Current Drug Targets* 9, 851-862.
- Misra, D. et al. (2013).** Vitamin K Deficiency Is Associated with Incident Knee Osteoarthritis. *The American Journal of Medicine* 126, 243–248.

- Moon, S. J. et al. (2013).** Increased levels of interleukin 34 in serum and synovial fluid are associated with rheumatoid factor and anticyclic citrullinated peptide antibody titers in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 40, 1842-1849.
- Mori, S. et al. (1993).** Microcracks in articular calcified cartilage of human femoral heads. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117, 196-198.
- Moses, M. A. et al. (1990).** Identification of an Inhibitor of Neovascularization from Cartilage. *Science* 248, 1408–1410.
- Moses, M. A. et al. (1992).** Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *The Journal of Cell Biology* 119, 475–482.
- Mueller, M. B. & Tuan, R. S. (2008).** Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis & Rheumatism* 58, 1377–1388.
- Müller, C. et al. (2014).** Quantitative proteomics at different depths in human articular cartilage reveals unique patterns of protein distribution. *Matrix Biology* 40, 34–45.
- Müller, S. et al. (2003).** A role for receptor tyrosine phosphatase ζ in glioma cell migration. *Oncogene* 22, 6661–6668.
- Murata, M. et al. (2008).** The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, 279–286.
- Musacchio, E. et al. (2011).** The impact of knee and hip chondrocalcinosis on disability in older people: the ProVA Study from northeastern Italy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70, 1937–1943.
- Musumeci, G. et al. (2011).** Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 19, 307–313.
- Mutabaruka, M. S. et al. (2010).** Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression. *Arthritis Research & Therapy* 12, R20.
- Nagai, T. et al. (2014).** Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 16: 427.
- Nakamichi, Y. et al. (2013).** IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 31, 486–495.
- Nandi, S. et al. (2012).** The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental Biology* 367, 100–113.
- Nandi, S. et al. (2013).** Receptor-type Protein-tyrosine Phosphatase ζ Is a Functional Receptor for Interleukin-34. *Journal of Biological Chemistry* 288, 21972–21986.

- Nasi, S. et al. (2016).** Sodium Thiosulfate Prevents Chondrocyte Mineralization and Reduces the Severity of Murine Osteoarthritis. *PLOS ONE* 11, e0158196 doi: 10.1371/journal.pone.0158196.
- Nefla, M. et al. (2016).** The danger from within: alarmins in arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 12, 669–683.
- Nelson, A. E. et al. (2011).** Differences in multijoint radiographic osteoarthritis phenotypes among African Americans and Caucasians: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis & Rheumatism* 63, 3843–3852.
- Neogi, T. & Zhang, Y. (2013).** Epidemiology of Osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 39, 1–19.
- Neogi, T. et al. (2009).** Cartilage loss occurs in the same subregions as subchondral bone attrition: A within-knee subregion-matched approach from the multicenter osteoarthritis study. *Arthritis & Rheumatism* 61, 1539–1544.
- Nevitt, M. C. et al. (2001).** The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The heart and estrogen/progestin replacement study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatology* 44, 811–818.
- Ng, F. et al. (2008).** PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112, 295–307.
- Niida, S. et al. (1999).** Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *Journal of Experimental Medicine* 190, 293–298.
- Nishimura, R. et al. (2012).** Osterix Regulates Calcification and Degradation of Chondrogenic Matrices through Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) Expression in Association with Transcription Factor Runx2 during Endochondral Ossification. *Journal of Biological Chemistry* 287, 33179–33190.
- Nör, J. E. et al. (2000).** Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *Journal of Vascular Research* 37, 209–218.
- Nüesch, E. et al. (2011).** All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis, population based cohort study. *British Medical Journal* 342, d1165. doi: 10.1136/bmj.d1165.
- Numan, M. S. et al. (2015).** Paget’s disease of bone: an osteoimmunological disorder? *Drug Design, Development and Therapy* 9, 4695-4707.

- O'Hara, B. P. et al. (1990).** Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases* 49, 536–539.
- O'Reilly, M. S. et al. (1997).** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277–285.
- O'shea, K. S. & Dixit, V. M. (1988).** Unique distribution of the extracellular matrix component thrombospondin in the developing mouse embryo. *The Journal of Cell Biology* 107, 2737–2748.
- Oegema, T. R. et al. (1997).** The Interaction of the Zone of Calcified Cartilage and Subchondral Bone in Osteoarthritis. *Microscopy Research and Technique* 37, 324–332.
- Oganesian, A. et al. (2008).** Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell* 19, 563–571.
- Ohno, H. et al. (2008).** The orally-active and selective c-Fms tyrosine kinase inhibitor Ki20227 inhibits disease progression in a collagen-induced arthritis mouse model. *European Journal of Immunology* 38, 283–291.
- Øiestad, B. E. et al. (2009).** Winner of the 2008 Systematic Review Competition: Knee Osteoarthritis after Anterior Cruciate Ligament Injury. *The American Journal of Sports Medicine* 37, 1434–1443.
- Oka, H. et al. (2009).** Association of low dietary vitamin K intake with radiographic knee osteoarthritis in the Japanese elderly population: dietary survey in a population-based cohort of the ROAD study. *Journal of Orthopaedic Science* 14, 687–692.
- Olivotto, E. et al. (2008).** Differential requirements for IKK α and IKK β in the differentiation of primary human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 58, 227–239.
- Olsson, A. et al. (2010).** Tasquinimod (ABR-215050), a quinoline-3-carboxamide anti-angiogenic agent, modulates the expression of thrombospondin-1 in human prostate tumors. *Molecular Cancer* 9: 107.
- Orecchia, P. et al. (2013).** A novel human anti-syndecan-1 antibody inhibits vascular maturation and tumour growth in melanoma. *European Journal of Cancer* 49, 2022–2033.
- Orfanidou, T. (2012).** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and extracellular inorganic phosphate activate mitogen-activated protein kinase pathway through fibroblast growth factor 23 contributing to hypertrophy and mineralization in osteoarthritic chondrocytes. *Experimental Biology and Medicine* 237, 241–253.
- Orfanidou, T. et al. (2009).** Involvement of SOX-9 and FGF-23 in RUNX-2 regulation in osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 3186–3194.
- Palotie, A. et al. (1989).** Predisposition to familial osteoarthrosis linked to type II collagen gene. *The Lancet* 1, 924–927.

- Pan, J. et al. (2009).** In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 27, 1347–1352.
- Pan, J. et al. (2012).** Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone* 51, 212–217.
- Pantazaka, E. & Papadimitriou, E. (2014).** Chondroitin sulfate-cell membrane effectors as regulators of growth factor-mediated vascular and cancer cell migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 2643–2650.
- Papadimitriou, E. et al. (2016).** Pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta as regulators of angiogenesis and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1866, 252–265.
- Papaoannou, N. A. et al. (2007).** Effect of calcitonin in early and late stages of experimentally induced osteoarthritis. A histomorphometric study. *Osteoarthritis and Cartilage* 15, 386–395.
- Park, J. et al. (2015).** Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biology Open* 4, 608–621.
- Pauli, C. et al. (2011).** Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 19, 1132–1141.
- Peles, E. et al. (1995).** The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase β is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* 82, 251–260.
- Peles, E. et al. (1998).** Multi-ligand interactions with receptor-like protein tyrosine phosphatase β : implications for intercellular signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 121–124.
- Peregoy, J. & Wilder, F. V. (2011).** The effects of vitamin C supplementation on incident and progressive knee osteoarthritis: a longitudinal study. *Public Health Nutrition* 14, 709–715.
- Pesesse, L. et al. (2011).** Osteochondral plate angiogenesis: A new treatment target in osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 78, 144–149.
- Pesesse, L. et al. (2013).** Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage* 21, 1913–1923.
- Pesesse, L. et al. (2014).** Bone sialoprotein as a potential key factor implicated in the pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 547–556.
- Pfander, D. et al. (2000).** Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59, 448–454.
- Pfander, D. et al. (2001).** Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. *Annals of the Rheumatic Diseases* 60, 1070–1073.

- Pfander, D. et al. (2003).** HIF-1 alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *Journal of Cell Science* 116, 1819–1826.
- Pixley, F. J. & Stanley, E. R. (2004).** CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in Cell Biology* 14, 628–638.
- Plumb, M. S. & Aspden, R. M. (2004).** High levels of fat and (n-6) fatty acids in cancellous bone in osteoarthritis. *Lipids in Health and Disease* 3: 12.
- Posey, K. L. et al. (2008).** Skeletal Abnormalities in Mice Lacking Extracellular Matrix Proteins, Thrombospondin-1, Thrombospondin-3, Thrombospondin-5, and Type IX Collagen. *The American Journal of Pathology* 172, 1664–1674.
- Pottenger, L. A. et al. (1990).** The effect of marginal osteophytes on reduction of varus valgus instability in osteoarthritic knees. *Arthritis & Rheumatology* 33, 853-858.
- Pouders, C. et al (2008).** Prevalence and MRI-anatomic correlation of bone cysts in osteoarthritic knees. *American Journal of Roentgenology* 190, 17-21.
- Prasadam, I. et al. (2012).** Aggravation of ADAMTS and Matrix Metalloproteinase Production and Role of ERK1/2 Pathway in the Interaction of Osteoarthritic Subchondral Bone Osteoblasts and Articular Cartilage Chondrocytes - Possible Pathogenic Role in Osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology* 39, 621-634.
- Preisser, L. et al. (2014).** IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* 60, 1879-1890.
- Priam, S. et al. (2013).** Identification of Soluble 14-3-3 ϵ as a Novel Subchondral Bone Mediator Involved in Cartilage Degradation in Osteoarthritis: Soluble 14-3-3 ϵ in Bone-Cartilage Communication. *Arthritis & Rheumatism* 65, 1831–1842.
- Primo, L. et al. (2005).** Identification of CD36 molecular features required for its in vitro angiostatic activity. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 19, 1713-1715.
- Pucci, B. et al. (2007).** Development of the terminally differentiated state sensitizes epiphyseal chondrocytes to apoptosis through caspase-3 activation. *Journal of Cellular Physiology* 210, 609–615.
- Pufe, T. et al. (2001).** The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatology* 44, 1082–1088.
- Pufe, T. et al. (2004a).** Endostatin/collagen XVIII—an inhibitor of angiogenesis—is expressed in cartilage and fibrocartilage. *Matrix Biology* 23, 267–276.

- Pufe, T. et al. (2004b).** Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. *The Journal of Pathology* 202, 367–374.
- Pufe, T. et al. (2005).** The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 187, 461–472.
- Pulai, J. I. et al. (2005).** NF- B Mediates the Stimulation of Cytokine and Chemokine Expression by Human Articular Chondrocytes in Response to Fibronectin Fragments. *The Journal of Immunology* 174, 5781–5788.
- Pullig, O. et al. (2000a).** Chondrocyte Differentiation in Human Osteoarthritis: Expression of Osteocalcin in Normal and Osteoarthritic Cartilage and Bone. *Calcified Tissue International* 67, 230–240.
- Pullig, O. et al. (2000b).** Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biology* 19, 245-255.
- Quan, G. M. Y. et al. (2005).** Localization of Pigment Epithelium-Derived Factor in Growing Mouse Bone. *Calcified Tissue International* 76, 146–153.
- Quinn, T. M. et al. (1998).** Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants. *Journal of Cell Science* 111, 573–583.
- Quintana, L. et al. (2009).** Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis, new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 15, 29-41
- Radin, E. L. & Rose R. M. (1986).** Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 213, 34-40.
- Rafii, S. et al. (2002).** Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nature Reviews Cancer* 2, 826–835.
- Rannou, F. et al. (2010).** Physiopathologie de l’arthrose : conceptions actuelles. *La Presse Médicale* 39, 1159–1163.
- Rasheed, Z. et al. (2011).** Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- B in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology* 50, 838–851.
- Raynauld, J. P. et al. (2008).** Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67, 683–688.

- Reboul, P et al. (1996).** The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation* 97, 2011-2019.
- Rege, T. A. et al. (2009).** Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *Journal of Cellular Physiology* 218, 94–103.
- Reiher, F. K. et al. (2002).** Inhibition of tumor growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *International Journal of Cancer* 98, 682–689.
- Reijman, M. et al. (2006).** Body mass index associated with onset and progression of osteoarthritis of the knee but not of the hip: The Rotterdam Study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66, 158–162.
- Remon, J. et al. (2015).** Crizotinib Improves Osteoarthritis Symptoms in a ROS1-Fusion Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patient. *Journal of Thoracic Oncology* 10, e72–e73.
- Ren, B. et al. (2006).** Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1765, 178–188.
- Resovi, A. et al. (2014).** Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biology* 37, 83–91.
- Revell, P. A. et al. (1988).** The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 47, 300–307.
- Rider, C. C. (2006).** Heparin/heparan sulphate binding in the TGF- β cytokine superfamily. *Biochemical Society Transactions* 34, 458-460.
- Roach, H. I. et al. (1998).** Initiation of the bony epiphysis in long bones: chronology of interactions between the vascular system and the chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* 13, 950–961.
- Roberts, D. D. et al. (2007).** Nitric Oxide and Its Gatekeeper Thrombospondin-1 in Tumor Angiogenesis. *Clinical Cancer Research* 13, 795–798.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C. et al. (2001).** Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 98, 12485–12490.
- Roemhildt, M. L. et al. (2014).** Calcium phosphate particulates increase friction in the rat knee joint. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 706–709.
- Rogers, N. M. et al. (2012).** Activated CD47 regulates multiple vascular and stress responses: implications for acute kidney injury and its management. *AJP: Renal Physiology* 303, 1117–1125.

- Rogers, N. M. et al. (2014).** Thrombospondin-1 and CD47 regulation of cardiac, pulmonary and vascular responses in health and disease. *Matrix Biology* 37, 92–101.
- Roman-Blas, J. A. et al. (2016).** An update on the up and coming therapies to treat osteoarthritis, a multifaceted disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 17, 1745–1756.
- Rusk, A. et al. (2006a).** Cooperative Activity of Cytotoxic Chemotherapy with Antiangiogenic Thrombospondin-I Peptides, ABT-526 in Pet Dogs with Relapsed Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 12, 7456–7464.
- Rusk, A. et al. (2006b).** Preclinical Evaluation of Antiangiogenic Thrombospondin-1 Peptide Mimetics, ABT-526 and ABT-510, in Companion Dogs with Naturally Occurring Cancers. *Clinical Cancer Research* 12, 7444–7455.
- Saito, M. et al. (2012).** Angiogenic activity of subchondral bone during the progression of osteoarthritis in a rabbit anterior cruciate ligament transection model. *Osteoarthritis and Cartilage* 20, 1574–1582.
- Saito, T. et al. (2010).** Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nature Medicine* 16, 678–686.
- Salminen-Mankonen, H. et al. (2005).** Syndecan-1 expression is upregulated in degenerating articular cartilage in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 34, 469-474.
- Salvat, C. et al. (2005).** Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 13, 243–249.
- Sanchez, C. et al. (2005).** Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 13, 988–997.
- Sanchez, C. et al. (2008).** Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis & Rheumatism* 58, 442–455.
- Sanchez, C. et al. (2009).** Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthritis and Cartilage* 17, 473–481.
- Sanchez, C. et al. (2012).** Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis & Rheumatology* 64, 1193-203.
- Sanchez, K. et al. (2010).** Prises en charge non pharmacologiques et non chirurgicales de l'arthrose : orthèses, exercices. *La Presse Médicale* 39, 1172–1179.
- Sanchez-Niño, M. D. et al. (2016).** Chronicity following ischaemia-reperfusion injury depends on tubular-macrophage crosstalk involving two tubular cell-derived CSF-1R activators: CSF-1 and IL-34. *Nephrology Dialysis Transplantation* 31, 1409–1416.
- Sandell, L. J. & Aigner, T. (2001).** Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 3, 107-113.

- Satoh, M. L. et al. (2017).** Thrombospondin-1 contributes to slower aortic aneurysm growth by inhibiting maladaptive remodeling of extracellular matrix. *Clinical Science* 131, 1283–1285.
- Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. (2012).** The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51, 249–257.
- Scanzello, C. R. et al. (2011).** Synovial inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: Molecular characterization and relationship to symptoms. *Arthritis & Rheumatism* 63, 391–400.
- Schipani, E. (2001).** Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & Development* 15, 2865–2876.
- Schouten, J. S. et al. (1993).** Insulin-like growth factor-1, a prognostic factor of knee osteoarthritis. *British Journal of Rheumatology* 32, 274–280.
- Schroeder, A. et al. (2006).** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7: 3. doi:10.1186/1471-2199-7-3.
- Schroeder, T. M. et al. (2005).** Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 75, 213–225.
- Ségaly, A. I. et al. (2015a).** IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization. *Cytokine* 76, 170–181.
- Ségaly, A. I. et al. (2015b).** Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment: IL-34 promotes osteosarcoma progression. *International Journal of Cancer* 137, 73–85.
- Ségaly, A. I. et al. (2015c).** Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 1010–1021.
- Sellam, J. & Berenbaum, F. (2010).** The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 6, 625–635.
- Sellam, J. & Berenbaum, F. (2011).** Arthrosis. *La Revue du Praticien* 61, 675–685.
- Sellam, J. & Berenbaum, F. (2013).** Is osteoarthritis a metabolic disease? *Joint Bone Spine* 80, 568–573.
- Shaked, Y. et al. (2005).** Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis. *Cancer Cell* 7, 101–111.
- Shapiro, F. et al. (1993).** Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery* 75, 532–553.

- Sharif, M. et al. (2004).** Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced Cell density and expression of caspase-3. *Arthritis & Rheumatism* 50, 507–515.
- Shekaran, A. & García, A. J. (2011).** ExtraCellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for Bone repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 96A, 261–272.
- Shen, W. et al. (2012).** MRI-measured pelvic Bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured Bone mineral in younger and older adults. *European Journal of Clinical Nutrition* 66, 983–988.
- Shepherd, D. E. T. & Seedhom, B. B. (1999).** Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Annals of the Rheumatic Diseases* 58, 27–34.
- Shibakawa, A. et al. (2005).** The role of subchondral Bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by Cells derived from Bone marrow. *Osteoarthritis and Cartilage* 13, 679–687.
- Shimomura, Y. et al. (1975).** Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcified Tissue Research* 19, 179–187.
- Shlopov, B. V. et al. (1997).** Osteoarthritic lesions. Involvement of three different collagenases. *Arthritis & Rheumatology* 40, 2065–2074.
- Shlopov, B. V. et al. (2000).** Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43, 195–205
- Short, S. M. et al. (2005).** Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by β 1 integrins. *The Journal of Cell Biology* 168, 643–653.
- Shuang, F. et al. (2015).** Indian Hedgehog signaling pathway members are associated with magnetic resonance imaging manifestations and pathological scores in lumbar facet joint osteoarthritis. *Scientific Reports* 5, 10290; doi: 10.1038/srep10290.
- Shukunami, C. et al. (1996).** Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic Cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *The Journal of Cell Biology* 133, 457–468.
- Shukunami, C. et al. (1997).** Cellular Hypertrophy and Calcification of Embryonal Carcinoma-Derived Chondrogenic Cell Line ATDC5 In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 12, 1174–1188.
- Shukunami, C. et al. (1999).** Spatiotemporal pattern of the mouse chondromodulin-I gene expression and its regulatory role in vascular invasion into cartilage during endochondral Bone formation. *International Journal of Developmental Biology* 43, 39–49.
- Simantov, R. & Silverstein, R. L. (2003).** CD36: a critical anti-angiogenic receptor. *Frontiers in Bioscience* 8, s874–s882.

- Smith, J. O. et al. (2003).** Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Science* 8, 849–857.
- Sokoloff, L. (1993).** Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117, 191-195.
- Sowers, M. et al. (2009).** Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. *Arthritis Rheumatology* 61, 1328-1336.
- Standal, T. (2002).** Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma Cells. *Blood* 100, 3002–3007.
- Stanley, E. R. & Chitu, V. (2014).** CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6: a021857.
- Stapleton, C. J. et al. (2011).** Thrombospondin-1 modulates the angiogenic phenotype of human cerebral arteriovenous malformation endothelial cells. *Neurosurgery* 68, 1342-1353.
- Stenina-Adognravi, O. (2014).** Invoking the power of thrombospondins: Regulation of thrombospondins expression. *Matrix Biology* 37, 69–82.
- Sun, L. et al. (2011).** 3D cartilage – Inflammatory Cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials* 32, 5581–5589.
- Sun, X. et al. (2013).** CXCR4-targeted therapy inhibits VEGF expression and chondrosarcoma angiogenesis and metastasis. *Molecular Cancer Therapeutics* 12, 1163-1170.
- Surendran, S. et al. (2016).** Gene targets of mouse miR-709, regulation of distinct pools. *Scientific Reports* 6, doi: 10.1038/srep18958.
- Suri, P. et al. (2012).** Epidemiology of Osteoarthritis and Associated Comorbidities. *Physical Medicine and Rehabilitation* 4, S10–S19.
- Suri, S. & Walsh, D. A. (2012).** Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone* 51, 204–211.
- Suri, S. et al. (2007).** Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66, 1423–1428.
- Suzuki, F. et al. (1991).** Simulation of the initial stage of endochondral ossification, in vitro sequential culture of growth cartilage cells and bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 2368-2372.
- Szychlinska, M. A. et al. (2016).** Altered joint tribology in osteoarthritis: Reduced lubricin synthesis due to the inflammatory process. New horizons for therapeutic approaches. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 59, 149–156.

- Takahashi, I. et al. (1998).** Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal Cells. *Journal of Cell Science* 111, 2067–2076.
- Takahashi, N. et al. (2014).** Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKEy Reports* 3: 495.
- Takazaki, R. et al. (2004).** Suppression of the Biological Activities of the Epidermal Growth Factor (EGF)-like Domain by the Heparin-binding Domain of Heparin-binding EGF-like Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* 279, 47335–47343.
- Takeda, S. et al. (2001).** Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes & Development* 15, 467–481.
- Taljanovic, M. S. et al. (2008).** Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. *Skeletal Radiology* 37, 423–431.
- Tamamura, Y. et al. (2005).** Developmental Regulation of Wnt/ β -Catenin Signals is Required for Growth Plate Assembly, Cartilage Integrity, and Endochondral Ossification. *Journal of Biological Chemistry* 280, 19185–19195.
- Tang, J. et al. (2016).** Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Inhibits Osteoarthritis Progression in the Knee Joints of Adult Mice: FGFR-3 protects articular cartilage against degeneration. *Arthritis & Rheumatology* 68, 2432–2443.
- Tao, R. et al. (2017).** Prognostic Significance of Interleukin-34 (IL-34) in Patients With Chronic Heart Failure With or Without Renal Insufficiency. *Journal of the American Heart Association* 6: e004911.
- Taylor, D. K. et al. (2009).** Thrombospondin-2 Influences the Proportion of Cartilage and Bone During Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 24, 1043–1054.
- Tian, Y. et al. (2013).** Elevated Serum and Synovial Fluid Levels of Interleukin-34 in Rheumatoid Arthritis: Possible Association with Disease Progression via Interleukin-17 Production. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 33, 398–401.
- Toh, M. L. et al. (2014).** Bone- and Cartilage-Protective Effects of a Monoclonal Antibody Against Colony-Stimulating Factor 1 Receptor in Experimental Arthritis: Anti-CSF-1R Antibody Protects Bone and Cartilage in Experimental Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 66, 2989–3000.
- Tolsma, S. S. et al. (1993).** Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *The Journal of Cell Biology* 122, 497–511.
- Tooney, P. A. et al. (1998).** Restricted localization of thrombospondin-2 protein during mouse embryogenesis: a comparison to thrombospondin-1. *Matrix Biology* 17, 131–143.

- Troeberg, L. & Nagase, H. (2012).** Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824, 133–145.
- Tsumaki, N. et al. (1999).** Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal Cell recruitment and chondrocyte differentiation. *The Journal of Cell Biology* 144, 161–173.
- Tucker, R. P. (2004).** The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 969–974.
- Tuli, R. et al. (2003).** Transforming Growth Factor- β -mediated Chondrogenesis of Human Mesenchymal Progenitor Cells Involves N-cadherin and Mitogen-activated Protein Kinase and Wnt Signaling Cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41227–41236.
- Twal, W. O. et al. (1994).** Isolation and localization of basic fibroblast growth factor-immunoreactive substance in the epiphyseal growth plate. *Journal of Bone and Mineral Research* 9, 1737–1744.
- Uchino, M. et al. (2000).** Growth factor expression in the osteophytes of the human femoral head in osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 377, 119-125.
- Valdes, A. M. et al. (2014).** Large scale meta-analysis of urinary C-terminal telopeptide, serum cartilage oligomeric protein and matrix metalloprotease degraded type II collagen and their role in prevalence, incidence and progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 683–689.
- Van Bezooijen, R. L. et al. (2004).** Sclerostin is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, But Not a Classical BMP Antagonist. *The Journal of Experimental Medicine* 199, 805–814.
- Van der Kraan, P. M. & Van den Berg, W. B. (2012).** Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and Cartilage* 20, 223–232.
- Van der Kraan, P. M. & Van den Berg, W. B. (2007).** Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 237-244.
- Vandesompele, J. et al. (2002).** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034.1–research0034.11.
- Veronese, N. et al. (2016).** Osteoarthritis and mortality: A prospective cohort study and systematic review with meta-analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 46, 160–167.
- Verstraete, K. & Savvides, S. N. (2012).** ExtraCellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. *Nature Reviews Cancer* 12, 753–766.

- Von der Mark, K. et al. (1992).** Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis & Rheumatology* 35, 806–811.
- Vortkamp, G. V. et al. (1996).** Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog. *Science* 273, 613–622.
- Wachsmuth, L. et al. (2006).** Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histology and Histopathology* 21, 477-485.
- Walsh, D. A. & Pearson, C. I. (2001).** Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Research & Therapy* 3, 147-153.
- Walsh, D. A. et al. (2007).** Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 15, 743–751.
- Walsh, D. A. et al. (2010).** Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology* 49, 1852–1861.
- Wang, A. et al. (2016).** Procyanidins Mitigate Osteoarthritis Pathogenesis by, at Least in Part, Suppressing Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 2065.
- Wang, B. et al. (2017).** IL-34 Upregulated Th17 Production through Increased IL-6 Expression by Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes. *Mediators of Inflammation* 2017, 1–10.
- Wang, H. et al. (2016).** Serum Interleukin-34 Levels Are Elevated in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Molecules* 22, 35.
- Wang, Q. et al. (2011).** Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nature Medicine* 17, 1674–1679.
- Wang, S. et al. (2003).** Thrombospondin-1-deficient mice exhibit increased vascular density during retinal vascular development and are less sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Developmental Dynamics* 228, 630–642.
- Wang, X. et al. (2004).** Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, 963–973.
- Wang, Y. et al. (2012).** IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature Immunology* 13, 753–760.
- Watanabe, A. et al. (2011).** Histological evaluation and comparison of the anteromedial and posterolateral bundle of the human anterior cruciate ligament of the osteoarthritic knee joint. *The Knee* 18, 47–50.
- Wehling, P. et al. (2017).** Effectiveness of intra-articular therapies in osteoarthritis: a literature review. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 9, 183–196.

- Wei, F. et al. (2012).** Activation of Indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 20, 755–763.
- Wei, L. et al. (2010).** Stimulation of chondrocyte hypertrophy by chemokine stromal cell-derived factor 1 in the chondro-osseous junction during endochondral bone formation. *Developmental Biology* 341, 236-245
- Wei, S. et al. (2010).** Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *Journal of Leukocyte Biology* 88, 495–505.
- Westacott, C. I. et al. (1997).** Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic Bone. *Arthritis & Rheumatology* 40, 1282–1291.
- Westendorf, J. J. et al. (2004).** Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341, 19–39.
- Wilson, A. J. et al. (1988).** Transient osteoporosis: transient bone marrow edema? *Radiology* 167, 757-760.
- Wilson, R. et al. (2009).** Proteomics makes progress in cartilage and arthritis research. *Matrix Biology* 28, 121–128.
- Wilusz, R. E. et al. (2014).** The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology* 39, 25–32.
- Wittrant Y. et al. (2009).** Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) directly inhibits receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression by osteoblasts. *Endocrinology* 150, 4977-4988.
- Wu, L. N. (1989).** Induction of mineral deposition by primary cultures of chicken growth plate chondrocytes in ascorbate-containing media. Evidence of an association between matrix vesicles and collagen. *Journal of Biological Chemistry* 264, 21346–21355.
- Xu, L. et al. (2012).** Magnetic Resonance Imaging of Subchondral Bone Marrow Lesions in Association with Osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 42, 105–118.
- Yahara, Y. et al. (2016).** Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting *Sik3*. *Nature Communications* 7, 10959 doi: 10.1038/ncomms10959.
- Yamauchi, M. et al. (2007).** Novel antiangiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle. *Cancer Science* 98, 1491–1497.
- Yang, E. Y. & Moses, H. L. (1990).** Transforming growth factor beta 1-induced changes in Cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *The Journal of Cell Biology* 111, 731–741.

- Yang, L. et al. (2014).** Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral Bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 12097–12102.
- Yang, S. et al. (2010).** Hypoxia-inducible factor-2 α is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nature Medicine* 16, 687–693.
- Yang, S. et al. (2016).** Interleukin 34 Upregulation Contributes to the Increment of MicroRNA 21 Expression through STAT3 Activation Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Rheumatology* 43, 1312-1319.
- Yang, X. et al. (2003).** Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and Bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: Osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Journal of Bone and Mineral Research* 18, 47–57.
- Yang, Y. et al. (2002).** Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood* 100, 610–617.
- Yang, Z. et al. (2001).** Extracellular Matrix Metalloproteinase 2 Levels Are Regulated by the Low Density Lipoprotein-related Scavenger Receptor and Thrombospondin 2. *Journal of Biological Chemistry* 276, 8403–8408.
- Yee, K. O. et al. (2004).** Expression of the type-1 repeats of thrombospondin-1 inhibits tumor growth through activation of transforming growth factor- β . *The American Journal of Pathology* 165, 541–552.
- Yoshida, C. A. et al. (2004).** Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & development* 18, 952–963.
- Young, G. D. & Murphy-Ullrich, J. E. (2004).** The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex. *Journal of Biological Chemistry* 279, 47633-47642.
- Yu, S. et al. (2017).** Heparanase-1-induced shedding of heparan sulfate from syndecan-1 in hepatocarcinoma Cell facilitates lymphatic endothelial Cell proliferation via VEGF-C/ERK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 485, 432–439.
- Yuan, X. L. et al. (2014).** Bone–cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 1077–1089.
- Yusuf, E. et al. (2010).** Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69, 761–765.
- Yusup, A. et al. (2015).** Bone marrow lesions, subchondral Bone cysts and subchondral Bone attrition are associated with histological synovitis in patients with end-stage knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 1858–1864.

- Zack, M. D. et al. (2006).** Identification of fibronectin neopeptides present in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 54, 2912–2922.
- Zelzer, E. et al. (2004).** VEGFA is necessary for chondrocyte survival during Bone development. *Development* 131, 2161–2171.
- Zhang, F. et al. (2015).** Interleukin-34 in rheumatoid arthritis: potential role in clinical therapy. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, 7809-7815.
- Zhang, X. & Lawler, J. (2007).** Thrombospondin-based antiangiogenic therapy. *Microvascular Research* 74, 90–99.
- Zhang, X. et al. (2005).** Antiangiogenic treatment with the three thrombospondin-1 type 1 repeats recombinant protein in an orthotopic human pancreatic cancer model. *Clinical Cancer Research* 11, 2337–2344.
- Zhang, X. et al. (2015).** Classifications and Definitions of Normal Joints. in *Osteoarthritis - Progress in Basic Research and Treatment* doi:10.5772/59977.
- Zhang, X. et al. (2016a).** Chondromodulin-1 ameliorates osteoarthritis progression by inhibiting HIF-2 α activity. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, 1970–1980.
- Zhang, X. et al. (2016b).** Inhibition of vascular endothelial growth factor with shRNA in chondrocytes ameliorates osteoarthritis. *Journal of Molecular Medicine* 94, 787–798.
- Zhang, Y. et al. (2014).** MicroRNA-21 controls the development of osteoarthritis by targeting GDF-5 in chondrocytes. *Experimental & Molecular Medicine* 46, e79; doi: 10.1038/emm.2013.152.
- Zhang, Y. W. et al. (2000).** A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10549-10554.
- Zhao, C. et al. (2017).** Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Thrombospondin-1 Expression: A Computational Model. *PLOS Computational Biology* 13, e1005272.
- Zhen, G. et al. (2013).** Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral Bone attenuates osteoarthritis. *Nature Medicine* 19, 704–712.
- Zheng, H. et al. (2007).** Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 50, 274-280.
- Zhou, J. et al. (2014).** Disrupting the Indian hedgehog signaling pathway in vivo attenuates surgically induced osteoarthritis progression in Col2a1-CreERT2; Ihhf1/fl mice. *Arthritis Research & Therapy* 16, R11. doi: 10.1186/ar4437.

- Zhou, R. P. et al. (2016).** Functions of interleukin-34 and its emerging association with rheumatoid arthritis. *Immunology* doi:10.1111/imm.12660
- Zhou, S. et al. (2016).** Influence of osteoarthritis grade on molecular signature of human cartilage: Osteoarthritis and gene expression. *Journal of Orthopaedic Research* 34, 454–462.
- Zhou, X. et al. (2014).** Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. *PLoS Genetics* 10, e1004820.
- Zhu, M. et al. (2009).** Activation of β -Catenin Signaling in Articular Chondrocytes Leads to Osteoarthritis-Like Phenotype in Adult β -Catenin Conditional Activation Mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 24, 12–21.
- Zoricic, S. et al. (2003).** Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans. *Journal of Anatomy* 202, 269–277.
- Zuscik, M. J. et al. (2008).** Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *Journal of Clinical Investigation* 118, 429–438.
- Zwicker, S. et al. (2015).** Interleukin 34: a new modulator of human and experimental inflammatory bowel disease. *Clinical Science* 129, 281–290.
- Zwicker, S. et al. (2016).** Receptor-Type Protein-Tyrosine Phosphatase ζ and Colony Stimulating Factor-1 Receptor in the Intestine: Cellular Expression and Cytokine- and Chemokine Responses by Interleukin-34 and Colony Stimulating Factor-1. *PLOS ONE* 11, e0167324.