



HAL
open science

Influence de la localisation anatomique des cartilages sur leur composition et leur réponse biologique au stress inflammatoire

Adeline Cambon-Binder

► To cite this version:

Adeline Cambon-Binder. Influence de la localisation anatomique des cartilages sur leur composition et leur réponse biologique au stress inflammatoire. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS210 . tel-03670964

HAL Id: tel-03670964

<https://theses.hal.science/tel-03670964>

Submitted on 18 May 2022

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394-Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

INSERM UMRS 938

Influence de la localisation anatomique des cartilages sur leur composition et leur réponse biologique au stress inflammatoire

Par Adeline CAMBON-BINDER

Thèse de Doctorat de Biologie

Dirigée par le Professeur Jérémie SELLAM

Présentée et soutenue publiquement le 16 novembre 2021

Devant un jury composé de :

Pr. Sylvie BABAJKO, Directrice de Recherche, Université de Paris, Présidente du jury

Pr. Christelle NGUYEN, PU-PH, Université de Paris, Rapporteur

Dr. Claire VINATIER, MCU, Université de Nantes, Rapporteur

Pr. Didier MAINARD, PU-PH, Université de Lorraine, Examineur

Pr. Raphael VIALLE, PU-PH, Sorbonne Université, Examineur

Pr. Alain SAUTET, PU-PH, Sorbonne Université, Examineur

Dr. Stéphane JAISSON, MCU-PH, Université de Reims, Examineur

Pr. Jérémie SELLAM, PU-PH, Sorbonne Université, Directeur de Thèse

Résumé

L'arthrose de la main est la deuxième localisation d'arthrose symptomatique après le genou et est responsable d'un handicap élevé dans la population âgée. Plusieurs études ont suggéré que les propriétés du cartilage dépendaient de sa localisation anatomique. Nous avons comparé histologiquement et biologiquement des cartilages d'articulations inter-phalangiennes proximales (IPP), métacarpo-phalangiennes (MCP) et de genoux issus de donneurs humains récemment décédés.

La densité cellulaire était inversement corrélée à l'épaisseur du cartilage considéré. Les taux d'homocitrulline (HCit) et de carboxyméthyllysine (CML), reflètent respectivement de la carbamylation et de la glycoxydation des protéines, modifications post-traductionnelles liées au vieillissement, variaient suivant la localisation anatomique. Les cartilages non arthrosiques avaient des profils de sécrétion de base différents selon leur localisation: les IPP sécrétaient moins de MMP-3 que les MCP. Sous l'influence d'un stimulus pro-inflammatoire (IL-1 β), l'accroissement de sécrétion de l'IL-6 était 6 fois plus importante aux genoux qu'aux IPP, celui de la MMP-3 plus important aux IPP qu'aux MCP et qu'aux genoux. Les cartilages arthrosiques stimulés par l'IL-1 β montraient des accroissements de sécrétion de l'IL-6 et de la PGE₂ plus importants aux genoux qu'aux IPP. Il existait plus de différences entre 2 localisations articulaires pour un même état physiologique ou pathologique (arthrose) que pour une localisation donnée entre ces 2 conditions. Enfin, les taux sériques d'HCit et de CML n'étaient pas corrélés à la sévérité de l'atteinte radiographique dans une cohorte de patients souffrant d'arthrose des mains.

Au total, il existe des différences de composition biochimique (contenu en produits de modifications post-traductionnelles des protéines), et des différences fonctionnelles biologiques entre les cartilages digitaux et de genoux. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques doit prendre en compte cette variabilité.

Mots clés: arthrose, cartilage, main, genou, carbamylation, CML

Abstract

Osteoarthritis of the hand is the second most common symptomatic osteoarthritis location after the knee and is responsible for a high level of disability in the elderly population. Several studies have suggested that cartilage properties depend on its anatomical location. We compared histologically and biologically cartilage from proximal interphalangeal (PIP), metacarpophalangeal (MCP) and knee joints from recently deceased human donors.

Cell density was inversely correlated with the thickness of the cartilage considered. homocitrullin (HCit) and carboxymethyllysine (CML) levels, reflecting protein carbamylation and glycoxydation, post-translational modifications related to aging, varied according to anatomical location. Non-arthritic cartilages had different baseline secretion profiles depending on their location: PIPs secreted less MMP-3 than MCPs. Under the influence of a proinflammatory stimulus (IL-1 β), the increase in IL-6 secretion was 6-fold greater in knees than in PIPs, that of MMP-3 greater in PIPs than in MCPs and than in knees. IL-1 β -stimulated osteoarthritic cartilage showed greater increases in IL-6 and PGE₂ secretion at knees than at PIPs. There were more differences between 2 joint locations for the same physiological or pathological condition (osteoarthritis) than for a given location between these 2 conditions. Finally, serum HCit and CML levels did not correlate with the severity of radiographic severity in a cohort of patients with hand osteoarthritis.

Overall, there are differences in biochemical composition (content of post-translational modification products of proteins), and biological functional differences between digital and knee cartilage. The development of new therapeutic approaches must take this variability into account.

Keywords: osteoarthritis, cartilage, hand, knee, carbamylation, CML

REMERCIEMENTS

Au Pr Jérémie Sellam, le meilleur directeur de thèse dont on puisse rêver : disponible tout en laissant une grande autonomie, toujours enthousiaste même quand la manip ne donne rien. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir tant fait pour me pousser à aller plus loin. Je suis ravie de pouvoir travailler avec toi encore longtemps.

Au Pr Sylvie Babajko, merci de me faire l'honneur de diriger mon jury de thèse. Merci pour votre soutien et vos encouragements lors des comités de suivi de thèse, qui permettent de se situer et de prendre du recul sur son travail.

Au Pr Didier Mainard, merci de me faire l'honneur d'être examinateur de mon travail de thèse, et pour votre grande bienveillance lors des comités de suivi de thèse.

Aux Dr Christelle Nguyen et Claire Vinatier, merci de me faire l'honneur d'être rapporteurs de mon travail de thèse.

Au Pr Alain Sautet, merci de me faire l'honneur d'être examinateur de mon travail de thèse, et de m'avoir encouragée à réaliser ma thèse dans le laboratoire du Pr Francis Berenbaum. Je vous remercie de la confiance que vous m'accordez.

A Dr Stéphane Jaisson, un énorme merci pour son aide précieuse et son investissement dans ce projet. Tu as pris en charge tous les dosages de carbamylation et de carboxyméthylation... avec gentillesse et optimisme. Merci de l'accueil que tu m'as réservé dans ton Unité de recherche pour m'expliquer tes techniques, pour ton expertise pour discuter des résultats, et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au Pr Raphaël Vialle de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. C'est un plaisir de travailler à tes côtés au sein du DEOA!

Au Pr Francis Berenbaum, merci de m'avoir donnée l'opportunité de faire ma thèse dans votre laboratoire de recherche, ainsi que pour la bienveillance sans faille dont vous faites preuve envers tous les membres de l'équipe.

Un grand merci à toute l'équipe de l'Ecole de Chirurgie du Fer à Moulin et en particulier à Djamel Taleb pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur accompagnement bienveillant. J'ai pu ainsi profiter de la chance extraordinaire d'accéder à des échantillons de cartilages sains vivants provenant d'incroyables hommes et femmes qui ont fait le choix philanthrope de donner leur corps à la Science.

Merci à mesdames Sophie Tuffet et Alexandra Rousseau de l'URC Est pour le travail de statistiques qu'elles ont effectué sur les données de la cohorte DIGICOD et pour leur grande patience avec une novice...

Merci au Dr Alice Courties, extraordinaire collègue chercheuse rhumatologue, wonder woman du laboratoire. Merci pour ton aide et ta disponibilité pour tant de manip, et pour ton soutien. C'est un honneur de travailler avec toi.

Merci au Dr Geoffroy Nourissat de m'avoir enseigné à réaliser des DMM (déstabilisation du ménisque médial, modèle d'arthrose du genou), ce qui m'a permis d'opérer les genoux de nombreuses mignonnes souris et d'adorables rats, ce qui est amusant pour une chirurgienne de la main.

Merci à Danièle Citadelle pour ses coupes paraffine sublimes et son apprentissage des colorations du cartilage.

A Marion Millerand, qui m'a accompagné lors de mes premiers pas au laboratoire, avec une grande bienveillance.

A Xavier Houard pour sa disponibilité, son grand savoir, et son sens de l'humour.

A Natalia Zapata, Claire Attali, Maria-Luisa Perez Lozano, Kristell Wanherdrick-Beolet, Audrey Pigenet et Laure Sudre pour leur gentillesse et leur disponibilité, et à Ilhem Jaabar pour m'avoir enseigné les inclusions en OCT et les joies des coupes au cryostat.

A Indira Toillon et Charlène Delmas, doctorantes voisines de bureau, pour leur gentillesse.

A Pradeep Kumar Sacitharan pour son enthousiasme.

A Sarah Leite et Inès Kouki, adorables étudiantes de Master 2 du labo.

A mes maîtres, collègues et amis, pour leur soutien au long de ces années : Christophe Oberlin et Zoubir Belkheyar, Alain-Charles Masquelet, Jean-Marc Feron et Levon Doursounian, Bertrand Coulet et Michel Chammas, Joannie Thumser, Julien Gaillard, Emmanuel Jos, Camilo Chaves, aux « potes de la FESSH » : Alexandre Petit, Guillaume Bacle, Jennifer Laravine, Xavier Gueffier, et bien d'autres.

A toutes les fabuleuses chirurgiennes de la main: Caroline Leclercq, Sandrine Maillot, Caroline Delaroche, Violaine Beauthier-Landauer, Heba Khalifa-Dubert, Joannie Thumser (bis), Laure Pages, Meryl Dahan, Emmanuella Taïeb, Inès Saidi, Catalina Parot, Renata Paulos, Julie Chino-Smith, Sabrina Gallego, et celles à venir.

A mes parents, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, et ma sœur Zoé.

A Picouzenn, Molly et Eowyn de Millau, pour leur soutien indéfectible.

A mon Edouard, que j'aime fort.

"Point n'est besoin d'espérer pour entreprendre, ni de réussir pour persévérer." Guillaume I^{er} d'Orange, dit le Taciturne (1533-1584)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES.....	11
TABLE DES TABLEAUX	11
ABREVIATIONS.....	13
AVANT-PROPOS.....	13

INTRODUCTION

I. Les articulations diarthroses : description	15
A. Description d'une articulation	15
B. Le cartilage.....	15
1. Description générale.....	15
2. Composition cellulaire.....	16
3. La matrice extracellulaire	17
4. Organisation verticale du cartilage.....	19
5. Propriétés mécaniques du cartilage	20
6. Homéostasie du cartilage.....	20
7. Développement du cartilage : embryogenèse, développement post-natal et vieillissement.....	21
a) Embryogenèse	21
b) Modifications du cartilage au cours du vieillissement.....	24
c) Réparation du cartilage.....	25
II. L'arthrose.....	27
A. Définition.....	27
B. Epidémiologie	28
1. Un problème de santé publique	29
2. Une épidémiologie différente selon les articulations	30
3. Facteurs de risque d'arthrose	31
a) Age	31
b) Sexe	32
c) Génétique.....	32
d) Surpoids et obésité	32
e) Syndrome métabolique.....	33
f) Facteurs locaux articulaires.....	34
g) Des facteurs de risque différents selon la localisation articulaire	34
C. Clinique	36
1. Arthrose du genou	37
2. Arthrose digitale	37
D. Conséquences générales de l'arthrose.....	39
E. Diagnostic	39
F. Traitement de l'arthrose.....	41
G. Physiopathologie.....	42
1. Générale.....	42
2. Modifications du cartilage.....	43
3. Modifications synoviales.....	48
4. Modifications osseuses	48
5. Des phénotypes d'arthrose variés.....	49
a) Stress mécanique	49

b) Stress métabolique	50
c) Stress lié au vieillissement	50
6. Limites des connaissances sur la physiopathologie de l'arthrose de la main	51
III. Vieillesse tissulaire	52
A. Modifications post-traductionnelles des protéines	52
B. Produits avancés de la glycation ou Advanced Glycation End Products (AGEs)	53
C. Produits dérivés de la carbamylation des protéines	56
1. Origine	56
2. Conséquences de la carbamylation sur les propriétés des protéines	57
a) Modifications structurales des protéines	57
b) Modifications de fonction des protéines carbamylées	58
c) Modification des interactions protéine-protéine et protéine-cellule	58
3. Conséquences de la carbamylation des protéines en pathologie humaine	59
4. Utilisation comme biomarqueurs de produits dérivés de la carbamylation	61
5. Dégradation des protéines altérées	61
D. MPTNE et arthrose	62
IV. Hypothèse : des cartilages différents selon leur localisation	64
A. Rôles des facteurs extrinsèques dans le développement de l'arthrose	64
B. Rôle des facteurs intrinsèques ou endogènes dans le développement de l'arthrose	64
C. Hypothèse de travail	66
D. Objectifs du travail	67
 MATERIEL ET METHODES	
I. Matériel pour les études sur modèle cadavérique	69
V. Classification macroscopique des cartilages	70
VI. Analyse histologique des cartilages	71
A. Organisation tissulaire du cartilage	71
B. Histomorphométrie	73
C. Statistiques	73
VII. Mesure des altérations biochimiques de la matrice extracellulaire liées à l'âge ...	74
VIII. Méthodes pour l'objectif 2 : réponse biologique du cartilage non arthrosique ...	75
A. Survie cellulaire	75
A. Effet de la stimulation par IL-1β des cartilages	75
1. Rationnel de la stimulation par l'IL-1 β	76
2. Choix des protéines d'intérêt	76
B. Statistiques	76
IX. Méthodes pour l'objectif 3 : réponse biologique du cartilage arthrosique	77
A. Effet de la stimulation par IL-1β des cartilages	77
B. Statistiques	77
X. Méthodes pour l'objectif 4 : Recherche d'une association entre les taux sériques d'HCit et de CML et la gravité de l'atteinte structurale dans l'arthrose de la main	77
A. Rappel de l'objectif	78
B. Population d'étude	78
C. Critères d'analyse	78
D. Statistiques	80

RESULTATS

I. Données épidémiologiques de la série cadavérique.....	82
II. Objectif 1	84
A. Histomorphométrie des cartilages macroscopiquement et microscopiquement non arthrosiques	84
B. Mesure des altérations biochimiques de la matrice extracellulaire liées à l'âge... 86	86
1. Taux d'HCit.....	86
2. Taux de CML	88
III. Objectif 2 : Réponse biologique du cartilage sain à un stress inflammatoire par IL-1β 91	91
IV. Objectif 3 : Réponse biologique du cartilage arthrosique à un stress inflammatoire par IL-1β.....	93
V. Objectif 4 : Recherche d'une association entre la quantification de l'HCit et de la CML dans le sérum et la gravité de l'atteinte structurale du cartilage dans une cohorte de patients atteints d'arthrose de la main	95
A. Taux d'HCit et arthrose	95
1. Diagramme de flux	95
2. Taux d'HCit et caractéristiques générales de la population	97
3. Taux sérique d'HCit et arthrose érosive.....	98
4. Taux sérique d'HCit et sévérité de l'arthrose.....	100
a) Taux sérique d'HCit et score total de KL.....	100
b) Taux sérique d'HCit et symptômes.....	101
5. Concentration sérique d'HCit et autres localisations arthrosiques.....	101
C. Taux de CML et arthrose	102
1. Diagramme de flux	102
2. Taux de CML et caractéristiques générales de la population.....	102
3. Taux sérique de CML et arthrose érosive.....	103
4. Taux sérique de CML et sévérité de l'arthrose	104
a) Taux sérique de CML et score total de KL	104
b) Taux sérique de CML et symptômes	104

DISCUSSION

I. Synthèse des principales observations	105
II. Le modèle cadavérique humain : justification, avantages et inconvénients	106
III. Choix des articulations : rationnel.....	107
IV. Constatations histomorphométriques.....	109
V. Rôle des MPTNE dans la genèse de l'arthrose ?.....	109
A. Carbamylation des protéines du cartilage	110
B. Carboxyméthylation des protéines du cartilage.....	112
VI. Taux sériques d'HCit et CML et sévérité de l'arthrose des mains	112
VII. Réponse des cartilages à un stimulus pro-inflammatoire	113
VIII. IPP et genoux : 2 articulations biologiquement différentes ?.....	116
IX. Perspectives et projets	117

A.	Implications des résultats observés	117
B.	Exploration des différences entre chondrocytes	118
C.	Carbamylation et cartilage	118
X.	Conclusion	119

REFERENCES.....	119
-----------------	-----

ANNEXES

Annexe 1 : Nouveautés médicales et prise en charge chirurgicale dans l'arthrose digitale. Cambon-Binder A, Courties A. Revues du rhumatisme monographies 2021.....	149
--	-----

Annexe 2 : Cartilage non arthrosique des métacarpo-phalangiennes du sujet 4608 : aspect macroscopique et histologique	158
---	-----

Annexe 3 : Cartilage arthrosique des inter-phalangiennes proximales du sujet 4202 : aspect macroscopique et histologique	159
--	-----

Annexe 4 : Cartilage arthrosique des métacarpo-phalangiennes du sujet 4251 : aspect macroscopique et histologique.....	160
--	-----

Annexe 5 : Aspect histologique après prélèvement du cartilage d'une articulation inter-phalangienne proximale.....	161
--	-----

Annexe 6 : Courties A, Do A, Leite S, Legris M, Sudre L, Pigenet A, Petit J, Nourissat G, Cambon-Binder A, Maskos U, Berenbaum F, Sellam J. The Role of the Non-neuronal Cholinergic System in Inflammation and Degradation Processes in Osteoarthritis. Arthritis Rheumatol. 2020	162
--	-----

Annexe 7 : Courties A, Belle M, Senay S, Cambon-Binder A, Sautet A, Chédotal A, Berenbaum F, Sellam J. Clearing method for 3-dimensional immunofluorescence of osteoarthritic subchondral human bone reveals peripheral cholinergic nerves. Sci Rep. 2020.....	173
--	-----

Annexe 8: Produits dérivés de la Carbamylation dans la cohorte DIGICOD : Taux sérique d'hOmocitrulline comme biomarqueur potentiel de la sévérité structurale de l'arthrose digitale.....	179
---	-----

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Matrice extracellulaire du cartilage articulaire.	18
Figure 2 : Schéma de coupe transversale d'un cartilage articulaire sain	20
Figure 3 : Événements cellulaires et marqueurs moléculaires de la chondrogenèse, de la différenciation des chondrocytes, et du développement et de l'entretien du cartilage articulaire.....	23
Figure 4 : Caractéristiques du vieillissement des chondrocytes.	25
Figure 5 : Stades évolutifs de l'arthrose de l'articulation inter-phalangienne distale.....	28
Figure 6 : Risques relatifs d'arthrose des mains chez des patients en surpoids ou obèses.	33
Figure 7 : Signes cliniques et radiographiques des différentes localisations de l'arthrose des mains (articulations trapézo-métacarpienne, inter-phalangiennes distales et inter-phalangiennes proximales).	38
Figure 8 : Radiographie d'arthrose érosive de l'IPP.....	39
Figure 9 : Arthrose du genou gauche : vue clinique (a) et radiographies de face (a) et profil (b)	40
Figure 10 : Coupes histologiques de cartilages d'articulation métacarpo-phalangiennes saine et arthrosique	44
Figure 11 : Voies de signalisation et modifications structurelles au cours du développement de l'arthrose.....	47
Figure 12 : Représentation des principales voies biochimiques menant à la formation de l'acide isocyanique	57
Figure 13 : Aspect per-opératoire des cartilages prélevés : condyle fémoral, têtes des métacarpiens et des premières phalanges des doigts longs.....	70
Figure 14 : Coupes de cartilage de genou, de MCP et d'IPP.....	85
Figure 15 : Résultats de l'analyse histologiques des cartilages sains	85
Figure 16 : Densité des chondrocytes par couche.....	86
Figure 17 : Surface des chondrocytes.....	86
Figure 18 : Mesure de la proportion d'HCit dans des cartilages non arthrosiques et arthrosiques.....	87
Figure 19 : Mesure de la proportion d'HCit dans des cartilages d'IPP, MCP et genou, la peau et le tendon quadricipital.....	88
Figure 20 : Mesure de la proportion de CML dans des cartilages non arthrosiques et arthrosiques.....	89
Figure 21 : Corrélation entre l'âge et le taux de CML dans les cartilages non arthrosiques.....	89
Figure 22 : Mesure de la proportion de CML dans des cartilages d'IPP, MCP et genou, la peau et le tendon quadricipital.....	90
Figure 23 : Mesure de la corrélation entre les proportions d'HCit et de CML.....	90
Figure 24 : Sécrétion basale des cartilages non arthrosiques d'IPP, MCP et de genou: d'IL-6, MCP-1, MMP-3 et PGE ₂	92
Figure 25 : Sécrétion basale des cartilages arthrosiques d'IPP, MCP et de genou: d'IL-6, MCP-1, MMP-3 et PGE ₂	94
Figure 26 : Distribution de la concentration sérique de HCit	97
Figure 27 : Corrélation entre le taux d'HCit et le DFG.....	97
Figure 28 : Corrélation entre l'âge et le taux sérique de HCit.....	98
Figure 29 : Taux sérique d'HCit selon la présence ou non d'au moins une articulation érosive	99
Figure 30 : Relation entre le taux sérique d'HCit et le score de KL	100
Figure 31 : Taux sérique d'HCit selon la présence d'autres localisations d'arthrose.....	101
Figure 32 : Distribution des taux sériques de CML	102
Figure 33 : Taux sérique de CML selon la présence d'au moins une articulation érosive	103
Figure 34 : Prévalence de l'arthrose radiographique et de l'arthrose symptomatique des articulations inter-phalangiennes distales, de genou et de la hanche	115

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de mécanismes moléculaires démontrant la contribution de la carbamylation des protéines dans le développement des maladies chroniques.....	60
Tableau 2 : Principales différences entre les cartilages de genou et de cheville.....	66
Tableau 3 : Classification d'Outerbridge.....	70
Tableau 4 : Grade de Mankin.....	72
Tableau 5 : Données épidémiologiques de la série et scores d'arthrose des échantillons.....	83
Tableau 6 : Classement final des échantillons de cartilage.....	83
Tableau 7 : Diagramme de flux pour l'étude des taux d'HCit.....	95
Tableau 8 : Descriptif des facteurs de risque et des critères étudiés.....	96
Tableau 9 : Résultats des modèles de régression logistique non ajustés sur l'évènement étudié : présence d'au moins une articulation érosive.	99
Tableau 10 : Diagramme de flux pour l'étude des taux de CML.....	102

ABBREVIATIONS

ADAMS-TS: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AGEs : produits avancés de glycation
ARN : Acide ribonucléique
CCL2 : CC-chemokine ligand 2
CXCL13 : CXC-chemokine ligand 13
CML : carboxy-méthyl-lysine
DFG : débit de filtration glomérulaire
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EGF: endothelial growth factor
GAG: glycosaminoglycane
Glo-1: glyoxalase-1
GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Hcit : Homocitrulline
IGF-1: insulin growth factor 1
IL-1 β : Interleukine 1 β
IL-6 : Interleukine 6
IL-8 : Interleukine 8
IMC : indice de masse corporelle
IRM : imagerie par résonance magnétique
IPD : inter-phalangienne distale
IPP : inter-phalangienne proximale
IRM : imagerie par résonance magnétique
KCNO : Cyanate de potassium
KL : Kellgren et Lawrence
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrophotométrie de masse
LDH : Lactate Déshydrogénase
MAPK : mitogen-activated protein kinases
MCP : métacarpo-phalangienne
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MMP-3 : métalloprotéinase 3
MPO : myéloperoxydase
MPTNE: modifications post-traductionnelles, non enzymatiques
MiRNA: micro-acides ribonucléiques
NGF : Nerve growth factor
NO: Monoxyde d'azote
PG: protéoglycane
PGE₂: Prostaglandine E₂
ROS: reactive oxygen species
SASP: senescence-associated secretory phenotype
TGF- β : transforming growth factor β
TIMP : tissue inhibitor metalloproteinases
VEGF : vascular endothelial growth factor

AVANT-PROPOS

L'arthrose est un problème de santé publique et une cause majeure d'invalidité après 50 ans. Compte tenu de l'augmentation de l'espérance de vie et de l'incidence de l'obésité, l'incidence de l'arthrose tend à s'accroître. Le diagnostic de l'arthrose est fondé sur des données cliniques, associées à des méthodes d'imagerie. Son traitement reste actuellement purement symptomatique et adapté à la présentation individuelle, dans la mesure où les capacités de réparation intrinsèque du cartilage lésé sont faibles. La prise en charge des patients associe traitements médicamenteux à visée symptomatique et des traitements non pharmacologiques (perte de poids, activité physique). La chirurgie est proposée aux patients symptomatiques et qui ont répondu insuffisamment au traitement médical.

En dépit de nombreux progrès réalisés ces dernières années dans la connaissance des causes et de la pathogenèse de l'arthrose, il reste de multiples inconnues. La majorité des travaux de recherche fondamentale chez l'Homme ont été effectués à partir d'échantillons de genoux. Or l'épidémiologie de l'arthrose suggère des disparités de susceptibilité et de facteurs de risque selon les localisations articulaires.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'impact de la localisation articulaire sur la composition des cartilages et leurs réponses biologiques à un stimulus inflammatoire in vitro.

Après des rappels sur la nature du cartilage articulaire et sur l'arthrose, nous verrons quelles sont les conséquences du vieillissement sur les protéines et en quoi ces altérations pourraient jouer un rôle dans la genèse de l'arthrose.

INTRODUCTION

I. Les articulations diarthroses : description

A. Description d'une articulation

A l'inverse de la synarthrose et de l'amphiarthrose, la diarthrose est un modèle d'articulation siège d'une mobilité. Elle est constituée de deux surfaces de cartilage articulaire reposant sur un socle d'os sous-chondral, et limitée par une membrane synoviale renforcée par une enveloppe conjonctive épaisse : la capsule articulaire. La membrane synoviale sécrète le liquide synovial, au sein d'un espace articulaire clos et stérile. L'articulation est stabilisée par des ligaments collatéraux et parfois centraux tels les ligaments croisés au genou, ainsi que par des muscles. Certaines diarthroses ont de plus des fibrocartilages interposés entre les deux pièces articulaires qui en augmentent la congruence (ménisques du genou ou de l'articulation acromio-claviculaire par exemple).

Le liquide synovial est constitué essentiellement d'acide hyaluronique, long polymère de glycosaminoglycanes (GAG) non sulfatés, d'importante viscosité, aux propriétés de résistance à la compression et à l'étirement. Il contient également des ions, du glucose et des protéines plasmatiques.

B. Le cartilage

1. Description générale

Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé, dont les finalités sont la répartition harmonieuse des contraintes mécaniques au niveau des surfaces articulaires et la minimisation des forces de friction. Il est constitué d'un seul type cellulaire : les

chondrocytes, et d'une matrice extracellulaire dont les principaux composants sont l'eau (70%), le collagène de type II, et les protéoglycanes (PG). A l'état physiologique, les chondrocytes assurent la synthèse et la dégradation des composants de la matrice dans des proportions équilibrées. Cependant, ses capacités de réparation sont extrêmement limitées, ce qui le rend vulnérable aux traumatismes et altérations liées à l'âge.

Le cartilage n'est ni vascularisé ni innervé. Sa nutrition est assurée par le liquide synovial, ainsi que par l'os sous-chondral en ce qui concerne sa couche la plus profonde. Macroscopiquement, sa surface est blanche nacré, et déformable à la pression.

2. Composition cellulaire

Le chondrocyte est le seul type cellulaire constituant le cartilage, mais les études les plus récentes tendent à montrer qu'il s'agit d'une famille de cellules aux caractéristiques phénotypiques différentes (van Eegher 2021). Il s'agit de cellules ovoïdes de 30 à 40 microns de diamètre. Elles ont peu de contacts directs entre elles et ne représentent pas plus de 10% du volume du cartilage. Les chondrocytes ne migrent pas et ne prolifèrent pratiquement pas en condition normale. A l'issue du développement au cours duquel les chondrocytes subissent une différenciation extrême, ils restent bloqués en phase G0 non répliative, ce qui les « protège » de la sénescence répliative liée aux télomères (Corvol 2000).

Leur métabolisme est anaérobie, dans la mesure où la teneur en oxygène du cartilage va de 1% en profondeur à 10% en surface. A ce niveau, le métabolisme aérobie est également possible grâce à la diffusion d'oxygène à partir du liquide synovial (Chevalier 2005). Les nutriments consommés par les chondrocytes proviennent essentiellement du liquide synovial, produit à partir du plasma circulant dans les capillaires synoviaux. Ce liquide est riche en macromolécules comme l'acide hyaluronique. Il joue ainsi un rôle d'amortisseur et de lubrifiant entre les deux surfaces articulaires. La principale source d'énergie des chondrocytes est le glucose, dont les produits de dégradation participent à la synthèse des PG.

Les chondrocytes possèdent tout l'appareil de synthèse des protéines, et assurent en temps normal l'homéostasie du cartilage, en maintenant un équilibre entre production et dégradation des protéines structurales de la matrice extra-cellulaire. Ainsi, contraintes mécaniques et facteurs de croissance vont participer à la régulation de la production par les chondrocytes de protéines matricielles (PG, collagènes), de protéases (métalloprotéinases, aggrécases) et d'inhibiteurs de protéases (inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMP)).

Alors que dans le cartilage de croissance il existe un gradient de différenciation ou maturation de la profondeur vers la superficie, il semble que cela soit le contraire dans le cartilage articulaire. Les chondrocytes y sont ultra différenciés, et des progéniteurs peuvent être trouvés dans la couche superficielle (Dowthwaite 2004).

3. La matrice extracellulaire

Elle est constituée d'eau (65-80% du poids humide) et d'un réseau de macromolécules protéiques (collagènes et PG pour 20-35%) (Figure 1). On différencie la matrice péri-cellulaire, qui constitue un véritable micro-environnement et la matrice inter-territoriale. La matrice péri-cellulaire est composée de collagène de type IV, de PG, d'acide hyaluronique, de fibronectine, molécules fixées à la membrane du chondrocytes par l'intermédiaire de récepteurs dont les principaux sont les intégrines. La matrice extra-territoriale est composée essentiellement de collagène de type II et d'agrégats de PG.

Le turn-over de la matrice extracellulaire est lent : quasi absent pour les collagènes au cours de la vie de l'individu, il prend plusieurs mois pour les PG (Chevalier 1998).

Les collagènes

Les collagènes présents dans le cartilage sont les types II, VI, IX et XI. C'est leur principale localisation dans le corps, devant la cornée, l'humeur vitrée, le disque inter-vertébral (Bruckner 1994). Les fibres de collagène représentent le quart du poids du cartilage sec : elles en constituent la charpente. Le collagène II représente 95% des collagènes du cartilage. Il est organisé en fibrilles. Celles-ci sont constituées d'agrégats de molécules de collagène, elles-mêmes organisées en triple-hélices hétéro-trimériques ou homo-trimériques de chaînes α identiques ou non. Ces molécules s'assemblent en fibres grâce à des protéines de pontage à leurs extrémités. Au sein des fibrilles de collagène de type II se trouvent des fibrilles de collagène de type XI, qui participent à l'organisation tridimensionnelle des fibres. Les chondrocytes sécrètent des molécules de procollagène dont la maturation complexe aboutit aux fibres de collagène. Il existe 2 sortes de collagène II : le IIa produit dans le cartilage de croissance et le cartilage arthrosique, et le IIb produit dans le cartilage sain. La production du collagène de type II est ainsi considérée comme un marqueur des chondrocytes normaux.

Le réseau de fibres de collagène confère au cartilage sa résistance à la compression.

Les protéoglycanes

Ils sont constitués d'une protéine axiale (core protein) à laquelle sont fixés des GAG, longues chaînes polysaccharidiques. Les GAG sont constitués de la répétition d'un sucre aminé et d'un acide hexuronique chargé négativement, ce qui leur confère une charge négative et leur permet de retenir les molécules d'eau. Les plus connus sont le chondroïtine sulfate et le kératane sulfate. L'aggrecane est un grand PG constituant 95% des PG du cartilage. Il est sécrété avec ses centaines de chaînes de GAG puis se fixe à l'extérieur de la cellule sur l'acide hyaluronique et les fibres de collagène de type II. L'ensemble aggrecane/acide hyaluronique a un rôle mécanique majeur de résistance à la compression, de viscosité et d'élasticité, c'est à dire qu'il est capable de reprendre sa forme d'origine après une déformation. Il existe de plus des PG de petite taille (fibromoduline, décorine), qui peuvent se fixer à des facteurs de croissance et des intégrines, et participent à la communication entre cellules et fibres de collagène.

Enfin, la matrice extra-cellulaire contient des glycoprotéines non collagéniques : fibromoduline, fibronectine, capables de se fixer à des intégrines et aux autres composants de la matrice.

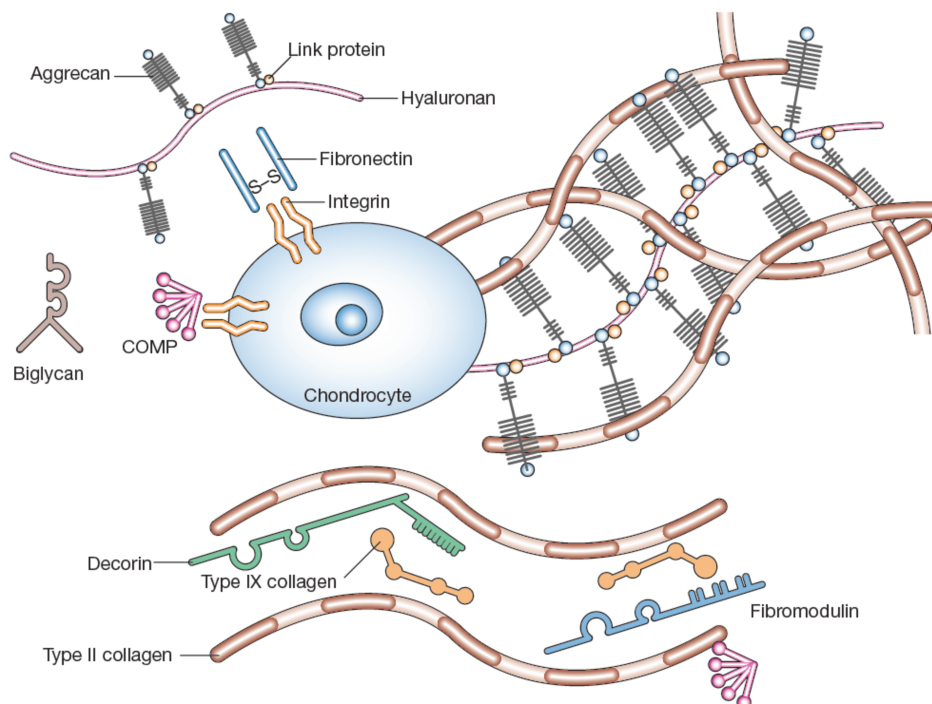


Figure 1 : Matrice extracellulaire du cartilage articulaire. L'interaction entre les protéoglycanes du cartilage, fortement chargés négativement, et le collagène de type II assure la résistance à la compression et à la traction du tissu. D'après Chen 2006.

4. Organisation verticale du cartilage

Le cartilage est organisé microscopiquement en 4 couches ou zones, de la superficie vers la profondeur, qui diffèrent de part leur composition biochimique et l'organisation de leurs fibres de collagène (Figure 2).

La couche superficielle contient de petits chondrocytes allongés dont le grand axe est parallèle à la surface. Ces cellules superficielles jouent un rôle clé dans le maintien d'un mouvement articulaire sans frottement grâce à la production d'acide hyaluronique, de phospholipides et de lubricine. Ses fibres de collagène (de type II et IX) y sont également parallèles à la surface, ce qui confère au cartilage la résistance aux forces en tension et permet de répartir les contraintes. Il est pauvre en PG. Sa surface est recouverte d'une couche lubrifiante d'acide hyaluronique et autres phospholipides, appelée la *lamina splendenda*, qui autorise la fixation de macromolécules du liquide synovial.

La couche intermédiaire possède des chondrocytes arrondis, plus grands, disposés aléatoirement. Les fibres de collagène ont des directions variées, ce qui confère à cette zone une résistance à la compression.

Dans la couche profonde, les chondrocytes, toujours arrondis, sont disposés en colonnes perpendiculairement à la surface, à l'instar des fibres de collagène. La concentration en PG y est élevée.

Le cartilage calcifié est à l'interface entre la couche profonde et l'os sous-chondral. Cette zone est pauvre en PG et collagène. Les chondrocytes y sont hypertrophiques, et se caractérisent par leur expression des gènes codant pour RunX, la MMP-13, le collagène de type X mais non de type II (caractéristique du cartilage articulaire), ainsi que la phosphatase alcaline, impliquée dans la minéralisation de la matrice (Mahjoub 2012, Houard 2013). La zone calcifiée est vascularisée et innervée. Elle est séparée de la couche profonde par une ligne de démarcation basophile ondulée appelée *tide mark*, qui constitue une barrière à la pénétration de vaisseaux sanguins dans le cartilage.

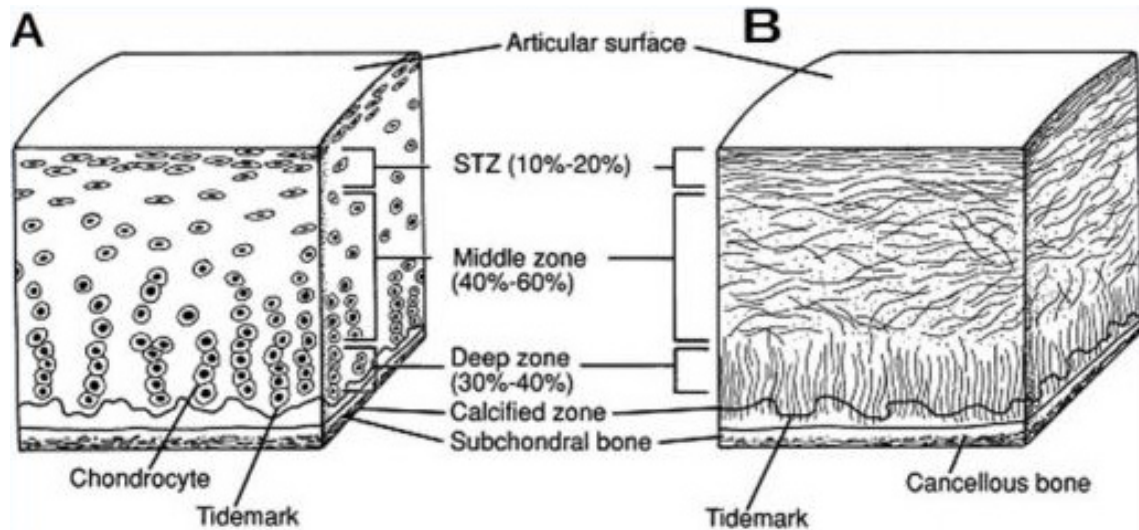


Figure 2 : Schéma de coupe transversale d'un cartilage articulaire sain : organisation cellulaire dans les zones du cartilage articulaire (A) et architecture des fibres de collagène (B). Issu de Buckwalter 1994.

5. Propriétés mécaniques du cartilage

Les propriétés mécaniques de résistance et de rigidité sont en lien avec le réseau de fibres de collagène, tandis que l'élasticité est liée à l'hydrophilie des agrégats de macromolécules acide hyaluronique/PG. La déformabilité du matériau est permise par le déplacement des molécules d'eau au sein de celui-ci. En pratique, le cartilage sert d'amortisseur aux épiphyses osseuses qui s'articulent. Son faible coefficient de friction autorise leur glissement harmonieux.

6. Homéostasie du cartilage

L'homéostasie du cartilage correspond à l'équilibre entre la production de matrice extra-cellulaire par les chondrocytes et sa dégradation. Elle dépend d'un équilibre entre la sécrétion de facteurs anaboliques d'un côté (facteurs de croissance), et de facteurs cataboliques de l'autre côté : protéases, cytokines (IL-8, PGE₂)(Gosset 2008).

De multiples études biomécaniques *in vitro* ont montré que des contraintes de compression cycliques d'intensité faible avaient un effet anabolique sur les chondrocytes,

tandis qu'une absence de contraintes, ou à l'inverse des contraintes excessives ponctuelles ou cycliques étaient délétères. A l'échelle cellulaire, le chondrocyte est ainsi sensible aux stimulations mécaniques, via ses communications avec la matrice extra-cellulaire grâce aux mécanotransducteurs que sont les intégrines en particulier, et à son cil, porteur entre autres mécanorécepteurs du récepteur à l'acide hyaluronique le CD44 (Millward-Sadler 2004, Muhammad 2012).

7. Développement du cartilage : embryogenèse, développement post-natal et vieillissement

a. Embryogenèse

Le squelette appendiculaire provient du mésoblaste de la lame latérale. Les bourgeons des membres supérieur et inférieur apparaissent aux 24^{ème} et 28^{ème} jour. L'axe mésenchymateux croît, recouvert de la coiffe ectodermique. Le bourgeon est recouvert de la crête ectoblastique apicale, responsable de la différenciation du membre. Entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine se produit une condensation centrale cartilagineuse sous la dépendance du gène SOX 9, constituée de cellules mésenchymateuses. Au niveau des futures articulations est présent du collagène de type IIA. Les structures articulaires apparaissent en effet in situ. L'ossification endochondrale nécessite la formation d'une maquette cartilagineuse. Les cellules issues du mésenchyme indifférencié vont se différencier en chondrocytes pour former le cartilage qui va servir de guide pour le processus d'ossification par les ostéoblastes (Figure 3). Ce processus d'ossification concerne les os de la base du crâne, le rachis et le squelette des membres. A l'inverse, l'ossification endomembraneuse ne fait pas intervenir de maquette cartilagineuse. Elle permet, à partir du mésenchyme indifférencié, la production directe d'ostéoblastes. Ce processus d'ossification concerne les os de la voûte du crâne, les os de la face en particulier la mandibule et les maxillaires, et une partie de la clavicule. Au fur et à mesure de l'élongation du membre, le mésenchyme sous-jacent commence à se différencier en chondrocytes. Progressivement, des centres de chondrification apparaissent le long du membre en croissance et permettront la formation des différents os du membre. Au sein de ces maquettes cartilagineuses, on va donc avoir un processus d'ossification endochondrale. L'ossification débute vers la 8^{ème} semaine de vie embryonnaire. Les pièces

osseuses sont divisées en 3 parties. Dans l'épiphyse, constituée de cartilage, les chondrocytes prolifèrent puis ils vont devenir hypertrophiques. Au fur et à mesure qu'on se rapproche de la métaphyse, les chondrocytes deviennent de plus en plus hypertrophiques. La métaphyse correspond à la zone d'ossification. Elle contient le cartilage de conjugaison de l'os. L'os y croît en longueur.

A l'emplacement des futures articulations, l'interzone est initialement constituée de cellules mésenchymateuses aplaties (Decker 2018). L'interzone subit une cavitation à partir de la 8^{ème} semaine, consécutive à l'apoptose des cellules et la dégradation de la matrice extra-cellulaire, tandis que la capsule articulaire, ligaments et éventuels ménisques s'individualisent

À la naissance, le cartilage articulaire se présente sous la forme d'un tissu dense constitué de petites cellules dans une matrice peu abondante (Decker 2018). Au cours de la vie postnatale, le tissu subit d'importants changements structurels, augmentant son épaisseur et acquérant une organisation zonale distincte. Les premières études ont suggéré qu'une région de cellules en prolifération « sous-jacente à la surface de glissement de l'articulation » était responsable de la croissance interstitielle du cartilage articulaire et de l'augmentation de l'épaisseur de la surface articulaire (Mankin, 1962). Plus tard, d'autres auteurs ont émis l'hypothèse qu'il existait des cellules prolifératives dans la zone superficielle, principalement responsables de la croissance appositionnelle et latérale du cartilage articulaire après la naissance (Archer 1994), tandis que des cellules de la couche profonde avaient également des capacités prolifératives permettant l'épaississement du cartilage (Hunziker 2007). A la naissance, les fibres de collagènes ont une orientation anisotropique dans la matrice, puis celle-ci va progressivement subir une réorientation jusqu'à donner l'organisation du cartilage mature (Hugues 2005). Après la naissance, le volume des chondrocytes augmente tandis que la densité cellulaire diminue et que la production de matrice extra-cellulaire s'accroît. Enfin, il semble qu'à l'inverse du cartilage mature, le cartilage immature possède des propriétés de réparation (Namba 1998).

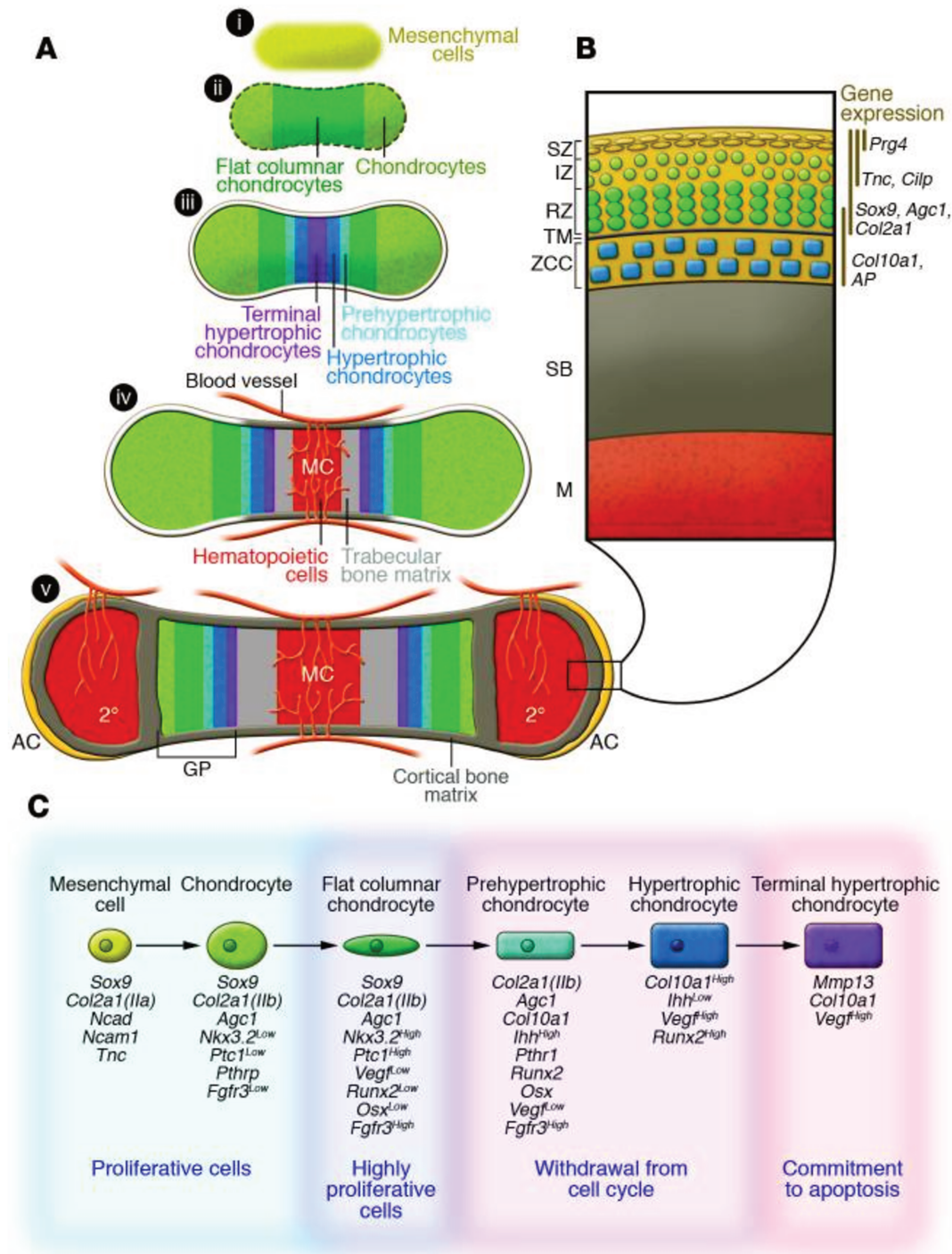


Figure 3 : Événements cellulaires et marqueurs moléculaires de la chondrogenèse, de la différenciation des chondrocytes, et du développement et de l'entretien du cartilage artériel.

(A) Modèle de développement de l'os endochondral commençant par la condensation des cellules mésenchymateuses (i), la différenciation des chondrocytes et le développement de la matrice cartilagineuse (ii), la maturation et l'hypertrophie des chondrocytes (iii), l'invasion vasculaire et l'initiation de l'os cortical et trabéculaire (iv), et enfin la génération des centres secondaires d'ossification qui séparent les cartilages artériel et de croissance pendant le développement osseux postnatal (v). MC : cavité médullaire. (B) Représentation graphique des zones cellulaires distinctes dans le cartilage artériel postnatal. IZ : zone intermédiaire ; RZ, zone intermédiaire ; TM, tide mark ; ZCC : zone de cartilage calcifié ; SB : os sous-chondral. (C) Principaux gènes exprimés à chaque étape de la différenciation des chondrocytes. Issu de Zuscik 2008.

b. Modifications du cartilage au cours du vieillissement

Si le vieillissement est un facteur de risque d'arthrose établi, cela ne signifie pas que tous les sujets âgés ont de l'arthrose. Cependant, le vieillissement normal s'accompagne de modifications des cartilages (Figure 4).

Macroscopiquement, les lésions asymptomatiques telles des ulcérations peuvent apparaître.

A l'échelle histologique, des modifications qualitatives et quantitatives des composants de la matrice extracellulaire se produisent (Chevalier 2005). Les quantités d'eau et de collagène de type II diminuent dans le cartilage. De plus, les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire se modifient avec l'âge, en raison de modifications des composants protéiques liées au vieillissement (voir chapitre III), et de sa minéralisation par dépôt de cristaux de pyrophosphate et d'hydroxyapatite (Terkeltaub 2001). Hudelmaier a étudié la déformabilité du cartilage fémoro-patellaire chez 30 volontaires sains âgés de 50 à 78 ans et 12 âgés de 20 à 30 ans. Il a observé que la déformabilité du cartilage de la rotule, évaluée par la diminution de son épaisseur vue en IRM après 30 agenouillements, était réduite avec l'âge de 2.6% chez les femmes et 2.2% chez les hommes (Hudelmaier 2001).

Le turn-over de la matrice est ralenti, du fait d'une baisse de la synthèse de ses composants, et d'une résistance à l'action des enzymes (deGroot 1999, Verzijl 2002). La sécrétion de PG par les chondrocytes diminue (Verbruggen 2000). Les chondrocytes vieillissants sécrètent plus de métalloprotéinases en réponse à un stimulus pro-inflammatoire (Dozin 2002, Forsyth 2005). Sous l'influence de facteurs de croissance comme le TGF- β , ils synthétisent moins d'aggrécane et prolifèrent moins *in vitro* (Guerne 1995). *In vitro*, les contraintes mécaniques appliquées sur une matrice extracellulaire âgée entraînent des microfractures en son sein, ce qui provoque chez les chondrocytes une tentative de réparation se soldant par une prolifération et une mort par apoptose (D'Lima 2001). Leurs capacités de réparation du cartilage après un traumatisme sont diminuées (Marcacci 2005).

Au total, les cellules sénescentes sécrètent un ensemble de médiateurs appelé SASP - (senescence-associated secretory phenotype), comprenant des cytokines pro-inflammatoires, des chémokines et des protéases, similaires à celles sécrétées par des chondrocytes arthrosiques (Vinatier 2018, Kuilman 2010).

En pratique, il semble qu'il y ait un continuum entre le cartilage âgé et l'arthrose liée à l'âge (Berlin 2019).

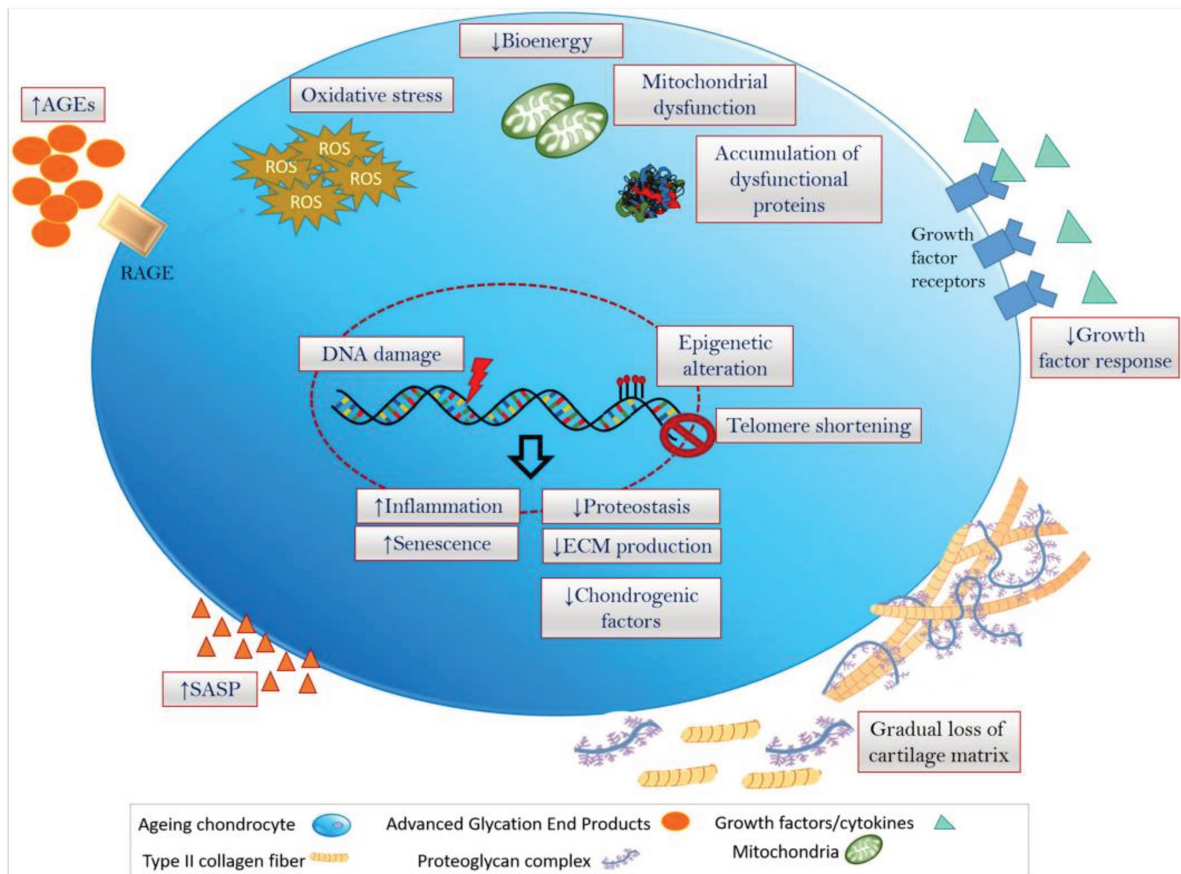


Figure 4 : Caractéristiques du vieillissement des chondrocytes. Inflammation, stress oxydatif (production excessive et accumulation de ROS) et sénescence sont des événements fondamentaux associés à l'apparition du vieillissement cellulaire et aux troubles dégénératifs associés au vieillissement. Issu de Ramasamy 2021.

c. Réparation du cartilage

Qu'il s'agisse des altérations du cartilage liées au vieillissement ou de lésions traumatiques, les capacités de régénération intrinsèques du tissu sont pauvres et le cartilage perdu est généralement remplacé par un tissu fibreux cicatriciel structurellement et fonctionnellement inférieur. Le cartilage mature se caractérise par le faible taux de prolifération des chondrocytes et le faible turn-over de la matrice extra-cellulaire dont les composants ont une demi-vie longue. Cependant, plusieurs études ont montré que la couche superficielle du cartilage adulte contenait des cellules aux capacités progénitrices (Williams 2010), et qu'à un stade débutant d'arthrose il existait une prolifération cellulaire dans cette même couche (Rollauffs 2010). Il semble également que la synoviale contienne des cellules progénitrices capables de répondre à une lésion cartilagineuse (Decker 2018). A l'heure

actuelle il n'existe pas encore de traitement susceptible de conduire à une reconstruction du cartilage lésé, mais de nombreux efforts de recherche ont été faits dans ce sens (Cucchiari 2015).

II. L'arthrose

A. Définition

L'arthrose est une maladie articulaire chronique et progressive conduisant à la destruction du cartilage. L'arthrose associe une dégradation du cartilage articulaire, une inflammation synoviale, un remodelage de l'os sous-chondral et le développement d'ostéophytes. Son diagnostic est radio-clinique. Les critères cliniques ont été définis pour chaque articulation par le Collège Américain de Rhumatologie (American College of Rheumatology)(Altman 1990). Le symptôme au premier plan est la douleur, classiquement d'horaire mécanique : aggravée par l'effort et soulagée par le repos. Les critères radiologiques sont un pincement articulaire associé à des signes de remodelage de l'os sous-chondral : ostéocondensation localisée, géodes, et ostéophytes (Figure 5). Cependant, il n'existe pas de parallélisme strict entre la gravité de l'atteinte radiologique et l'intensité des symptômes.

L'arthrose touche l'ensemble de l'articulation : le cartilage articulaire, l'os sous-chondral, les ligaments et la capsule, la membrane synoviale et les muscles péri-articulaires (Brandt 2006). Les altérations des ligaments collatéraux, visibles en IRM dès les tout premiers stades d'arthrose des mains suggèrent leur implication dans le processus pathologique à un stade précoce (Tan 2006). Des lésions ligamentaires peuvent conduire à une instabilité articulaire, source d'arthrose, et la déstabilisation du ménisque médial est un des principaux modèles inducteurs d'arthrose du genou chez le rongeur (Glasson 2007). De même, les muscles périarticulaires, grâce à leur tonus et à leurs contractions coordonnées, permettent de stabiliser les articulations et de réduire les contraintes qu'elles subissent. Leur atrophie peut constituer un risque d'arthrose (Slemenda 1997). L'os sous-chondral quant à lui, est le siège de micro-fractures et d'une réactivation de l'ossification endochondrale.

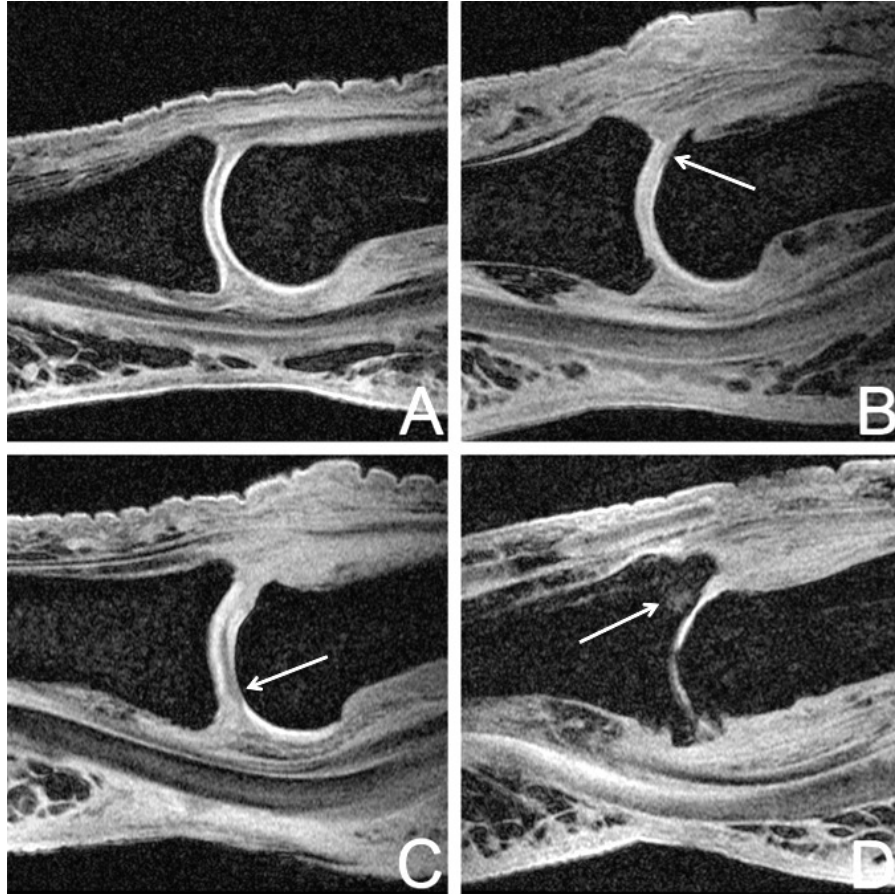


Figure 5 : Stades évolutifs de l'arthrose de l'articulation inter-phalangienne distale (IPD), vus sur des coupes sagittales d'IRM de patients différents. A : aucun dommage au cartilage. B : zone focale d'amincissement du cartilage visible sur la face dorsale de la tête de la deuxième phalange. C : zone d'amincissement complet du cartilage visible sur la tête de la deuxième phalange. D : destruction quasiment complète du cartilage, avec contact osseux, ostéophytes et œdème médullaire à la face dorsale de la base de la phalange distale. Issu de Slatzherr 2019.

B. Epidémiologie

L'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente de l'appareil locomoteur. Elle touche plus de 10 millions de Français et constitue un problème de santé publique du fait du vieillissement de la population et de la prévalence de l'obésité. Elle est une cause majeure d'incapacité chez le sujet âgé. Ses principales localisations sont le rachis, la main, le genou et la hanche.

Il est difficile d'évaluer simplement la prévalence de l'arthrose, dans la mesure où elle dépend de la définition utilisée : clinique ou radiographique. Les données varient suivant la

zone géographique étudiée, l'âge de la population d'enquête et la distribution du sexe dans celle-ci (Pereira 2011). La prévalence radiographique est bien plus importante que la prévalence de l'arthrose symptomatique, qu'elle que soit sa localisation. Les trois premières localisations périphériques d'arthrose (excluant par définition l'arthrose rachidienne) sont par ordre de prévalence clinique le genou, les mains et la hanche (Hunter 2019). Parmi les patients qui présentent une localisation d'arthrose symptomatique, 26,8% ont une polyarthrose, c'est à dire de l'arthrose de plusieurs localisations articulaires (Turkiewicz 2014). Par ailleurs, le nombre de patients âgés allant en croissance dans les populations occidentales en particulier, les projections envisagent une augmentation du nombre de cas d'arthrose diagnostiqués de 12% d'ici 2040 (Turkiewicz 2014).

Les registres de plusieurs pays européens ont permis d'estimer l'incidence de l'arthrose et de mettre en évidence l'influence de l'âge et du sexe féminin sur celle-ci. Ainsi, on observe une augmentation de l'incidence à partir de 50 ans avec un pic d'incidence vers 75 ans, plus important chez les femmes (Prieto-Alhambra 2014).

1. Un problème de santé publique

A l'échelle mondiale on estime qu'actuellement 250 millions de personnes sont touchés par l'arthrose (Hunter 2019). L'arthrose a un impact majeur sur les coûts des soins de santé : en Espagne, les coûts liés à l'arthrose du genou et de la hanche s'élevaient à plus de 4,7 millions d'euros en 2007, ce qui équivalait à 0,5 % du produit national brut cette même année (Loza 2009). Ces dépenses incluent des coûts directs liés aux soins relatifs aux remplacements prothétiques, et des coûts indirects bien supérieurs, liés quant à eux aux arrêts de travail prolongés, aux départs anticipés à la retraite et baisses consécutives de pouvoir d'achat (Schofield 2018).

En terme de handicap, l'arthrose (de genou en premier lieu) constitue la quatrième cause d'années de vie avec handicap (Woolf 2003). Avec le diabète, elle est responsable de la principale augmentation du nombre d'années de vie avec handicap, en raison du vieillissement de la population d'une part, et de l'épidémie d'obésité d'autre part (GBD 2015).

2. Une épidémiologie différente selon les articulations

L'arthrose primitive ne touche pas toutes les articulations de manière égale : articulations inter-phalangiennes des doigts, genou et hanche sont fréquemment touchées tandis que les articulations tibio-talienne ou métacarpo-phalangienne le sont rarement, essentiellement dans un contexte post-traumatique ou de maladie rhumatismale inflammatoire, c'est-à-dire dans le cadre d'arthrose dite secondaire.

Les mesures de prévalence dans la population ne sont pas simples, vu la faible concordance entre arthrose clinique et arthrose radiographique d'une part, et l'absence de consensus entre les études concernant la définition d'une arthrose radiographique d'autre part (Hart 1994). De plus, les études choisissent des tranches d'âge différentes, ce qui complexifie les comparaisons. Abraham, dans une étude échographique de 311 individus âgés en moyenne de 63 ans, retrouvait 78% d'atteinte à la main, 30% au genou et 41% à la hanche (Abraham 2014). L'étude de la cohorte de Framingham retrouvait 31% d'arthrose de genou dans une population de 74 ans en moyenne (Feslon 1987). L'étude par Cole de cartilages de sujets ayant donné leur corps à la Science retrouvait une atteinte de la cheville inférieure à celle du genou (2005).

La prévalence de l'arthrose radiologique de genou après 50 ans varie entre 15 et 67% selon les études, tandis que l'arthrose symptomatique varie entre 10 et 25 % (Pereira 2011). La prévalence de l'arthrose radiographique de hanche varie entre 1 et 15% après 60 ans (Pereira 2011).

A la main, toutes les articulations ne sont touchées pas pareillement : la plus fréquemment atteinte est l'articulation inter-phalangienne distale (70%) devant l'articulation trapézo-métacarpienne (40%), l'inter-phalangienne proximale (IPP) de l'index (23%) et la métacarpo-phalangienne (MCP) de l'index (10%) (Abraham 2014). De plus, tandis que l'arthrose de la main était isolée chez 31% des individus de la cohorte d'Abraham, seuls 2% et 3% d'entre eux, respectivement, avaient une arthrose isolée du genou ou de la hanche.

Le Medical Research Council's National Survey of Health and Development, organisme anglais, a étudié la prévalence de l'arthrose clinique à la main chez 1519 femmes et 1467 hommes âgés en moyenne de 53 ans (Poole 2003). La prévalence de l'arthrose de l'IPD, la trapézo-métacarpienne et l'IPP étaient respectivement de 21, 12 et 8% chez les femmes, 14, 8 et 4% chez les hommes.

Il existe peu d'études portant sur l'arthrose des mains qui intègrent les MCP. D'ailleurs, il n'y

a pas de classification diagnostique radiographique portant sur l'arthrose des MCP : l'atlas de l'Osteoarthritis Research Society International (Altman 2007), et la classification de Verbruggen (2010) ne les prennent pas en compte. Addimanda s'y est spécifiquement intéressée (2017). Dans une étude de 368 patients âgés en moyenne de 68 ans ayant une arthrose de la main diagnostiquée cliniquement et radiographiquement, moins de 3% des sujets avaient une arthrose des MCP avec un score de Kellgren-Lawrence supérieur à 2 (Kellgren 1957). De plus, le suivi de 44 patients pendant 4 ans a permis de montrer que la progression de l'atteinte radiologique des MCP atteintes à l'inclusion était très faible. De son côté, Dahaghin a observé que 8,2% des articulations de la main atteintes d'arthrose étaient des MCP (2005). Ce chiffre était de 11,9% chez les hommes et 6,8% des femmes dans l'étude de Haugen (2011). Par ailleurs, lorsqu'elles sont atteintes, les MCP le sont rarement seules : dans 86% des cas d'autres articulations de la main sont touchées (Dahaghin 2005). Autrement dit, les patients ayant de l'arthrose des MCP ont généralement une atteinte arthrosique globale et avancée de la main (Kouki 2021, Hurnakova 2019).

La trapézo-métacarpienne est seule impliquée dans 35% des cas, ce qui fait suspecter aux auteurs que des facteurs mécaniques joueraient un rôle plus important que des facteurs systémiques aux trapézo-métacarpiennes, et vice versa au niveau métacarpo-phalangien.

3. Facteurs de risque d'arthrose

a. Age

Le premier facteur de risque d'arthrose est l'âge, probablement en raison des altérations biologiques et tissulaires dues au vieillissement des articulations, et à l'exposition cumulative aux différents autres facteurs de risque mécaniques ou métaboliques. Ainsi, dans une cohorte hollandaise de 82 sujets âgés de 90 ans, seuls 16% n'avaient pas d'atteinte radiographique arthrosique aux hanches, genoux et moins de 3 articulations des mains atteintes (Goekoop 2011).

b. Sexe

Les femmes sont plus à risque d'arthrose que les hommes, toutes articulations confondues (Allen 2015). Le rôle de la carence oestrogénique au moment de la ménopause est évoqué (Hussain 2018).

c. Génétique

La génétique est un facteur de risque majeur, facilement mis en évidence par l'observation de familles ou de jumeaux : on estime que la génétique est responsable à hauteur de 40 à 80% dans la genèse de l'arthrose (Spector 2004). De nombreux polymorphismes génétiques ont été associés à l'arthrose, et des facteurs épigénétiques et les miRNA ont très certainement un rôle dans le risque d'arthrose (van Meurs 2016). Nombreux d'entre eux semblent spécifiques d'une localisation anatomique voire du genre. De plus, il existe certaines mutations uniques, rares, qui engendrent des tableaux d'arthrose pluri-articulaire sévères et d'apparition précoce dans la vie. L'arthrose du sujet âgé, quant à elle, est plutôt le fait de multiples variants génétiques associés à d'autres facteurs mécaniques ou métaboliques (van Meurs 2016).

d. Surpoids et obésité

De nombreuses études ont montré que l'obésité constituait un facteur de risque majeur d'arthrose, en particulier aux articulations portantes comme le genou. Ainsi, dans la méta-analyse de Zheng, le surpoids (défini par un indice de masse corporelle entre 25 et 30 kg/m²) augmentait d'un facteur 2,45 le risque d'arthrose du genou, tandis que l'obésité (indice de masse corporelle supérieur à 30 kg/m²) l'augmentait d'un facteur 4,55 (Zheng 2015). L'obésité constitue également un facteur de risque pour l'arthrose des mains (Yusuf 2010).

Il est généralement admis que la surcharge mécanique en tant que telle n'est pas le seul mécanisme causal et l'existence d'un état inflammatoire de bas-grade associé à l'obésité, en rapport avec les nombreuses adipokines et cytokines libérées par le tissu adipeux, est également incriminée (Wang 2018). Il n'est pas évident au genou de faire la part entre l'effet mécanique de la surcharge pondérale, majeur, et l'effet métabolique, trop discret pour être identifié. Cet effet est préférentiellement étudié au niveau d'articulations non portantes

comme la main, mais pour l'instant le lien entre adipokines (leptine ou adiponectine) et arthrose des mains est contradictoire d'une étude à l'autre (Yusuf 2012)(Figure 6).

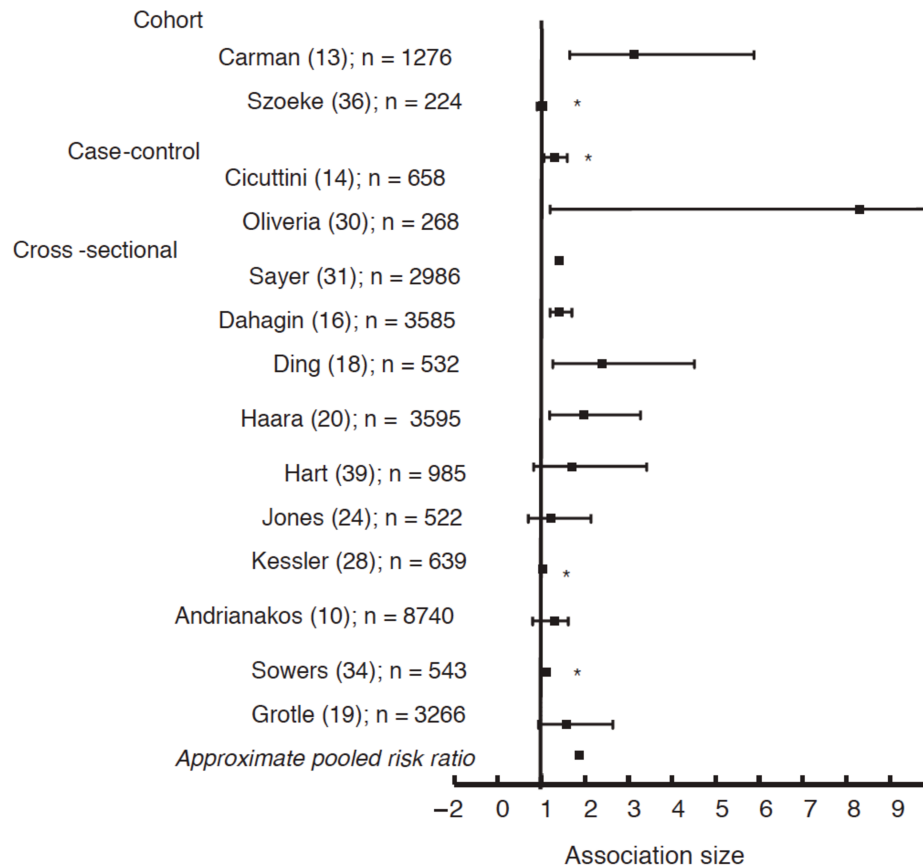


Figure 6 : Risques relatifs d'arthrose des mains chez des patients en surpoids ou obèses. Issu de la méta-analyse de Yusuf (2010).

e. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique associe obésité abdominale, dyslipidémie, hyperglycémie avec insulino-résistance et hypertension artérielle. Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre syndrome métabolique et arthrose (Yoshimura 2012). Il existe également une association entre arthrose et dyslipidémie bien que les mécanismes physiopathologiques n'ont pas été clarifiés (Baudart 2017), ainsi qu'entre arthrose et diabète sucré (Louati 2015).

f. Facteurs locaux articulaires

De nombreuses anomalies architecturales articulaires prédisposent à l'arthrose, en générant un surcroît localisé de contraintes mécaniques. Ainsi, la dysplasie fémorale proximale et celle du cotyle conduisent à un coxarthrose précoce, tandis que les anomalies d'axe mécanique du membre inférieur (axe Hip-Knee-Ankle) augmentent le risque d'arthrose d'un des compartiments fémoro-tibiaux (Tanamas 2009).

Les traumatismes articulaires constituent également un facteur de risque d'arthrose, en particulier un antécédent de ménisectomie ou une rupture du ligament croisé antérieur pour le genou (Eckstein 2015).

Les contraintes mécaniques excessives induites par certains sports augmentent également le risque d'arthrose : en particulier au genou le football, le marathon, la lutte et l'haltérophilie (Driban 2017).

g. Des facteurs de risque différents selon la localisation articulaire

Les facteurs de risque diffèrent selon l'articulation considérée, même si certains facteurs génétiques et l'âge sont communs à toutes. L'effet de l'âge est particulièrement clair au genou et à la hanche, avec un pic d'incidence entre 70 et 75 ans (dans une population espagnole) tandis que le pic est autour de la ménopause entre 50 et 55 ans pour l'arthrose des mains (Prieto-Alhambra 2014).

Les principaux facteurs de risque **au genou** sont le sexe féminin, l'obésité, les antécédents traumatiques (lésions méniscales ou ligamentaires), les anomalies d'axe mécanique au membre inférieur (genu varum ou genu valgum) et certaines professions (où le travailleur est agenouillé ou soulève des charges lourdes) ou sports (course à pied, football, hockey) (Silverwood 2015, Brouwer 2007, Driban 2017). L'obésité est impliquée à deux titres : elle augmente considérablement les contraintes mécaniques au genou, et elle s'accompagne le plus souvent d'un syndrome métabolique qui joue un rôle surajouté (Sowers 2009).

A la hanche, obésité et sexe féminin sont des facteurs de risque moins importants que les anomalies de l'architecture osseuse : dysplasie acétabulaire et fémorale proximale exposent particulièrement les patients d'âge jeune ou moyen (Saber Hosnijeh 2017). Certains

sports tels la danse classique, pratiqués intensivement pendant la croissance, peuvent induire un conflit fémoro-acétabulaire puis une arthrose de hanche par effet came (Agricola 2013). Les travaux lourds tels les métiers du bâtiment constituent également un facteur de risque.

A la main, et plus précisément au niveau des articulations inter-phalangiennes, les principaux facteurs de risque sont le sexe féminin, les antécédents familiaux et le travail manuel lourd ou répété (Kalichman 2010).

Bien que composée d'articulations non portantes, la main subit des contraintes mécaniques non négligeables. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré que les contraintes mécaniques en compression s'exercent principalement sur les articulations proximales à la main : MCP et IPP, lors de la prise d'objets, l'ouverture d'un pot, le port de charge (An 1985, Moran 1985). La pression était également particulièrement importante au niveau de la colonne du pouce, avec un maximum de contraintes en compression évaluées à 120 kg (Cooney 1977).

En ce qui concerne les facteurs de risque mécaniques, ils varient suivant la localisation à la main. Les principaux étudiés ont été la force, l'activité professionnelle et la latéralité. Ainsi, dans l'étude de Chaisson portant sur 746 individus de la cohorte de Framingham, âgés en moyenne de 53 ans, la force de grasp (ou de prise globale de la main) avant l'apparition de l'arthrose augmentait significativement le risque de développer de l'arthrose des MCP chez les hommes et les femmes, évaluée radiologiquement (Chaisson 2000). Par contre, la force de grasp n'était associée à un sur-risque d'arthrose des IPP et de la trapézo-métacarpienne que chez les hommes. Les auteurs attribuaient cette différence à la force de grasp plus importante chez les hommes que chez les femmes. Enfin il n'y avait pas de lien observé entre le grasp et l'arthrose de l'IPD.

D'autres auteurs ont observé qu'un travail manuel lourd pouvait constituer un risque de développer une arthrose des MCP (Williams 1987, Kouki 2021).

Rossignol a montré que les professions les plus manuelles comportaient un risque accru d'arthrose de la main : ménage et industrie textile pour les femmes, travailleurs du bâtiment chez les hommes, agriculteurs des deux sexes (Rossignol 2003).

L'utilisation de baguettes constitue un risque de développer de l'arthrose des doigts impliqués dans leur maniement (inter-phalangienne du pouce, MCP et IPP des deuxième et troisième rayons)(Hunter 2004).

Cependant, il n'a pas été observé que la main dominante était plus sujette à développer de l'arthrose (Lane 1989, Haugen 2011).

Les facteurs de risque systémiques et métaboliques sont considérés comme majeurs à la main. Ainsi, la prévalence de dyslipidémie chez les patients ayant de l'arthrose de main est de 37%, versus 27% au genou (Baudart 2017). De plus, plusieurs méta-analyses ont montré que le surpoids augmentait le risque d'arthrose de la main avec un odds ratio moyen de 1,9 (Yusuf 2010, Jiang 2016) versus supérieur à 2,5 pour le genou (Blagojevic 2010). Certains auteurs en ont conclu que le syndrome métabolique jouerait un rôle dans la physiopathologie de l'arthrose digitale, puisqu'on imagine difficilement le surpoids être à l'origine d'une surcharge mécanique à la main, contrairement au genou. En faveur de cette hypothèse, on retrouve l'étude de Tomi (Tomi 2016) qui portait sur l'arthrose de la main dans une population de patients VIH, qui présente la particularité d'être sujette au syndrome métabolique tout en étant exempte de surpoids. Le risque d'arthrose de la main, et sa sévérité, étaient significativement liés à la présence d'un syndrome métabolique. Par ailleurs, l'étude de la cohorte NEO (Netherlands Epidemiology Obesity) a montré qu'après ajustement par le poids, la présence d'un syndrome métabolique n'était plus un facteur de risque significatif d'arthrose du genou, contrairement à la main (Visser 2015)

Enfin il existe de multiples facteurs génétiques à la main, dont les polymorphismes de MATN3 (codant pour une protéine matricielle extracellulaire non collagénique, la matriline 3, impliquée dans le développement du cartilage), A2BP1, l'aggrecane VNTR, IL1B 5810 (polymorphisme d'un seul nucléotide du gène codant pour l'IL-1 β), MS alpha1-antitrypsine, HLA-DRB1*07 (Kloppenburg 2011, Stern 2003). Au total, l'héritabilité de l'arthrose des mains atteint 60% (Marshall 2018).

C. Clinique

L'arthrose peut entraîner douleurs, dérouillage matinal, raideur, épanchements articulaires à répétition, déformations articulaires, sensations d'instabilité et, selon sa localisation anatomique, troubles de la marche ou de la préhension (Dahaghin 2005), pouvant aboutir à une perte d'autonomie.

La douleur constitue la première plainte des patients. Elle est le premier facteur décisionnel thérapeutique. Elle est initialement de rythme mécanique c'est-à-dire déclenchée par la mobilisation de l'articulation considérée mais peut devenir semi-permanente avec l'évolution de la maladie et avoir des répercussions psychologiques. Son intensité est peu

corrélée à la sévérité de l'atteinte architecturale vue à l'imagerie (Bedson 2008). Au contraire, l'importance de la synovite et des lésions médullaires osseuses visualisées à l'IRM semblent corrélées à l'intensité de la douleur (Zhang 2011). Il semble que la douleur nociceptive consécutive aux lésions tissulaires et à l'inflammation synoviale s'associe chez 23% des patients arthrosiques à des douleurs de type neuropathiques (French 2017).

1. Arthrose du genou

L'arthrose du genou se manifeste par des douleurs mécaniques, avec des phases de poussées accompagnées d'épanchement articulaire, un enraidissement progressif de l'articulation et un retentissement fonctionnel qui peut être important sur la marche, l'usage des escaliers, et donc l'autonomie.

2. Arthrose digitale

Parmi les individus montrant des signes radiologiques d'arthrose digitale, 20 % en souffrent, sous la forme de douleurs mécaniques pouvant toucher tous les doigts. L'atteinte des articulations IPD est la forme la plus fréquente, suivie de l'arthrose de la base du pouce. L'arthrose digitale se traduit par le développement, à bas bruit, de tuméfactions nodulaires des IPD, parfois douloureuses, entraînant des déformations importantes : les nodules d'Heberden (Figure 7). L'atteinte des articulations IPP est moins fréquente et caractérisée par les nodules de Bouchard. Ces nodosités correspondent à des ostéophytes et un épaissement capsulo-synovial. On observe également fréquemment des kystes mucoïdes à la face dorsale de l'IPD, qui communiquent avec l'articulation et qui peuvent se compliquer d'arthrite s'ils s'ulcèrent.

L'arthrose digitale peut être invalidante par les douleurs, la gêne fonctionnelle et la gêne esthétique qu'elle entraîne (Kjeken 2005, Hodkinson 2012). L'évolution montre une régression et une diminution des douleurs avec le temps au prix de l'installation de nodules, parfois déformants, possiblement handicapants sur le plan fonctionnel dans les gestes de la vie quotidienne.

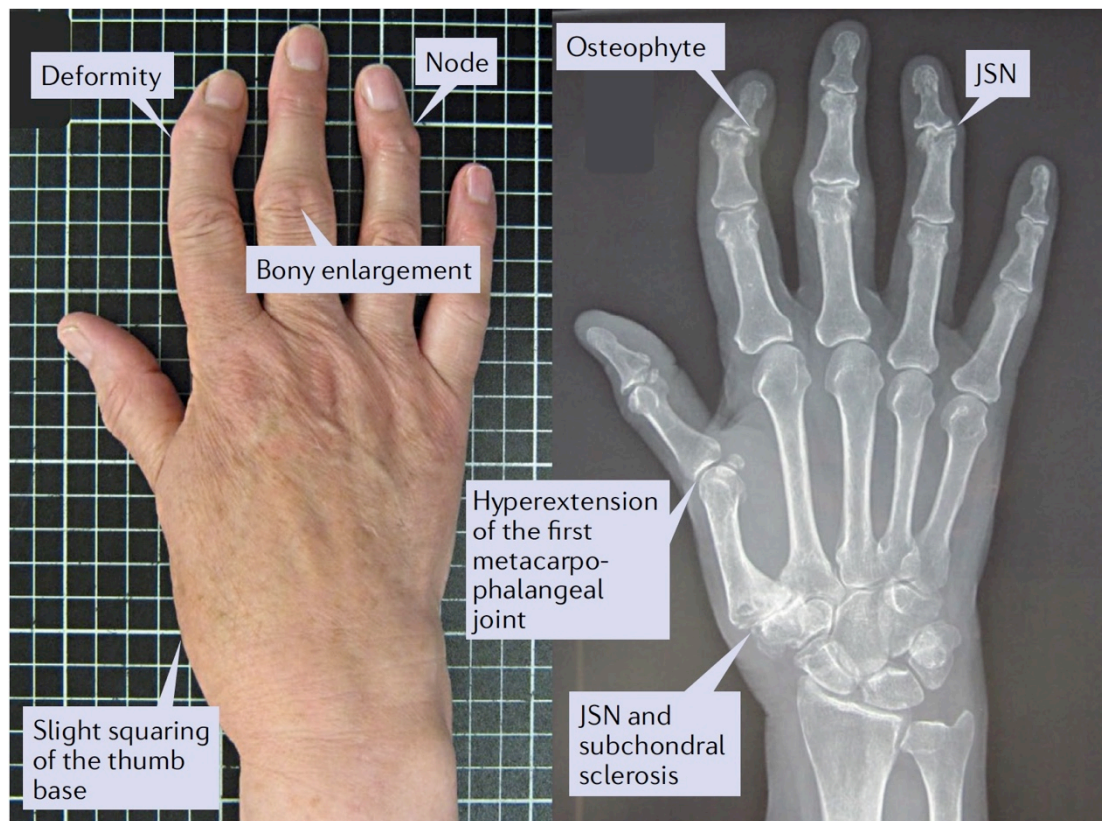


Figure 7 : Signes cliniques et radiographiques des différentes localisations de l'arthrose des mains (articulations trapézo-métacarpienne, inter-phalangiennes distales et inter-phalangiennes proximales). JSN : joint space narrowing (pincement articulaire) Issu de Marshall 2018.

L'arthrose érosive des doigts est une forme particulière d'arthrose, définie radiographiquement par des érosions ou un effondrement de la plaque osseuse sous-chondrale (Figure 8). Cette arthrose est généralement d'apparition brutale et touche préférentiellement les femmes. Elle se traduit par des poussées inflammatoires locales des articulations des doigts caractérisées par des douleurs intenses, inflammatoires avec des réveils nocturnes, évoluant sur plusieurs semaines. Dans les formes les plus inflammatoires, ces atteintes peuvent ressembler à un rhumatisme inflammatoire, en particulier au rhumatisme psoriasique compte tenu des localisations sur les IPD.

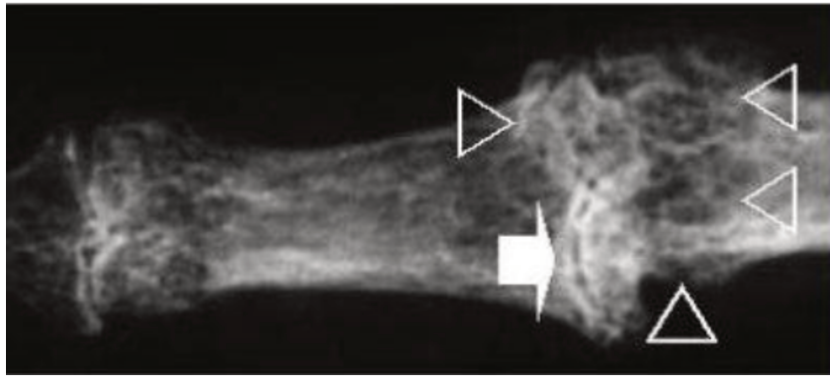


Figure 8 : Radiographie d'arthrose érosive de l'IPP, montrant de larges érosions osseuses (flèche blanche) ainsi que des érosions métaphysaires (têtes de flèche). Issu de Van Linthoudt 2010.

D. Conséquences générales de l'arthrose

Plusieurs méta-analyses ont observé un risque cardiovasculaire accru parmi les patients arthrosiques comparés aux patients dénués d'arthrose, y compris de décès (Hall 2016, Wang 2016, Veronese 2016). Ce risque semble indépendant de la consommation d'AINS (Hsu 2017). Dans une étude uniquement ciblée sur une population de patients porteurs d'arthrose des mains, Haara a montré que l'arthrose des IPD était associée à une augmentation de la mortalité chez les femmes (risque relatif de 1,23) et de décès d'origine cardio-vasculaire chez les hommes (risque relatif 1,42) (Haara 2003).

E. Diagnostic

Le diagnostic d'arthrose est clinique à partir des éléments d'interrogatoire : douleur mécanique, raideur au réveil, réduction des mobilités, ainsi que d'éléments cliniques physiques : raideur, épanchement articulaire, douleur à la palpation, déformations, et de terrain : âge, obésité, antécédent traumatique, ménopause. L'utilisation des critères de classification définis par l'ACR (American College of Rheumatology) et l'EULAR (European League Against Rheumatism) n'est pas de pratique courante, et employée à la constitution de groupes homogènes de patients dans les études cliniques. Pour la douleur et la gêne fonctionnelle, l'évaluation du patient doit comprendre l'analyse du retentissement des

symptômes sur les activités sociales, professionnelles, sportives et de loisirs, sur la qualité de vie et l'humeur, ainsi que le recueil des comorbidités (National 2014). Les radiographies ne sont donc pas obligatoires pour le diagnostic, mais elles permettront de le conforter par la présence de signes radiographiques typiques (ostéophytes, pincement localisé de l'interligne articulaire, condensations et macro géodes sous chondrales)(Figure 9) (Sakellariou 2017).

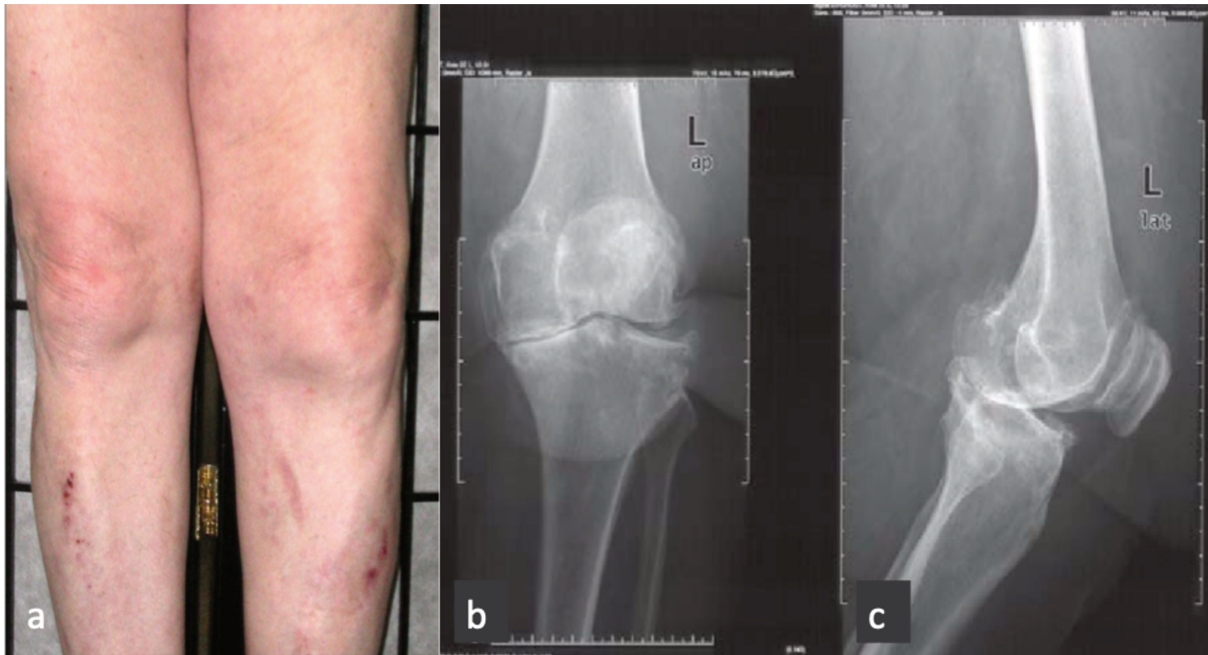


Figure 9 : Arthrose du genou gauche : vue clinique (a) et radiographies de face (a) et profil (b) d'un patient montrant des signes d'arthrose évoluée des 3 compartiments articulaires : fémoro-tibiaux médial et latéral et fémoro-patellaire. On observe un pincement articulaire majeur médial avec une érosion cupuliforme du plateau tibial médial, des ostéophytes, des géodes sous-chondrales visibles au niveau du plateau tibial médial. Photographie issue de la diapotheque du Collège Français des Enseignants en Rhumatologie, et radiographies issues de Michael 2010.

Ainsi à la main, le diagnostic d'arthrose est posé en cas d'association de douleur ou raideur, et de 3 parmi les 4 critères suivants : élargissement d'au moins 2 articulations parmi les IPD, les IPP, les MCP et les articulations trapézo-métacarpiennes ; élargissement d'au moins 2 IPD ; gonflement de 3 MCP au moins ; déformation d'au moins 1 articulation (Altman 1990).

F. Traitement de l'arthrose

Il n'existe actuellement pas de traitement étiologique, ni de moyen thérapeutique biologique de réparation du cartilage.

Le traitement médical repose, comme pour toutes les maladies chroniques, sur la mise en place d'un partenariat éclairé médecin-patient afin d'optimiser l'observance. Le patient doit recevoir des informations sur la maladie et son évolution probable, les différents traitements possibles avec les résultats attendus. Le traitement est choisi de concert : il est personnalisé en fonction des objectifs fonctionnels du patient.

Les solutions existantes sont essentiellement symptomatiques : non pharmacologiques (mesures hygiéno-diététiques, activité physique régulière, port d'orthèses), et pharmacologiques (traitements antalgiques ou anti-inflammatoires, injections intra-articulaires d'acide hyaluronique ou de corticoïdes)(Nguyen 2016, Hunter 2019). Ainsi, à la main, la prise en charge médicale comporte des exercices réguliers, le port d'attelle en cas de rhizarthrose, des AINS topiques et oraux, des infiltrations de corticoïdes ou de chondroïtine sulfate aux IPP (Kroon 2018). Au genou, les recommandations plaident pour la perte de poids, la pratique régulière d'exercices physiques, des AINS topiques et des infiltrations de corticoïdes et/ou d'acide hyaluronique (Nguyen 2016, Sellam 2020, Kolasinski 2020).

En cas d'échec de la prise en charge médicale, une chirurgie peut être proposée. En cas de vice architectural arthrogène (genu varum, coxa valga, dysplasie cotyloïdienne, dysplasie du trapèze), ou bien de lésion focale de l'articulation en zone portante, comme une ostéonécrose de tête fémorale, on peut envisager une chirurgie conservatrice dont le but est de prévenir l'apparition d'une arthrose ou de ralentir son évolution, au tout premier stade. Les stratégies chirurgicales régénératives comme les microfractures ou les perforations de l'os sous-chondral au niveau d'une perte de substance focale cartilagineuse produisent un fibrocartilage mécaniquement inférieur au cartilage natif.

En dehors de ces ostéotomies ou stimulations mécaniques de l'os sous-chondral, les stratégies chirurgicales sont le plus souvent non conservatrices. Le lavage articulaire par arthroscopie, avec débridement de la synovite et des fragments cartilagineux mobiles n'a pas fait la preuve de son efficacité (Moseley 2002). La chirurgie consiste donc en un remplacement – par arthroplastie– ou bien une fusion de l'articulation – par arthrodèse.

Ces traitements chirurgicaux donnent des résultats variables selon l'articulation concernée. Ainsi, contrairement à la hanche, aux articulation IPP, nul traitement chirurgical ne permet de restituer une articulation indolore, aux amplitudes articulaires physiologiques et capables de subir des contraintes mécaniques sur la durée (Cambon-Binder 2021).

On peut voir que les solutions pharmacologiques employées sont globalement les mêmes quelle que soit l'articulation considérée. Les essais thérapeutiques cliniques concernent essentiellement l'articulation du genou, tandis que peu d'études sont dédiées à l'arthrose des mains (Cambon-Binder 2021). De plus, les molécules testées dans le genou avec des résultats prometteurs sont rarement développées dans les mains : telles le lorecivivint, un modulateur de la voie Wnt qui a montré un effet symptomatique (Yazici 2020), la sprifermine qui a un effet structural mais non symptomatique (Hochberg 2019), le tanezumab, anti-NGF efficace sur la douleur dans l'arthrose du genou et de la hanche (Berenbaum 2020).

Les principaux axes de recherche actuels portent sur : d'une part la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans l'arthrose en vue de proposer des solutions thérapeutiques agissant sur les symptômes et/ou la préservation du cartilage : en se focalisant sur l'inflammation synoviale, le remodelage de l'os sous-chondral ou la douleur elle-même ; et d'autre part sur des stratégies promouvant la régénération du cartilage en particulier à l'aide de cellules souches mésenchymateuses (Favreau 2020, Vinatier 2016).

G. Physiopathologie

1. Générale

L'arthrose est un processus pathologique qui touche l'ensemble des tissus articulaires et péri-articulaires : cartilage hyalin, os sous-chondral, capsule, membrane synoviale, ligaments, muscles (Brandt 2006). La physiopathologie est plurielle et implique des phénomènes mécaniques, enzymatiques, métaboliques et inflammatoires, dont l'aboutissement est la destruction de l'articulation. Cette destruction résulte d'une perte de l'équilibre entre réparation et destruction du cartilage qui existe à l'état physiologique, et n'est

actuellement plus considérée, comme c'était le cas initialement, comme la simple conséquence d'une usure mécanique pure. Au cours de l'arthrose, les différents tissus, dont le cartilage, sont caractérisés par une inflammation de bas grade puisqu'ils libèrent des médiateurs pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, PGE₂, NO) et par un état pro-catabolique (libération de protéases matricielles telles que les MMP et ADAM-TS). Cette inflammation va induire la production d'enzymes protéolytiques (métalloprotéinases et aggrecanases) responsables de la dégradation de la matrice du cartilage.

Des altérations structurelles surviennent dans le cartilage au cours de l'évolution de la maladie, qui à leur tour vont perturber les propriétés mécaniques et donc rendre le cartilage plus susceptible aux lésions d'origine mécanique (Loeser 2016).

2. Modifications du cartilage

Sous l'influence d'un stress mécanique, métabolique, ou inflammatoire, les chondrocytes vont s'activer. Des fissures apparaissent en surface du cartilage, puis s'étendre en profondeur. Pour compenser la perte tissulaire de la couche superficielle, les chondrocytes vont proliférer et donner des amas cellulaires ou « clusters » (Figure 10), se différencier en chondrocytes hypertrophiques, avant de disparaître par apoptose (Kuhn 2004). Il existe alors une production de matrice extra-cellulaire dont la composition est cependant perturbée (collagène de type X)(Bertrand 2010). La couche de cartilage calcifié va s'épaissir, tandis que la tidemark se dédouble. Des fissures ou micro-cracks apparaissent entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral d'une part, et la couche profonde du cartilage d'autre part, ce qui va engendrer une néo-angiogenèse et une néo-neurogenèse de cette couche (Mapp 2012). L'apparition d'une communication anormale entre le cartilage et l'os sous-chondral s'accompagne d'un phénomène de minéralisation du cartilage (Nguyen 2011).

Ces facteurs vont entraîner une diminution de la synthèse de matrice extracellulaire par les chondrocytes, et une augmentation de l'activité de dégradation de celle-ci. Ainsi, les chondrocytes réagissent en libérant de façon accrue des facteurs cataboliques : protéases matricielles telles les MMP (collagénases comme la MMP-3, la MMP-13, ou la MMP-2) et aggrecanases (telles les ADAMTS-4 et -5).

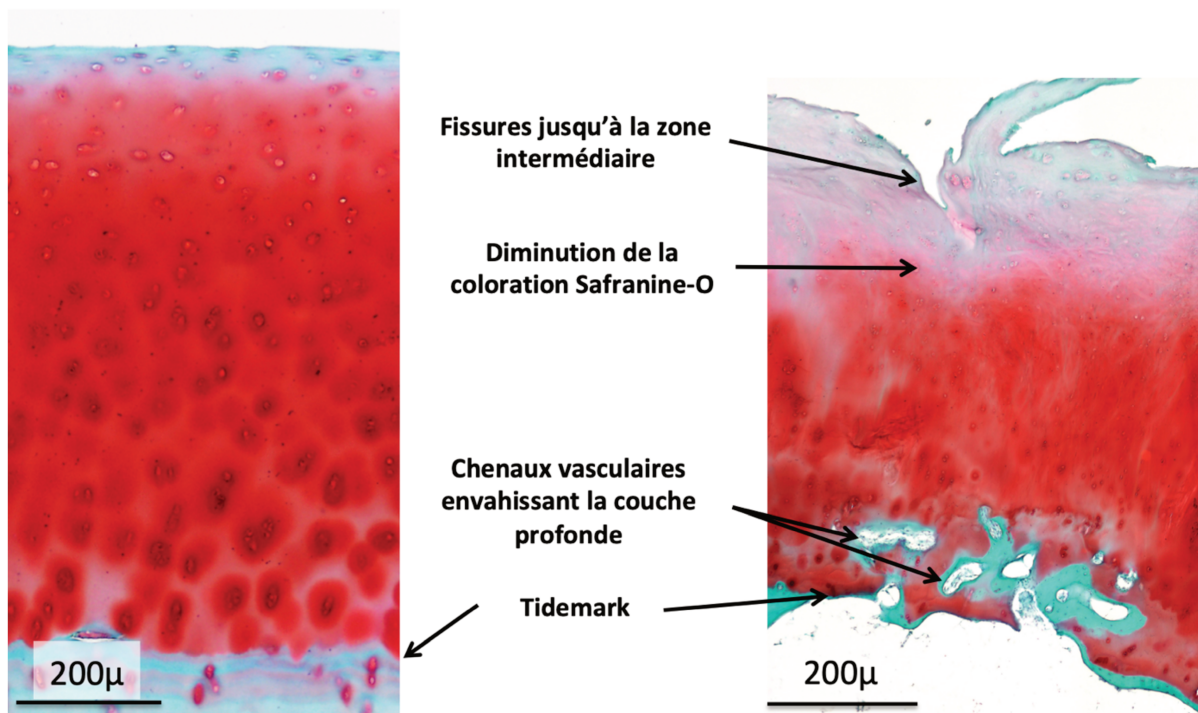


Figure 10 : Coupes histologiques de cartilages d'articulation métacarpo-phalangiennes saine à gauche (sujet 4502), et arthrosique à droite, avec un score de Mankin à 8 (sujet 4192).

L'ensemble des cellules de l'articulation, et en particulier les chondrocytes, va produire des médiateurs pro-inflammatoires et pro-cataboliques : des cytokines (interleukines dont l'IL-1 β et l'IL-6, chimiokines dont la MCP-1, et TNF), des radicaux libres (monoxyde d'azote NO, espèces réactives de l'oxygène (ROS))(Lepetsos 2016), de la PGE₂, des adipokines (leptine et visfatine), des facteurs de croissance (Insulin Growth Factor IGF-1)(Figure 9)(Dumond 2003).

Nous allons à présent détailler certains de ces acteurs moléculaires.

Cytokines

L'interleukine-1 β (IL-1 β) a été considérée de longue date comme ayant une importance majeure dans l'inflammation articulaire et la destruction du cartilage, conjointement au TNF (Caron 1996). Ces deux cytokines sont produites dans l'articulation principalement par les chondrocytes, les synoviocytes et les cellules mononucléées infiltrant la synoviale (en particulier des macrophages CD14+)(Bondeson 2006). L'IL-1 β et le TNF peuvent stimuler leur propre production de manière autocrine et inciter les chondrocytes et les cellules synoviales à produire d'autres cytokines, telles que l'IL-8, l'IL-6 et le facteur inhibiteur des leucocytes (LIF), ainsi que stimuler les protéases et la production de PGE₂.

L'IL-1 β est principalement synthétisée sous forme de précurseur, et libérée dans le milieu extracellulaire sous une forme active. Une protéase nommée IL-1 β -converting enzyme (ICE), ou caspase 1, située dans la membrane plasmique, est responsable de la génération de la forme mature de cette cytokine (Kronheim 1992). Il a été démontré que le niveau de cette enzyme est régulé à la hausse dans la synoviale et le cartilage arthrosique (Saha 1999). L'activation biologique des cellules par l'IL-1 est médiée par une association avec des récepteurs spécifiques à la surface des cellules (IL-1R). Deux récepteurs ont été identifiés, les IL-1R de type I et de type II. Le récepteur de type I est responsable de la transduction du signal. Il a été démontré que le nombre d'IL-1R de type I est significativement augmenté dans les chondrocytes arthrosiques et les fibroblastes synoviaux (Martel-Pelletier 1992). Ce phénomène est responsable de la potentialisation de l'effet de cette cytokine et de la régulation à la hausse de l'expression génétique d'un certain nombre de facteurs cataboliques, ce qui, à leur tour, renforce la destruction du cartilage. Dans l'arthrose, l'équilibre entre l'IL-1 et l'antagoniste de son récepteur, IL-1Ra, est perdu.

L'**IL-6** est une cytokine pléiotrope qui fait partie de la famille des cytokines gp130. Elle est produite par de nombreux types cellulaires dont les chondrocytes, les synoviocytes et les ostéoblastes de l'os sous-chondral. Elle joue un rôle dans la réaction inflammatoire et participe à l'inflammation articulaire et la dégradation au cours de l'arthrose. Il a été montré que l'IL-6 avait comme effets d'augmenter la production de MMP-3 et de MMP-13, des ADAMTS-4 et ADAMTS-5 chez la souris (Latourte 2017) et le bovin (Legendre 2005).

Chimiokines

Les chimiokines (ou chémokines) sont de petites protéines qui ont un effet chémoattractant sur les cellules immunitaires et de contrôle de leur état d'activation. Dans l'arthrose, elles participent au recrutement de ces cellules et induisent la sécrétion de médiateurs inflammatoires (Molnar 2021). De nombreuses d'entre elles sont présentes dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Endres 2010).

La **Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2)** est une des principales chimiokines. La MCP-1 a un effet chimiotactique sur les monocytes, macrophages, lymphocytes T membranaires et cellules NK (natural killer), et participe à la réaction inflammatoire locale (Deshmane 2009). La CCL2 (nom générique de la MCP-1 qui correspond à sa version humaine) est produite par divers types de cellules (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires, monocytes), soit de manière constitutive, soit

après induction par un stress oxydatif, des cytokines ou des facteurs de croissance. La CCL2 est l'un des membres les plus étudiés de la famille des chimiokines, et elle est considérée comme une cible potentielle pour le traitement de diverses maladies comme la sclérose en plaques ou la polyarthrite rhumatoïde (Hayashida 2001). La CCL2 médie ses effets grâce à son récepteur CCR2. Il a été démontré que les chondrocytes étaient capables de produire des chimiokines et en possédaient des récepteurs (Pulsatelli 1999, Borzi 2000).

Métalloprotéinases

Les métalloprotéinases sont des endopeptidases calcium-dépendantes qui contiennent un ion zinc dans leur domaine catalytique (site actif). Elles sont capables de dégrader toutes les protéines constitutives de la matrice extracellulaire, dont le remodelage est régulé durant les processus de croissance et de maintenance. De manière générale, les métalloprotéinases jouent un rôle dans l'embryogenèse, la migration et l'adhérence cellulaires, l'angiogenèse, et le développement tumoral. Elles sont divisées en plusieurs classes selon leur action spécifique. Ainsi, la MMP-3 fait partie des stromélysines, la MMP-13 des collagénases et la MMP-2 des gélatinases. Les principaux substrats de ces classes d'enzymes sont respectivement les fibrilles de collagène pour les collagénases, le collagène de type IV et la gélatine (forme hydrolysée du collagène) pour les gélatinases, les collagènes et les PG pour les stromélysines. Elles sont produites sous la formes de zymogènes inactifs, puis sont activées à l'extérieur de la cellule. Leurs principaux inhibiteurs sont les tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), qui permettent la régulation précise de l'action de ces enzymes dégradatives.

La **MMP-3**, appelée également Stromélysine 1, a comme substrats les collagènes de types II, IV, IX, X, IX, les PG, la fibronectine et la gélatine.

Adipokines

Ces protéines sont principalement produites par le tissu adipeux et régulent les apports alimentaires et les dépenses énergétiques et sont également impliquées dans la réponse inflammatoire. La leptine est une des plus importantes adipokines. Son récepteur est présent dans de nombreux tissus, de sorte que cette adipokine est impliquée dans de multiples phénomènes physiologiques dont la sécrétion d'insuline, la thermogenèse, l'angiogenèse, et le métabolisme osseux (Chen 2015). Les adipokines se comportent dans l'arthrose comme des médiateurs inflammatoires et pro-cataboliques. Ainsi, la visfatine stimule la libération d'IL-6 et de MCP-1 dans les ostéoblastes et les chondrocytes (Laiguillon 2014).

La production de leptine est proportionnelle à la sévérité de la destruction du cartilage. Cette adipokine stimule la synthèse d'IGF-1 et de TGF dans les chondrocytes.

Enfin, la PGE_2 est un dérivé de l'acide arachidonique libéré des membranes par la phospholipase A2. Elle est l'un des principaux médiateurs cataboliques impliqués dans la dégradation du cartilage, en stimulant la production de métalloprotéinases telles la MMP-3 (Gosset 2010) et l'apoptose des chondrocytes. Le cartilage arthrosique libère plus de PGE_2 que le cartilage sain. Certaines des enzymes qui participent à sa production, telles la COX-2 et la m-PGES sont mécanosensibles (Gosset 2008).

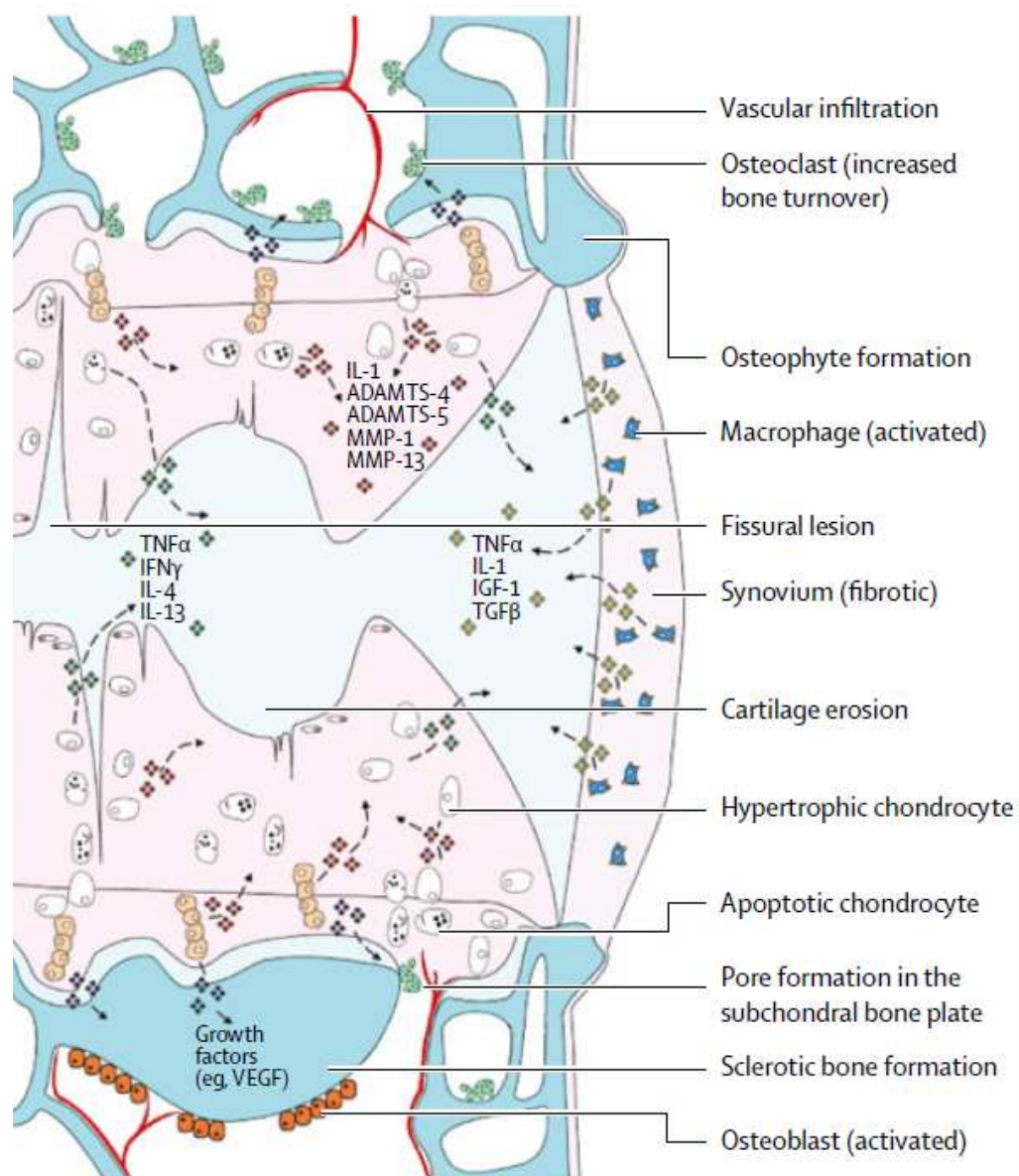


Figure 11 : Voies de signalisation et modifications structurales au cours du développement de l'arthrose. Issu de Glyn-Jones 2015

3. Modifications synoviales

L'inflammation synoviale semble particulièrement impliquée au début de l'évolution de l'arthrose, tandis que la dégradation du cartilage va conduire à un auto-entraînement du processus. Les débris tissulaires vont activer les autres types cellulaires de l'articulation, et en particulier les synoviocytes via les récepteurs Toll Like (TLR)(Sellam 2010). Une inflammation synoviale se produit alors, avec une néo-angiogenèse, une hypertrophie tissulaire et le recrutement de cellules de l'immunité innée (monocytes/macrophages) et acquise (lymphocytes B et T) (Sellam 2010). Les synoviocytes sécrètent alors les médiateurs pro-inflammatoires et pro-cataboliques vus précédemment, des neurotransmetteurs et neuromodulateurs (substance P et Nerve Growth Factor), et des Bone Morphogenetic Proteines qui participent à la construction des ostéophytes. La douleur liée à l'arthrose est principalement véhiculée par des fibres nerveuses localisées dans la synoviale (Felson 2005). En plus des neurotransmetteurs, des médiateurs inflammatoires tels IL-6, TNF ou IL-1 β sont capables de stimuler directement des récepteurs nociceptifs ou de les rendre plus sensibles à d'autres stimuli (Kidd 2004). Par ailleurs, les neurotransmetteurs ont également des effets pro-inflammatoire et prolifératif sur les synoviocytes.

Les synoviocytes sont de plus la principale source d'adipokines dans l'articulation.

4. Modifications osseuses

Un remodelage anormal de l'os sous-chondral se produit au cours de l'arthrose, incluant un épaissement et une sclérose de la plaque sous-chondrale, des zones kystiques et des ostéophytes. La sclérose est le fait d'une réactivation de l'ossification endochondrale, associant une avancée du front de minéralisation du cartilage calcifié, la différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires et la néoangiogenèse locale (Mahjoub 2012). Des chenaux vasculaires, composés d'ostéocytes, ostéoblastes et de vaisseaux, traversent la jonction ostéo-chondrale, et font communiquer le cartilage calcifié et le cartilage articulaire. Leur abondance est associée à l'intensité des symptômes (Ashraf 2011).

Les ostéophytes se développent au niveau des berges de l'articulation, par ossification endochondrale, particulièrement dans les zones de surcharge mécanique consécutive aux perturbations de la cinématique articulaire et de la répartition des contraintes (Hsia 2018). Les facteurs de croissance TGF et IGF-1 sont impliqués dans leur formation, de même que la

leptine par un effet indirect sur la stimulation de la production de TGF et direct par un effet inducteur de l'ossification, similaire à son rôle sur le développement du squelette au cours de l'embryogenèse (Dumond 2003, Middleton 1995).

Enfin, des études récentes suggèrent une participation du tissu adipeux intra-médullaire dans le contrôle du micro-environnement osseux et dans la genèse de l'arthrose (Zapata-Linares 2021)

5. Des phénotypes d'arthrose variés

L'arthrose est une maladie hétérogène pour laquelle plusieurs voies physiopathologiques ont été identifiées. Ainsi, les processus biologiques et mécaniques à l'origine d'une arthrose post-traumatique chez un sujet jeune diffèrent probablement de ceux impliqués chez un patient obèse ou âgé.

Plusieurs types de stress sont capables d'engendrer des modifications délétères des chondrocytes : mécanique, inflammatoire, métabolique et sénescence. L'étiopathogénie de l'arthrose est ainsi plurielle ; on dénombre plusieurs « phénotypes » d'arthrose basés sur les facteurs de risque (et qui peuvent se combiner chez un même individu) : post-traumatique, métabolique, inflammatoire et liée au vieillissement (Bijlsma 2011). Il est probable que ces mécanismes soient impliqués de manières différentes selon l'âge du sujet, et soient impliqués de façon conjointe. De plus, la forme d'arthrose diffère potentiellement d'une localisation anatomique à une autre.

a. Stress mécanique

Les contraintes mécaniques sont de plusieurs types : pression, cisaillement et compression. Elles varient selon la localisation anatomique, le degré d'activité et le poids de l'individu. Plusieurs études expérimentales ont montré que des contraintes d'intensité ou de fréquence anormalement élevées entraînaient des changements biologiques similaires à ceux observés dans le cartilage arthrosique (production de médiateurs proinflammatoires (IL-6, PGE₂, NO)(Gosset 2008), métalloprotéinases (Freemont 1997, Blain 2001) et diminution de la synthèse de PG (Steinmeyer 1997). De plus, les fractures articulaires, principales pourvoyeuses d'arthrose post-traumatique, engendrent des altérations du fonctionnement des chondrocytes, leur nécrose et leur apoptose (McKinley 2010).

b. Stress métabolique

Des études récentes ont mis en évidence une implication des métabolismes lipidique et glucidique dans la genèse de l'arthrose (Courties 2015).

L'arthrose dite métabolique correspond à une obésité associée à un état d'inflammation chronique de bas grade et des taux élevés d'adipokines et d'acides gras libres. Le tissu adipeux libère de multiples adipokines (visfatine, adiponectine, leptine) ainsi que des cytokines (IL-1 β , IL-6), lesquelles participent à l'inflammation présente dans l'obésité. Les adipokines ont un effet pro-inflammatoire et catabolique sur les tissus articulaires (Berenbaum 2013, Liguillon 2014). Le taux de leptine est augmenté dans le liquide synovial de patients ayant de l'arthrose, et corrélé à la sévérité de l'atteinte (Ku 2009). Au cours du suivi de 164 patients âgés en moyenne de 64 ans et ayant de l'arthrose des mains, Yusuf a montré que ceux qui avaient au départ les taux les plus élevés de leptine circulante avaient la progression la plus importante en terme de rétrécissement de l'espace articulaire (Yusuf 2011).

De plus, il a été montré que certains acides gras insaturés comme le palmitate (le plus abondant d'entre eux chez l'Homme) avaient ainsi un effet catabolique et pro-inflammatoire sur les chondrocytes, ce qui pourrait contribuer à la genèse de l'arthrose (Alvarez-Garcia 2014).

Des taux élevés de LDL oxydés (Low-density lipoprotein), également impliqués dans la genèse de l'athérosclérose, sont associés au développement de l'arthrose chez l'Homme et dans des modèles d'arthrose chez le rongeur, via une inflammation synoviale, la destruction du cartilage et de remodelage osseux (de Munter 2015).

Une autre cause métabolique d'arthrose est le diabète et l'insulinorésistance, responsables d'un stress oxydatif, d'un état inflammatoire de bas grade, de l'accumulation dans les tissus de produits dérivés de la glycoxydation (voir chapitre AGEs)(Courties 2016).

c. Stress lié au vieillissement

Certains mécanismes propres au vieillissement sont impliqués dans la genèse de l'arthrose : sénescence cellulaire, stress oxydatif, perturbations du métabolisme énergétique et altérations de la matrice extracellulaire (Loeser 2016). Avec l'âge, l'activité anabolique des chondrocytes décroît, tandis que l'activité catabolique augmente. La sécrétion basale d'IL-1 β augmente ainsi que la production de MMP-13 induite par de l'IL-1 β (Forsyth 2006).

5. Limites des connaissances sur la physiopathologie de l'arthrose de la main

La majorité des concepts étiopathogéniques sur la dégradation du cartilage dans l'arthrose sont issus de travaux sur la hanche et le genou, articulations dites « portantes » c'est-à-dire soumises à d'importantes contraintes en compression. Les raisons principales sont l'existence de modèles animaux et la relative facilité d'obtention des prélèvements de cartilage humain provenant de ces articulations, à l'occasion d'une arthroplastie.

A l'inverse, il n'existe pas de modèle animal d'arthrose digitale inter-phalangienne (Karalezli 2010). Hormis l'Homme, en effet, toutes les espèces possédant une préhension (singes, rongeurs, ursidés, certains marsupiaux) utilisent également leurs membres supérieurs lors de la déambulation. De plus, la réalisation d'une arthroplastie d'IPP ne permet pas de prélever à visée de recherche du cartilage arthrosique, dans la mesure où ces interventions sont indiquées en cas de destruction du cartilage, et du volume extrêmement faible récupérable. En conséquence, le cartilage des doigts n'a été que très peu étudié, bien qu'il s'agisse de la plus fréquente localisation d'arthrose périphérique.

Les articulations de la main constituent un excellent modèle d'articulations non portantes, par opposition au genou, ce qui par le passé a permis de dissocier les rôles respectifs de facteurs métaboliques et mécaniques dans l'obésité (Yusuf 2012). Par ailleurs, alors que les articulations IPP et IPD sont fréquemment atteintes, les MCP, dont les dimensions et les contraintes mécaniques sont similaires, sont beaucoup plus rarement impliquées.

III. Vieillesse tissulaire

A. Modifications post-traductionnelles des protéines

Le vieillissement s'accompagne de multiples phénomènes biologiques. De manière générale, les effets cellulaires et moléculaires du vieillissement incluent instabilité génomique, raccourcissement des télomères, altérations épigénétiques, perte de la protéostase, dérèglement de la détection des nutriments, dysfonctionnement mitochondrial, sénescence cellulaire, épuisement des cellules souches et altération de la communication intercellulaire (Lopez-Autin 2013).

Parmi les phénomènes non génétiques on compte les modifications post-traductionnelles non enzymatiques des protéines (MPTNE) (Jaisson 2010). Celles-ci vont impacter à la fois la conformation et la fonction des protéines et donnent lieu à des produits dérivés de MPTNE. Ainsi les MPTNE représentent l'ensemble des réactions chimiques qui altèrent des protéines après leur maturation enzymatique. Elles comprennent oxydation, racémisation, isomérisation, deamidation, nitration, carbonylation, carbamylation, et glycation (ou glycoxydation). Elles correspondent à la fixation de petits métabolites sur des groupes libres d'acides aminés, suivis de réarrangements moléculaires. Dans l'organisme ces composés se trouvent fixés sur des protéines libres, ou fixés à des peptides suite à la dégradation incomplète de protéines altérées.

Ces altérations sont considérées comme la marque du vieillissement moléculaire des protéines. Elles sont irréversibles, et s'accumulent pendant la vie de la protéine. Les protéines dont la demi-vie est la plus longue vont donc subir davantage de modifications, par accumulation. Or le collagène, à l'instar d'autres protéines structurales de la matrice extracellulaire, est une des protéines dont la demi-vie est la plus longue : elle est estimée à 117 ans pour le collagène articulaire (Verzijl 2001), ce qui rend le cartilage particulièrement susceptible d'accumuler les produits de MPTNE. L'accumulation est accentuée par certains états pathologiques tels l'insuffisance rénale chronique ou le diabète.

Dans l'organisme il existe un équilibre tissulaire entre la dégradation des protéines altérées et la fabrication de nouvelles protéines, afin de disposer de suffisamment de protéines fonctionnelles. Or les protéines altérées résistent à la protéolyse, ce qui conduit à des modifications des propriétés physico-chimiques et mécaniques des tissus.

Ainsi, l'accumulation anormale de protéines altérées participe à la genèse de nombreuses pathologies liées à l'âge, telles des maladies neurodégénératives, l'ostéoporose, la rétinopathie, l'athérosclérose (Harding 2002), si bien que l'intérêt d'utiliser des MPTNE comme biomarqueurs a été étudié dans en recherche clinique (Jaisson 2010). Cependant, peu d'entre elles sont pour l'instant d'usage routinier.

L'altération de la structure des protéines peut modifier leur fonction biologique, en perturbant leurs interactions protéine-protéine et protéine-cellule : soit en les bloquant, soit en médiant des effets inappropriés.

Enfin les altérations peuvent générer de nouveaux épitopes ou créer des radicaux libres, sources de réaction inflammatoire (Buetler 2008). Les protéines altérées peuvent être perçues comme étrangères par l'organisme, ce qui conduit au développement d'auto-anticorps (Shi 2011).

En pratique il apparaît que les pathologies liées au vieillissement s'accompagnent de multiples MPTNE.

B. Produits avancés de la glycation ou Advanced Glycation End Products (AGEs)

La principale modification post-traductionnelle des protéines est la glycoxydation, qui correspond à la fixation entre le groupe carbonyle d'une molécule de glucose ou d'un autre sucre réducteur sur le groupe amine d'un acide aminé. Cette fixation peut se faire également sur un lipide. Cette réaction crée une base de Schiff qui va elle-même subir des réarrangements, dont l'oxydation, pour former des produits d'Amadori, dans le cadre d'une réaction de Maillard. Les produits de ces réactions sont appelés produits avancés de glycation (AGEs). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) catalysent la formation des AGEs. La Nε-(carboxyméthyl)lysine (CML) est un des plus connus, avec la pentosidine et la méthylglyoxalhydroimidazolone-1 (MG-H1).

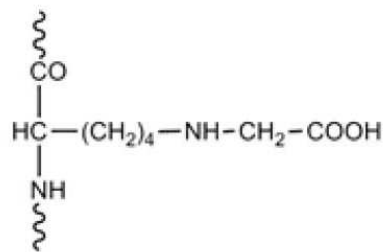
Divers facteurs environnementaux, dont les composés chimiques présents dans la fumée de cigarette, les régimes hypercaloriques ou comportant un taux élevé de sucres raffinés ou d'aliments cuits à haute température, et le mode de vie sédentaire, induisent la production d'AGEs (Perrone 2020). De plus, la formation d'AGEs augmente dans certaines

situations pathologiques et en particulier un état de stress oxydatif, le diabète ou l'insuffisance rénale. En effet, le rein participe à l'élimination des AGEs en situation normale. En cas de perte de l'équilibre entre les AGEs (apports extérieurs dans l'alimentation et la fumée de tabac + produits endogènes), et les systèmes de détoxification naturels (dont le glutathion, ou les fructosamines kinases) ils s'accumulent, ce qui induit à une hyperglycémie, une hyperlipidémie, une inflammation systémique et un stress oxydatif.

Certaines maladies neurodégénératives, telle la maladie d'Alzheimer, sont liées à l'accumulation d'AGEs (Choei 2004, Grillo 2008). Celle-ci s'observe également au cours du diabète : dans les reins, les rétines et les plaques d'athérome, ce qui conduit aux complications vasculaires et microangiopathiques. L'HbA1C (hémoglobine glycosylée) est la plus connue des MPTNE : il s'agit de la fixation de glucose sur les résidus valine N-terminaux des chaînes de globine. La molécule obtenue est un produit d'Amadori, intermédiaire dans la production d'un produit de glycation avancé, qui constitue le produit final de la réaction de glycation. Le dosage de l'hémoglobine glyquée constitue un gold standard dans le suivi de l'efficacité du traitement du diabète.

Les effets des AGEs sur l'organisme sont médiés par leur récepteur RAGE (receptor for advanced glycation endproducts). Les RAGE sont des récepteurs multiligands appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Ils sont exprimés dans de nombreux tissus, notamment le système vasculaire, les poumons, le cœur, l'endothélium et le tissu neural. En outre, ils sont exprimés par une large gamme de cellules : cellules musculaires lisses, monocytes, macrophages, cellules endothéliales, astrocytes et microglie. A l'état normal, les RAGEs sont exprimés à des niveaux basaux. Cependant, des niveaux élevés sont trouvés dans des conditions pathologiques telles que le diabète sucré, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, des cancers, ainsi que dans le vieillissement naturel. Ainsi, dans l'athérosclérose, RAGE joue un rôle majeur : sa liaison à différents ligands entraîne une activation des cellules endothéliales et une inflammation vasculaire chronique (Basta 2008). L'activation de RAGE par des AGEs ou d'autres ligands (produits de l'oxydation de protéines, le peptide β -amyloïde, la protéine S100) transduit des signaux intra-cellulaires multiples : voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK), des extracellular signal-regulated kinases 1 et 2 (ERK), de p21^{ras} et p38, de la Janus kinase (puis la voie JAK-STAT) et de la phosphoinositol 3 kinase (Pi3K), ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B qui induit la transcription de gènes pro-inflammatoires (Younessi 2011). Au total l'activation de RAGE provoque des réactions inflammatoire,

proliférative, angiogénique, apoptotique, thrombogène et fibrosante. De plus, la liaison d'AGEs sur RAGE induit la production de ROS, via l'activation de la NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite) et les voies mitochondriales. Ceci conduit à une diminution de l'action des systèmes antioxydants endogènes tel le glutathion, et de la Glyoxalase-1 (Glo-1), ce qui augmente les concentrations des précurseurs des AGEs (glyoxal et de méthylglyoxal), et conduit en soi à la formation d'AGEs. Ainsi, le stress oxydatif est fortement lié au phénomène de glycation. Glo-1 est une enzyme ubiquitaire capable d'éliminer les précurseurs des AGEs, dont l'expression est augmentée dans un environnement inflammatoire et de stress oxydatif (Xue 2012).



CML

La **CML** est le plus prévalent des AGEs in vivo et peut être dosé comme marqueur de la quantité d'AGEs. Il a été montré qu'elle s'accumulait avec l'âge dans la peau, les artères, le tissu osseux (Thomas 2018). Sa formation résulte de plusieurs voies, par fixation de glucose (condensation) sur des lysines suivie de réarrangements et oxydations, ou par réaction directe entre la lysine et du glyoxal (éthanédial, petit composé organique). Il a été montré que les quantités de CML, ainsi que de RAGE soluble dans le sérum de patients diabétiques étaient corrélés à la présence d'une neuropathie périphérique (Aubert 2014).

C. Produits dérivés de la carbamylation des protéines

1. Origine

Une autre modification post-traductionnelle importante est la carbamylation, terme impropre mais d'usage courant désignant une carbamoylation (Kraus 2001). Cette réaction consiste en la fixation d'acide isocyanique sur des groupes aminés des protéines. La réaction se fait de préférence sur les groupes amino- α d'acides aminés, de peptides ou de protéines, et en particulier sur les groupes ϵ -NH₂ des résidus lysine, acide aminé essentiel, conduisant à la formation d'homocitrulline qui représente le principal produit dérivé de carbamylation (PDC).

L'origine de l'acide isocyanique est double : il peut provenir de la dégradation spontanée de l'urée ou bien de la transformation du thiocyanate par la myéloperoxydase (MPO) en présence de peroxyde d'oxygène, mécanisme considéré comme minoritaire (Figure 12)(Nakabo 2020). Le thiocyanate est présent dans les fruits et légumes ainsi que dans les laitages, et dans la fumée. La MPO est une enzyme contenue dans les cellules de l'inflammation tels que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages, qui transforme le thiocyanate en acide hypothiocyanique et en cyanate. La présence de MPO dans les tissus est un marqueur du recrutement de neutrophiles dans un contexte inflammatoire local (Wang 2007). Les autres sources d'acide isocyanique ou de ses précurseurs, bien que quantitativement mineures, proviennent de l'air inspiré chargé de fumée de tabac ou provenant de la combustion de biomasse (matière organique) (Roberts 2011).

L'insuffisance rénale est le principal facteur connu pour accroître le taux de carbamylation des protéines, par augmentation de la concentration d'urée et d'acide isocyanique (Nilsson 1996).

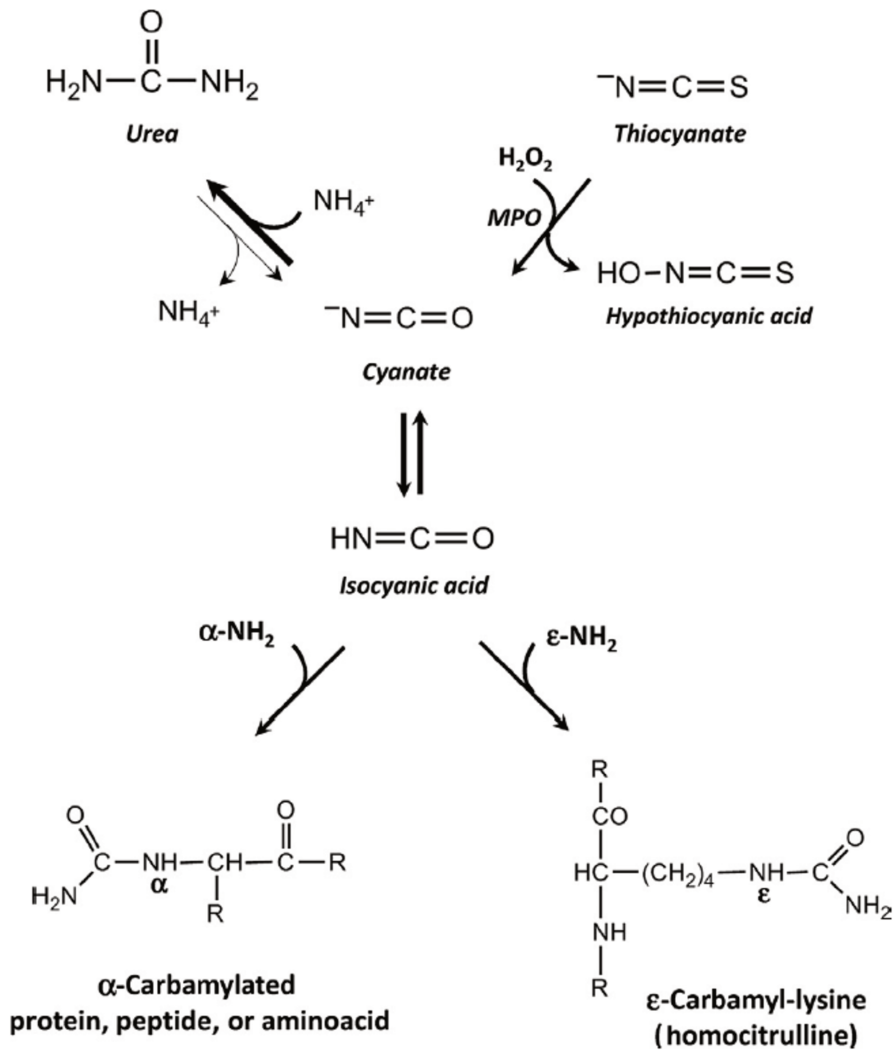


Figure 12 : Représentation des principales voies biochimiques menant à la formation de l'acide isocyanique (dissociation spontanée de l'urée ou transformation du thiocyanate par la myéloperoxydase (MPO) en présence de peroxyde d'hydrogène). L'acide isocyanique peut se lier de manière irréversible aux groupes α - ou ϵ -amino des protéines, ce qui conduit, respectivement, à la formation de protéines α -carbamylées (ou de peptides ou d'acides aminés) et de ϵ -carbamyl-lysine (également appelée homocitrulline). Issu de Jaisson 2018.

2. Conséquences de la carbamylation sur les propriétés des protéines

a. Modifications structurales des protéines

La liaison d'un groupe carbamoylé sur les groupes aminés des protéines conduit à la suppression d'une charge positive, qui perturbe les interactions protéines-eau et modifie donc les interactions ioniques à la surface de la protéine.

Or, ces interactions sont essentielles pour les conformations secondaire et tertiaire de la protéine, et leur perte est responsable de changements conformationnels majeurs. Ainsi, Jaisson a montré que la carbamylation du collagène de type 1 (présent essentiellement dans la peau et l'os) entraînait des déstabilisations localisées des chaînes alpha, et perturbaient leur conformation en triple hélice (Jaisson 2006, Jaisson 2007). De plus, l'organisation de monomères protéiques en groupements protéiques de type fibres ou filaments est perturbée : c'est le cas des fibres de collagène (Jaisson 2006), de la fibrine (Binder 2017) et de protéines du cytosquelette comme l'actine (Kuckel 1993). Ces difficultés d'assemblage en super-protéines induisent des pertes de stabilité mécanique.

A l'inverse, des protéines carbamylées peuvent avoir tendance à s'agréger telle la cristalline dans la cataracte (Beswick 1987).

Une autre conséquence de la modification conformationnelle d'une protéine est la présentation d'un motif normalement non exposé conduisant à la création d'anticorps dirigés contre ce qui est considéré comme un nouvel antigène. Dans la polyarthrite rhumatoïde, on peut ainsi observer des auto-anticorps anti-vimentine carbamylée ou albumine carbamylée (Nakabo 2017).

b. Modifications de fonction des protéines carbamylées

Il s'agit le plus souvent d'une perte partielle ou complète de fonction, soit par modification de la conformation globale de la protéine, soit par modification élective d'un résidu présent dans le site d'action de la protéine : enzyme, hormone, cytokine, récepteurs cellulaires etc. Ainsi, la carbamylation du résidu cystéine N-terminal de la tissu inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) conduit à la perte complète de son activité inhibitrice vis à vis de la métalloprotéinase 2 (MMP-2) (Higashi 1999). Rarement l'activité de la protéine est accrue, telle l'hémoglobine S carbamylée qui a une affinité supérieure pour l'oxygène (Nigen 1974).

c. Modification des interactions protéine-protéine et protéine-cellule

Nous avons vu que la carbamylation de protéines polymériques pouvait poser problème. Il en est de même lorsqu'une protéine carbamylée interagit avec une autre protéine, ce qui conduit également à une baisse de fonction. C'est le cas pour de multiples couples enzyme-substrat. Ainsi, l'altération structurelle des triple-hélices de collagène de type 1

diminue leur sensibilité à la dégradation en particulier par la MMP-1 (Jaisson 2007), ainsi que l'affinité pour l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ ce qui diminue l'activation des polynucléaires neutrophiles (Jaisson 2008).

3. Conséquences de la carbamylation des protéines en pathologie humaine

Au cours du vieillissement se produit une accumulation de produits dérivés du processus de carbamylation, touchant les protéines dont la demi-vie est la plus longue. C'est pourquoi la carbamylation est un phénomène impliqué dans la genèse de pathologies liées au vieillissement, comme la cataracte (Jaisson 2018). Gorisse a montré que le taux de carbamylation du collagène de type I augmentait avec l'âge dans la peau chez l'Homme, les bovins et la souris (Gorisse 2016). De plus, la cinétique de carbamylation était inversement proportionnelle à la longévité de l'espèce, ce qui suggère l'existence de procédés d'« épuration » chez les espèces dont la longévité est la plus longue.

Le deuxième cadre de développement de pathologies en rapport avec la carbamylation des protéines consiste en l'ensemble des situations où de taux de cyanate est anormalement accru. Il s'agit de l'insuffisance rénale et des maladies inflammatoires chroniques. En effet au cours de ces dernières on observe une activité accrue de la MPO, qui est produite essentiellement par les neutrophiles et leucocytes et participe à l'immunité innée. Les pathologies inflammatoires s'accompagnent d'une production accrue de MPO : telles les maladies inflammatoires de l'intestin (Hansberry 2017), ou la polyarthrite rhumatoïde, dont les neutrophiles sécrètent la MPO de façon plus importante que ceux de patients sains (Sur Chowdhury 2014). Au cours de l'arthrose se produit un recrutement de cellules inflammatoires, de sorte que la quantité de MPO est également augmentée. Cette quantité, dosable dans le liquide synovial de genou, est augmentée en cas d'arthrose débutante comparativement aux sujets non arthrosiques ou ayant une arthrose évoluée (Steinbeck 2007). A la main, Punzi a montré que les patients ayant une forme érosive d'arthrose avaient un taux de MPO circulante supérieur à celui de patients ayant une arthrose des mains non érosive (Punzi 2012).

Au cours de l'insuffisance rénale, le taux d'urée sanguin augmente progressivement, conduisant à une accumulation systémique de protéines carbamylées, aux conséquences variées : réduction du turn-over du collagène des tubules rénaux participant à la fibrose,

athérosclérose par accumulation de LDL carbamylée, anémie par diminution de l'activité de l'érythropoïétine carbamylée (Apostolov 2010, Jaisson 2006). Dans un modèle murin d'insuffisance rénale on peut observer une accumulation de protéines carbamylées dans de multiples tissus et organes : rein, cœur, os, peau, foie, aorte (Pietrement 2013).

La carbamylation est également impliquée dans l'athérosclérose (Tableau 1).

Pathologie	Mécanisme physiopathologique impliquant la carbamylation	Références
Cataracte	Changements de conformation des protéines cristallines avec perturbation de leur viscosité, et des interactions protéine/protéine et protéine/eau	Beswick 1987
	Agrégation des protéines cristallines et formation de liaisons transversales intermoléculaires	
Insuffisance rénale chronique	Accumulation de protéines carbamylées dans les tissus	Pietrement 2013
	Augmentation de l'athérosclérose par la carbamylation des LDL	Apostolov 2010
	Perte de l'activité biologique de l'érythropoïétine due à la carbamylation	Mun 2000
	Stimulation de la synthèse du collagène par les cellules mésangiales et tubulaires induite par les protéines carbamylées (lien avec la fibrose)	Shaykh 1999
Athérosclérose	Accumulation de protéines carbamylées dans la paroi aortique	Pietrement 2013
	Réduction de la clairance des LDL en raison de leur carbamylation	Hörkkö 1994
	Dysfonction endothéliale médiée par les LDL carbamylées	Speer 2014
	Prolifération des cellules musculaires lisses médiée par les LDL carbamylées	Asci 2008
Polyarthrite rhumatoïde	Synthèse d'anticorps dirigés contre les protéines carbamylées (anticorps dirigés contre la vimentine et l'albumine carbamylées)	Nakabo 2017, Derksen 2017

Tableau 1 : Exemples de mécanismes moléculaires démontrant la contribution de la carbamylation des protéines dans le développement des maladies chroniques. D'après Jaisson 2018.

4. Utilisation comme biomarqueurs de produits dérivés de la carbamylation

L'implication de protéines carbamylées dans de multiples pathologies justifie le fait de disposer de moyens de quantification validés. Certaines protéines carbamylées peuvent être quantifiées directement, telle l'hémoglobine carbamylée, qui est un marqueur d'insuffisance rénale (Hasuike 2002).

Une autre possibilité est de quantifier globalement le taux de carbamylation des protéines, en mesurant le ratio entre la quantité d'homocitrulline ou HCit (lysine carbamylée) et la quantité totale de lysine, celle-ci reflétant la quantité protéique d'un tissu ou d'un liquide biologique. En effet, l'homocitrulline est le principal produit dérivé de la carbamylation. Le résultat est exprimé en mmol d'HCit/mol Lysine. Il est possible de quantifier l'homocitrulline soit par test colorimétrique, qui est peu spécifique (Balion 1998), soit par méthode LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) à partir de sérum, qui est plus sensible et plus spécifique (Wang 2007). Préalablement au dosage, il est nécessaire de cliver tous les ponts peptidiques, par hydrolyse acide ou digestion enzymatique, afin de dissocier les acides aminés. Il s'agit d'une technique longue, coûteuse, qui requiert du personnel spécialisé, de sorte que son utilisation en clinique est limitée pour le moment.

En pratique, la concentration d'homocitrulline dans le sérum peut être utilisée pour suivre la sévérité de l'atteinte cardio-vasculaire dans l'insuffisance rénale ainsi que chez les sujets non urémiques (Jaisson 2015).

Enfin, bien qu'il soit instable, il est possible de quantifier l'acide isocyanique, composé réactif se liant aux résidus lysine au cours de la réaction de carbamylation, par spectrophotométrie ou fluorométrie (Lundquist 1993).

5. Dégradation des protéines altérées

La dégradation des protéines carbamylées a été peu étudiée. Cependant il a été montré que des protéines intracellulaires une fois carbamylées pouvaient être dégradées par le complexe ubiquitine-protéasome (Desmons 2019).

D. MPTNE et arthrose

Dans des conditions de stress oxydatif prolongé, tel qu'on peut en observer au cours du vieillissement, d'un état inflammatoire chronique, ou d'un stress métabolique (diabète ou syndrome métabolique) se produisent des changements biochimiques des protéines du cartilage : glycation, carbonylation, lipoxidation, nitrosylation (Hardin 2015). Ces altérations induisent des perturbations conformationnelles des protéines, les rendant susceptibles à une dégradation enzymatique (Scharf 2013).

Dans son étude de 60 sujets de 2 à 103 ans, Verzijl a montré que au cours du vieillissement se produisait une accumulation d'AGEs, dont de la pentosidine et des CML (2000). Les auteurs ont de plus observé que la digestion du collagène articulaire par une collagénase bactérienne diminuait avec l'âge et la proportion de produits dérivés de la glycation. L'accumulation d'AGEs dans les tissus est un facteur reconnu de leur rigidification et de diminution du turn-over de la matrice extracellulaire (Bank 1998, Verzijl 2002). Les fibrilles de collagène altérées forment des cross-link entre elles, ce qui diminue leur flexibilité et accroît leur fragilité (Gautieri 2017). Chez le chien, DeGroot (2004) a tenté de reproduire l'accumulation d'AGEs observée au cours du vieillissement en effectuant des injections de ribose dans le genou. Le degré d'arthrose secondaire à une section du ligament croisé antérieur était corrélé à la teneur en AGEs. Au niveau des composants de la matrice extracellulaire, les auteurs ont observé une augmentation du taux de fibres de collagène altérées, une réduction de la synthèse de PG, et une augmentation de la libération de GAGs.

In vitro, les AGEs augmentent l'expression de gènes des MMP et d'ADAMTS, ainsi que du TNF- α et d'IL-6 (Rasheed 2009, Rasheed 2011, Huang 2011). Par ailleurs, les chondrocytes humains expriment le récepteur des AGEs : RAGE, et de façon croissante avec l'âge (Loeser 2005). Les RAGE sont stimulés par de multiples ligands en dehors des AGEs, dont des protéines de l'inflammation comme l'IL-1 β , ce qui entraîne la stimulation de la voie des MAP-Kinases et de NF- κ B (Loeser 2005, Rasheed 2011, Chen 2013). De plus, la stimulation de RAGE promeut la différenciation des chondrocytes observée dans l'arthrose (Cecil 2005).

Trellu a montré que contrairement à d'autres AGEs, les CML s'accumulaient avec l'âge dans le cartilage arthrosique de genou (Trellu 2019). Deux facteurs pouvaient expliquer cette accumulation : l'absence d'augmentation de l'activité de Glo-1 avec l'âge (en dépit

d'une quantité accrue d'AGEs dans le cartilage), et à l'inverse une réduction de son activité consécutive à une stimulation par l'IL-1 β , constatée dans des explants de cartilages arthrosiques humains.

Chez les patients diabétiques, l'hyperglycémie s'accompagne d'une accumulation d'AGEs dans les tissus, en particulier dans le cartilage, ce qui constitue probablement un des principaux facteurs expliquant le risque accru d'arthrose dans cette population (Dubey 2019). Ainsi, Oren a montré que les patients diabétiques requérant une prothèse de genou avaient des taux de pentosidine dans le cartilage et l'os sous-chondral supérieurs à ceux des patients non diabétiques (Oren 2011).

L'ensemble de ces études suggère le rôle de l'accumulation d'AGEs dans la genèse de l'arthrose liée à l'âge.

La carbamylation n'a pas été étudiée jusqu'à présent dans le cartilage. On ne dispose pas des taux d'HCit habituels dans ce tissu, et on ignore si le contenu en HCit y est proportionnel à l'âge. Cependant, au vu de son accumulation dans la peau avec l'âge, et de la propension aux protéines de demi-vie longue d'être particulièrement concernées par le phénomène de carbamylation, il est légitime de suspecter que celle-ci pourrait être associée au vieillissement du cartilage, voire participer à la physiopathologie de l'arthrose, principale pathologie du cartilage liée à l'âge.

Il est intéressant de noter que l'insuffisance rénale terminale s'accompagne fréquemment d'une atteinte articulaire, appelée arthropathie érosive ou ostéodystrophie. A la main par exemple, les articulations IPD sont le plus touchées, devant les MCP et les IPP (Cotten 1997). La physiopathologie en est mal connue et probablement plurifactorielle (dépôts de pyrophosphate de calcium dihydraté, dépôts amyloïdes).

IV. Hypothèse : des cartilages différents selon leur localisation

A. Rôles des facteurs extrinsèques dans le développement de l'arthrose

Nous avons vu que l'arthrose ne touche pas toutes les articulations de manière égale : articulations inter-phalangiennes des doigts, genou et hanche sont fréquemment touchées tandis que les articulations tibio-talienne ou MCP le sont plus rarement, essentiellement dans un contexte post-traumatique ou de maladie rhumatismale inflammatoire. Par ailleurs, les facteurs de risque diffèrent selon l'articulation considérée : la présence d'un syndrome métabolique est associé à un sur-risque d'arthrose des IPP et des genoux, mais non des MCP (Tomi 2016, Kouki 2021), les contraintes mécaniques sont un facteur de risque d'arthrose des MCP et des genoux, qui reste controversé aux IPP (Chaisson 2000).

La première hypothèse (« extrinsèque ») expliquant l'hétérogénéité de la susceptibilité des cartilages en fonction de leur localisation anatomique est la différence de contraintes biomécaniques entre les articulations, certaines supportant le poids du corps (genou, hanche), d'autres non (articulations interphalangiennes). Il est toutefois à noter que les articulations des mains subissent également des contraintes biomécaniques non négligeables. De plus, si on compare les IPP et les MCP, alors que ces articulations, de forme différente (respectivement trochléarthrose et condylarthrose) subissent des contraintes similaires (Faudot 2020), les MCP sont beaucoup plus rarement touchées par l'arthrose.

B. Rôle des facteurs intrinsèques ou endogènes dans le développement de l'arthrose

La seconde hypothèse (« intrinsèque ») est une variabilité de composition et/ou de propriétés biologiques entre les cartilages de différentes localisations, qui les rendraient plus ou moins susceptibles de développer de l'arthrose en présence de facteurs de risque.

Plusieurs auteurs ont comparé les propriétés et compositions des cartilages issus d'articulations différentes provenant du même sujet, en particulier du genou et de la cheville, car leurs susceptibilités à l'arthrose sont différentes. Ils ont pu mettre en évidence des différences de propriétés biologiques, biochimiques et mécaniques chez le cheval et l'Homme (Novakofski 2015, Kuettner 2005)(Tableau 2).

Le cartilage de la cheville est plus fin, moins riche en eau, plus riche en GAGs sulfatés, et plus rigide que le cartilage du genou (Treppo 2000). De plus, plusieurs travaux ont suggéré que les chondrocytes du cartilage talien étaient plus sensibles à une stimulation anabolique et moins sensibles à une stimulation catabolique que ceux du genou (Eger 2002, Kang 1998, Dang 2003). Ainsi, Eger a observé que lorsqu'il cultivait des fragments de cartilage talien et de genou en présence d'IL-1 β , la décroissance de synthèse de PG était moindre pour le talus, puis la synthèse reprenait plus rapidement au retrait de l'IL-1 β et à l'ajout de BMP-7 (Eger 2002). La même observation était réalisée par Kang qui utilisait comme agent catabolique un fragment de fibronectine (Kang 1998).

Kuettner a observé que la synthèse de PG était supérieure à la cheville qu'au genou quel que soit l'âge du sujet, dans une étude appariée chez des donneurs d'organes (Kuettner 2005).

Toutes ces constatations peuvent expliquer la moindre fréquence d'arthrose de la cheville comparativement au genou, comme si la cheville était une articulation protégée de l'arthrose de par la composition de son cartilage (Huch 1997).

Novakofski a constaté chez le cheval que l'expression génique (COL2A1, MMP-1, CD-RAP, AGG, gènes codant respectivement pour le collagène de type II, la MMP-1, le cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein, et l'aggrécane) basale et secondaire à un stimulus en compression par les chondrocytes dépendait de l'articulation considérée (2015).

Barreto a comparé l'expression de Toll Like recepteurs (TLR)(impliqués dans l'immunité innée) dans des cartilages arthrosiques de genoux et d'articulations trapézo-métacarpiennes prélevés lors d'arthroplasties (2017). Il a observé des expressions différentes de TLR4 entre les deux sites, suggérant une participation de l'immunité innée différente et donc une physiopathologie non commune à toutes les articulations.

Summary of knee and ankle differences

Feature	Knee	Ankle
Joint stability	Relatively unstable	Highly stable
Joint motion	Non-congruent Flexion/extension Rotation	Highly congruent Flexion/extension
Cartilage		
Cellularity	Same	Same
Cartilage thickness	2–6 mm	1–1.5 mm
Superficial chondrons	Single cells	Clusters of 2–4 cells
Sulfated glycosaminoglycan content	Lower	Higher
Water content	Higher	Lower
Collagen content	Same	Same
Dynamic stiffness	Lower	Higher
Hydraulic permeability	Higher	Lower
Peak stress with 65% final strain	11 MPa	16 MPa
Glycosaminoglycan synthesis		
In explants	Lower	Higher
In alginate	Same	Same
Proteoglycan half-life	22.68 days	16.58 days
Protein synthesis	Lower	Higher
IC ₅₀ for IL-1 reduction of proteoglycan synthesis		
In alginate	11 pg/ml	56 pg/ml
In explants	6 pg/ml	35 pg/ml
Influence of Fn-fs on		
Proteoglycan synthesis (anti-anabolic)	Low dose (1 nM)	High dose (100 nM)
Proteoglycan loss (catabolic)	Significant at 7 days	Not significant after 28 days
Attempted repair (Response to anabolic factors following catabolic stimulation)	No significant rebound	Significant rebound
Response to degeneration	Upregulation of collagen degradation	Upregulation of matrix synthesis

Tableau 2 : Principales différences entre les cartilages de genou et de cheville (talus). Issu de Kuettner 2005.

Une étude récente a montré qu'il était possible d'isoler et de cultiver des chondrocytes d'articulations IPP et de genoux à partir d'individus décédés depuis moins de 10 jours (Stradner 2017). L'analyse transcriptomique de ces chondrocytes cultivés sur 3 passages a mis en lumière des différences d'expression génique entre les deux localisations. Cependant, il est difficile de dire s'il s'agit de différences intrinsèques et dans quelle mesure les conditions de culture prolongées ont influencé les expressions géniques.

C. Hypothèse de travail

L'hypothèse de ce travail de Thèse est que les différences de prévalence entre les localisations d'arthrose sont en rapport avec des différences de composition et/ou de susceptibilité des cartilages à un stress biologique inflammatoire (hypothèse « intrinsèque »).

Pour aller plus loin dans l'étude des MPTNE, nous faisons l'hypothèse que la carbamylation, à l'instar de la carboxyméthylation, est un phénomène qui touche les protéines du cartilage, et qui pourrait jouer un rôle dans l'arthrose. A l'échelle systémique, les taux

sanguins d'HCit et de CML pourraient de plus être corrélés à leurs taux tissulaires, et corrélés au degré de sévérité structurale de l'arthrose digitale.

D. Objectifs du travail

L'objectif principal de ce travail était de **comparer les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cartilages selon leur localisation et leur statut arthrosique ou non**. Il se décomposait en 3 sous-objectifs :

- Objectif 1 : Etudier la composition biochimique et l'aspect histologique du cartilage selon sa topographie (articulations digitales versus genou)
- Objectif 2 : Etudier la réponse biologique du cartilage sain à un stress inflammatoire, selon sa topographie (articulations digitales versus genou)
- Objectif 3 : Etudier la réponse biologique du cartilage arthrosique à un stress inflammatoire, selon sa topographie (articulation digitales versus genous)

Et un quatrième objectif cherchant à établir un lien entre MPTNE systémique et arthrose :

- Objectif 4 : Etudier l'association entre la quantification de l'HCit et de la CML dans le sérum et la sévérité structurale de l'arthrose dans une cohorte de patients atteints d'arthrose des mains.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel pour les études sur modèle cadavérique

Le cartilage issu des articulations IPP, des MCP des doigts longs des deux mains et du condyle médial du genou gauche était prélevé chez des individus ayant donné leur corps à l'Ecole de chirurgie de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (après acceptation du projet par la direction scientifique).

Les sujets étaient décédés depuis moins de 5 jours et n'avaient fait l'objet d'aucune préparation ou congélation (Figure 11). Entre la réception à l'Ecole de chirurgie et le prélèvement de cartilage, ils étaient placés à 4°C. Les données recueillies étaient l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle au moment du décès. Les autres données médicales étaient inaccessibles du fait de la procédure d'anonymisation du Don des corps.

Le cartilage de genou était prélevé au milieu de la zone portant distale du condyle médial, dont Brown a montré qu'il subissait des contraintes supérieures à celles du condyle latéral (Brown 1984). Aux mains, le cartilage était prélevé sur l'intégralité de la tête des métacarpiens et des premières phalanges des doigts longs. Le cartilage du pouce n'était pas prélevé, considérant l'épidémiologie et les contraintes mécaniques spécifiques de la colonne du pouce. Le cartilage des articulations IPD n'était pas prélevé en raison de sa faible quantité (environ 100 mg au total).

Les cartilages étaient prélevés au bistouri. Afin de vérifier que la technique de prélèvement permettait bien de recueillir le cartilage jusqu'à la couche profonde incluse, nous avons fait un test de faisabilité en prélevant la tête de 2 phalanges dont le cartilage avait été prélevé et en les analysant en histologie selon le protocole ci-dessous.

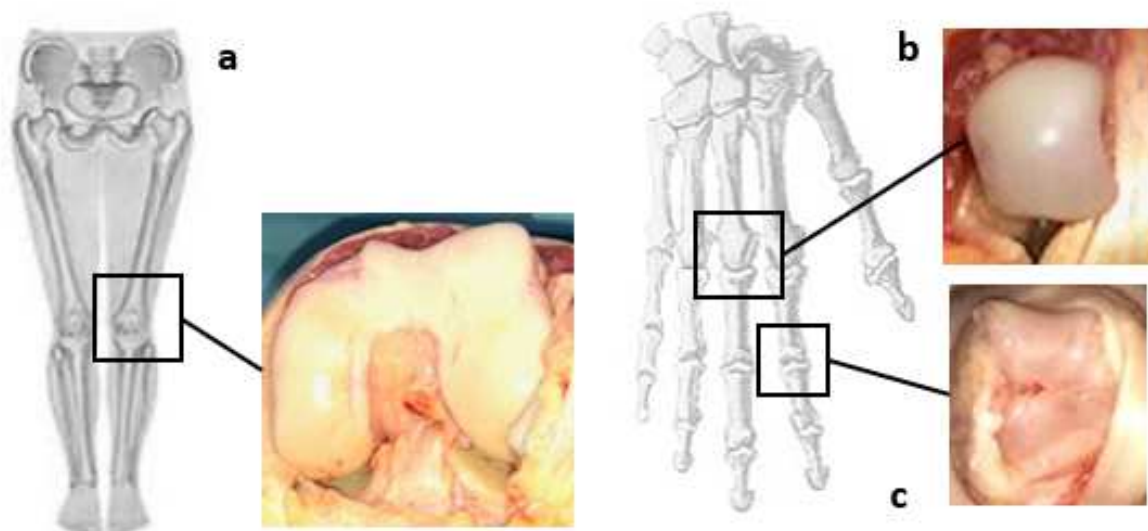


Figure 13 : Aspect per-opératoire des cartilages prélevés : condyle fémoral (a), têtes des métacarpiens des doigts longs (b), tête des premières phalanges des doigts longs (c).

II. Classification macroscopique des cartilages

Le cartilage était classé en sain ou arthrosique selon son aspect macroscopique évalué à l'aide de la classification d'Outerbridge (1961), mise au point initialement pour l'évaluation du cartilage de genou.

Grade 1 : intact, ramollissement
Grade 2 : fragmentation / fissures < 1,5cm
Grade 3 : fragmentation / fissures > 1,5cm
Grade 4 : os sous chondral à nu

Tableau 3 : Classification d'Outerbridge. D'après Outerbridge 1961.

Nous avons adapté cette classification aux doigts de manière proportionnelle à la surface de cartilage, en considérant que des fissures < 3 mm correspondaient à un grade 2 et > 3 mm à un grade 3. Si au moins une IPP ou MCP était arthrosique, on considérait toute la rangée comme arthrosique.

Un cartilage ayant un grade de 1 ou 2 était considéré comme sain, et comme arthrosique si le grade était de 3 ou 4.

III. Analyse histologique des cartilages

Des carottes de cartilage issu des articulations IPP, MCP et de genoux, incluant l'os sous-chondral, étaient prélevées chez les mêmes sujets, puis leur organisation tissulaire et leur composition biochimique étaient analysées.

A. Organisation tissulaire du cartilage

Les carottes étaient fixées dans du paraformaldéhyde (3,7%) 24 h puis décalcifiées dans de l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique)(0,5M) pendant 3 semaines à 3 mois jusqu'à obtenir un ramollissement adéquat de l'os sous-chondral, puis stockés en attendant leur coupe dans de l'éthanol 70°.

Les premiers échantillons (sujets 4136,4119,4123,4192,4202,4251,4273) ont été inclus en paraffine, et coupés au microtome à une épaisseur de 10 μ . Les suivants (4306,4326,4348,4502,4460,4551,4608) ont été inclus en OCT (Optimal Cutting Temperature compound) dans de l'azote liquide et coupés au cryostat.

Les coupes ont été ensuite colorées par la safranine O (qui colore les GAGs en rouge), le Fast Green (qui colore en vert les cytoplasmes), et l'hématoxyline (qui colore les noyaux cellulaires en bleu). L'observation des coupes colorées par trois évaluateurs indépendants (deux coupes distantes de 120 à 270 μ m) permettait d'apprécier le score d'arthrose selon la classification histologique de Mankin (1971) (Tableau 4). Le grade définitif correspondait à la moyenne des 3 lectures.

	Grade
I- Structure	
A. Normale	0
B. Irrégularités de surface	1
C. Pannus synovial et irrégularités de surface	2
D. Fissures jusqu'à la zone intermédiaire	3
E. Fissures jusqu'à la zone profonde	4
F. Fissures jusqu'à la couche calcifiée	5
G. Désorganisation complète	6
II. Cellules	
A. Normales	0
B. Hypercellularité diffuse	1
C. Présences de clones cellulaires	2
D. Hypocellularité	3
III. Coloration Safranin-O	
A. Normale	0
B. Légère diminution	1
C. Diminution moyenne	2
D. Diminution sévère	3
E. Absence de coloration	4
IV. Tide mark	
A. Intacte	0
B. Franchie par des vaisseaux sanguins	1

Tableau 4 : Grade de Mankin. Le grade va de 0 (aucune anomalie matricielle ou cellulaire) à 14 (arthrose évoluée). D'après Mankin 1971.

Nous avons classé les cartilages en arthrosiques ou non de manière différente suivant la question posée. Pour les analyses de composition biochimique et de comportement cellulaire, nous avons considéré comme non arthrosiques les cartilages macroscopiquement non atteints, sans tenir compte de l'aspect histologique, pour plusieurs raisons. Premièrement, les autres études publiées sur les propriétés physico-chimiques des cartilages utilisaient une classification macroscopique pour sélectionner les échantillons dits « non arthrosiques » (Dang 2003). Par ailleurs, nous avons constaté que les deux évaluations macroscopique et histologique ne donnaient pas systématiquement des résultats superposables, en raison de l'atteinte hétérogène du cartilage dans une articulation arthrosique. Ainsi, certains cartilages étaient considérés comme sains histologiquement mais avaient une arthrose macroscopique nette, car la carotte avait été effectuée en zone non érodée, tandis que d'autres avaient un score histologique plus élevé que ne laissait présager l'observation macroscopique. En particulier, ils présentaient des images de prolifération cellulaire susceptibles de fausser le calcul de la densité cellulaire. En conséquence, pour les quantifications histomorphométriques

de cartilages « non arthrosiques », il nous a paru plus fiable d'ajouter le score microscopique au score macroscopique. Au total, l'aspect macroscopique permettait de donner une évaluation globale de l'articulation considérée, contrairement à l'analyse histologique qui était focalisée sur une zone de l'articulation, alors que celle-ci peut être touchée de manière hétérogène.

B. Histomorphométrie

Pour la *description histomorphométrique des cartilages sains*, nous avons considéré comme exploitables les cartilages classés en Outerbridge 1 ou 2 AVEC un score de Mankin inférieur ou égal à 4 ET un score cellulaire de Mankin inférieur ou égal à 1, c'est à dire les cartilages non arthrosiques macroscopiquement, avec un grade microscopique faible et une absence de clones cellulaires.

L'analyse des échantillons de cartilage sain portait sur les couches superficielle, intermédiaire et profonde du cartilage à l'exclusion du cartilage calcifié. Elle comportait la mesure de l'épaisseur globale et de celle de ses 3 couches, et la mesure de la densité cellulaire à l'aide du logiciel Cellsens (Olympus).

La coupe de cartilage était segmentée manuellement par des lignes parallèles à la surface du cartilage et à la tide mark en ses 3 couches : superficielle avec des chondrocytes petits et allongés parallèlement à la surface du cartilage, intermédiaire avec des chondrocytes volumineux et arrondis, disposés irrégulièrement, et profonde avec ses colonnes de chondrocytes arrondis, puis on dessinait une zone d'intérêt rectangulaire de 800 microns de largeur, et dont l'épaisseur correspondait à celle du cartilage. Les cellules étaient comptées dans chaque zone et la densité par zone calculée en rapportant le nombre de cellules à la surface de chaque zone.

Nous avons de plus mesuré la surface des chondrocytes de chaque articulation, en faisant la moyenne des surfaces de 6 cellules par couche et par articulation, à l'aide de l'outil « freehand polygon » du même logiciel.

C. Statistiques

Pour l'étape d'histomorphométrie, les paramètres mesurés (épaisseur totale du cartilage et densité cellulaire) ont été comparés entre les différentes localisations de cartilages au moyen du test non paramétrique apparié de Wilcoxon, uniquement dans les échantillons de cartilages non arthrosiques. La corrélation entre densité cellulaire et épaisseur du cartilage, et celle entre taux de CML et d'HCit ont été faites grâce au calcul du coefficient de Spearman (non paramétrique). Les taux d'HCit et de CML ont été comparés entre les différentes localisations respectivement pour les cartilages arthrosiques et non arthrosiques au moyen du test non paramétrique non apparié de Mann-Whitney. Celui-ci a de plus été utilisé pour comparer pour chaque localisation les cartilages arthrosiques aux non arthrosiques.

IV. Mesure des altérations biochimiques de la matrice extracellulaire liées à l'âge

Pour toutes les *mesures de composition biochimique de la matrice* ont été considérés

- **comme non arthrosiques : les cartilages classés en Outerbridge 1 ou 2**
- **comme arthrosiques : les cartilages classés en Outerbridge 3 ou 4**

Nous avons mesuré les taux d'HCit et de CML rapportés à la quantité totale de lysines, dans des échantillons de cartilages provenant des mêmes sujets, par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrophotométrie de masse (LC-MS/MS) (Wang 2007, Thornalley 2003). Le protocole suivait celui décrit par Jaisson (Jaisson 2018) et a été mené dans le laboratoire CNRS (UMR 7369) MEDyC Unité « Vieillissement matriciel et remodelage vasculaire » de Reims en collaboration avec le Dr Stéphane Jaisson. Les tissus étaient pesés, broyés en phase acide, subissaient une hydrolyse acide puis une évaporation. Les hydrolysats secs étaient enfin étudiés par LC-MS/MS. Les résultats sont exprimés en un ratio entre la quantité de lysines carbamylées ou carboxyméthylées et celle de lysines non altérées (mmol/mol Lys).

Enfin, pour avoir un ordre de grandeur des mécanismes de carbamylation et glycoxydation dans le cartilage en comparaison à d'autres tissus, nous avons également quantifié l'HCit et la CML dans des échantillons de peau et de tendon quadricipital de 7

sujets, la peau étant le tissu de référence utilisé dans les études sur la carbamylation, et le tendon car il est pratiquement exclusivement constitué de collagène de type I.

V. Méthodes pour l'objectif 2 : réponse biologique du cartilage non arthrosique

A. Survie cellulaire

Avant d'étudier la réponse à un stimulus inflammatoire des cartilages, nous avons vérifié qu'ils contenaient encore des cellules vivantes. Pour cela, nous avons libéré les chondrocytes des fragments de cartilage en les incubant dans une solution de libérase (Blendzyme Roche), 90 min à 0,52 U/ml puis 12 h à 0,13 U/ml, et compté à la cellule de Malassez le nombre de cellules colorées après ajout de Bleu Trypan 0,1%, en le rapportant au nombre total de cellules.

B. Effet de la stimulation par IL-1 β des cartilages

Pour toutes les *mesures de réponse biologique des cartilages* ont été considérés

- **comme non arthrosiques : les cartilages classés en Outerbridge 1 ou 2**
- **comme arthrosiques : les cartilages classés en Outerbridge 3 ou 4**

Les explants de cartilage étaient lavés dans du PBS puis segmentés en fragments mesurant moins de 2mm et pesés afin de constituer des échantillons de poids similaire (50 ± 5 mg), 3 par condition de culture (dans la mesure où la répartition de chaque zone de cartilage dans chaque puit ne pouvait être homogène d'un échantillon à l'autre en particulier au genou). Les fragments tissulaires étaient placés à l'étuve dans du milieu (DMEM 4,5g/l glucose, supplémenté avec 100 IU/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine, et 4 mM L-glutamine) avec ou sans IL-1 β à la concentration de 5ng/ml, à raison de 6 ml/g de tissu. Après

24h, les surnageants étaient récupérés et congelés à -80°C de même que les fragments de cartilage, à sec.

L'expression protéique a été mesurée dans les surnageants au moyen de kits ELISA : IL-6, MCP-1, MMP-3 (R&D Systems, Abingdon), PGE₂ (Cayman Chemical).

1. Rationnel de la stimulation par l'IL-1 β

L'IL- β a été utilisée comme stimulus car c'est un médiateur bien caractérisé de l'activité catabolique (y compris la production de MMP-13) et anti-anabolique, supposé jouer un rôle important dans le développement de l'arthrose (Pelletier 2001, Jacques 2006). Cette cytokine est communément employée dans les études portant sur les chondrocytes murins ou humains, comme amplificateur de la réponse cellulaire, dans la mesure où ces cellules sont de base, au repos (Alvarez-Garcia 2014). Il s'agit du modèle expérimental habituel pour étudier les phénomènes se produisant au cours de l'arthrose, en reproduisant un environnement inflammatoire (Gosset 2008c).

2. Choix des protéines d'intérêt

Nous avons sélectionné une cytokine inflammatoire, l'IL-6, la chimiokine MCP-1, la PGE₂, et une métalloprotéinase : la MMP-3, toutes ces molécules étant impliquées dans la physiopathologie de l'arthrose.

Les quantités de protéines sécrétées ont été présentées brutes, reflétant ainsi la production à l'échelle du cartilage entier. Les cartilages issus de chaque localisation étaient appariés selon leur état arthrosique ou non.

C. Statistiques

Les comparaisons de la sécrétion basale de différents facteurs par les différentes localisations de cartilages non stimulés, et entre les taux d'accroissement de la sécrétion en fonction de la localisation anatomique ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique non apparié de Mann-Whitney (one-tailed).

VI. Méthodes pour l'objectif 3 : réponse biologique du cartilage arthrosique

A. Effet de la stimulation par IL-1 β des cartilages

Le protocole de stimulation par IL1- β était identique à celui de l'objectif 2 hormis la nature des prélèvements : cartilages arthrosiques macroscopiquement. Les quantités de protéines sécrétées ont été présentées brutes et non normalisées par la densité de chaque cartilage en raison de la difficulté d'évaluer la densité cellulaire d'un cartilage arthrosique, présentant un patchwork de zones détruites, de zones avec des chondrocytes en prolifération et des zones pauci cellulaires.

B. Statistiques

Les comparaisons de la sécrétion basale de différents facteurs par les différentes localisations de cartilages non stimulés, et entre les taux d'accroissement de la sécrétion en fonction de la localisation anatomique ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique non apparié de Mann-Whitney (one-tailed). Ce test a aussi été utilisé pour comparer pour chaque localisation les accroissements de sécrétion des protéines entre cartilages non arthrosiques et arthrosiques.

VII. Méthodes pour l'objectif 4 : Recherche d'une association entre les taux sériques d'HCit et de CML et la gravité de l'atteinte structurale dans l'arthrose de la main

A. Rappel de l'objectif

Notre objectif était de déterminer, dans une cohorte de patients présentant une arthrose de la main symptomatique selon les critères de l'American College of Rheumatology avec un stade radiographique de Kellgren et Lawrence (KL) ≥ 2 sur plus d'une articulation, si les taux sériques d'HCit et de CML étaient plus élevés chez les patients présentant une arthrose érosive que chez les patients présentant une arthrose non érosive, ce sous-type plus sévère pouvant avoir une composante systémique. Nous avons recherché également une corrélation entre les taux sériques d'HCit et de CML et la sévérité radiographique de l'arthrose à l'inclusion (notamment le score global de KL, le nombre d'articulations érosives par patient et le nombre d'articulations atteintes d'arthrose). Enfin, nous avons cherché à savoir si les niveaux de carbamylation et de carboxyméthylation étaient plus élevés chez les patients présentant des localisations multiples de l'arthrose par rapport aux patients présentant une atteinte isolée de la main par l'arthrose.

B. Population d'étude

Ce travail a été effectué sur la cohorte DIGICOD, plus importante cohorte française d'arthrose de la main (Sellam 2021). La population étudiée comprenait l'ensemble de la cohorte DIGICOD à l'inclusion (n=426) avec un échantillon de sérum disponible dans la collection biologique (n=420).

Brièvement, cette cohorte comprend les patients âgés de 35 ans et plus, présentant une arthrose digitale symptomatique (douleur ou nodosité) au niveau de deux articulations parmi les articulations MCP et IPP ou au niveau de l'articulation trapézométacarpienne du pouce, stade radiographique selon KL ≥ 2 . Les patients présentant un rhumatisme inflammatoire chronique destructeur, une chondrocalcinose articulaire connue, la goutte, une arthrose de la main secondaire à une cause infectieuse, traumatique ou génétique ont été exclus.

C. Critères d'analyse

Les caractéristiques démographiques, cliniques et radiographiques initiales des patients inclus dans l'étude ont été décrites.

Les patients ont été caractérisés selon les critères suivants :

- âge
- sexe
- présence d'une maladie cardiovasculaire car il s'agit d'un facteur connu d'augmentation du taux de carbamylation
- IMC
- fonction rénale selon le débit de filtration glomérulaire (DFG), car il s'agit d'un facteur connu d'augmentation du taux de carbamylation
- nombre de sites arthrosiques symptomatiques connus des patients (parmi les genoux, les hanches et les épaules)
- score de KL de toutes les articulations digitales et de la colonne du pouce des 2 mains
- score AUSCAN (AUStralian CANadian Osteoarthritis Hand Index) pour la douleur, la fonction et la raideur (auto-questionnaire)
- douleur selon l'échelle visuelle analogique (EVA) : au repos et à l'activité

Le DFG était calculé en utilisant l'équation de l'étude MDRD (Modification of the Diet in Renal Disease study equation)(Levey 1999) :

$$\begin{aligned} \text{DFG (mL / min / 1.73m}^2\text{)} \\ = 175 \times \text{créatininémie}^{-1.154} \times \text{Age}^{-1.203} \times 0.742 \text{ (si sexe féminin)} \end{aligned}$$

Où la créatininémie est en mg/dL et l'âge est exprimé en année. La perte de fonction rénale était définie par un DFG \leq 60 mL/min/1.73 m².

Une maladie cardiovasculaire était définie par la présence d'une ou plusieurs pathologies cardiovasculaires parmi :

- Infarctus du myocarde
- Angine de poitrine
- Insuffisance cardiaque
- Accident vasculaire cérébral
- Artériopathie oblitérante des membres inférieurs

- Hypertension Artérielle ($TAS \geq 140$ mm Hg ou $TAD \geq 90$ mm Hg) ou traitement antihypertenseur déclaré ou identifié à partir de la table des traitements non spécifiques de l'arthrose digitale).

Les taux sériques d'HCit et de CML ont été mesurés par une méthode de LC-MS/MS, dans le laboratoire du Dr Jaisson. Les résultats ont été exprimés sous forme de rapport entre la quantité de lysines carbamylées ou de lysines carboxyméthylées, et la quantité de lysines non altérées (mmol/mol Lys).

L'arthrose digitale érosive était définie par la présence d'au moins une articulation inter phalangienne érosive (score de Verbruggen = E signant des érosions jusqu'à l'os sous-chondral, ou = R, signant un remodelage avec formation d'une nouvelle plaque sous-chondrale scléreuse et irrégulière)(Verbruggen 1996).

Une analyse de sensibilité a été réalisée en considérant l'arthrose érosive définie par la présence d'au moins 2 articulations avec un score de Verbruggen E ou R.

Le projet complet, accepté par le conseil scientifique de DIGICOD est en annexe.

D. Statistiques

Les variables qualitatives sont décrites par leur fréquence et leur effectif, et les variables quantitatives par leur moyenne et l'écart-type, ou par la médiane et l'intervalle interquartile si leur distribution n'est pas normale.

La relation entre les taux sériques d'HCit ou de CML et le caractère érosif de l'arthrose digitale a été étudiée au moyen d'un modèle de régression logistique.

Dans un premier temps, l'effet de chaque facteur de risque potentiel (HCit, CML, âge, sexe, IMC, DFG, antécédent de maladie cardiovasculaire) a été étudié au moyen d'un modèle de régression logistique non ajusté. Les variables significatives associées au seuil de 0.25 ont été intégrées dans un modèle ajusté (1). L'IMC étant corrélé au HCit, il n'a pas été intégré dans le modèle ajusté.

$P(\text{Arthrose digitale érosive} = 1)$

$$= \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{HCit} + \beta_2 \cdot \text{âge} + \beta_3 \cdot \text{sexe} + \beta_4 \cdot \text{Maladie cardiovasculaire}}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{HCit} + \beta_2 \cdot \text{âge} + \beta_3 \cdot \text{sexe} + \beta_4 \cdot \text{Maladie cardiovasculaire}}}$$

La relation entre les taux sériques d'HCit ou de CML et le DFG d'une part, et l'âge d'autre part, a été étudiée par un coefficient de corrélation de Pearson et représentée graphiquement par un nuage de point.

La relation entre les taux sériques d'HCit ou de CML et la sévérité radiographique (score total de KL, nombre d'articulations avec un score de $KL \geq 2$ et nombre total d'articulations érosives) de l'arthrose digitale a été étudiée par un coefficient de corrélation et représentée graphiquement par un nuage de point.

La relation entre les taux sériques d'HCit ou de CML et la présence d'une autre localisation symptomatique d'arthrose que l'arthrose digitale (parmi les hanches, les genoux ou les épaules) a été étudiée au moyen d'un modèle de régression logistique. Dans un premier temps, l'effet de chaque facteur de risque potentiel (HCit, CML, âge, sexe, DFG, ICM et antécédent de maladie cardiovasculaire) a été étudié au moyen d'un modèle de régression logistique non ajusté.

La relation entre les taux sériques d'HCit ou de CML et la sévérité des symptômes (AUSCAN douleur, raideur et fonction, EVA au repos et à l'activité), nombre d'articulations a été étudiée par un coefficient de corrélation et représentée graphiquement par un nuage de point.

RESULTATS

I. Données épidémiologiques de la série cadavérique

Au total, 14 sujets ont eu une analyse histologique des cartilages, et 11 d'entre eux ont pu être utilisés pour les études biologiques. L'âge moyen des sujets était de 78 ans (55 à 94). Il y avait 8 hommes et 6 femmes. Le délai moyen entre le décès et le prélèvement était de 53 heures (24 à 120).

Dans les tableaux 5 et 6, les cartilages sont classés :

- macroscopiquement grâce à la classification d'Outerbridge allant de 1 à 4, un cartilage ayant un grade de 1 ou 2 était considéré comme sain, et comme pathologique si le grade était de 3 ou 4.
- microscopiquement grâce à la classification de Mankin allant de 0 à 14,
- en arthrosique ou non en jumelant les informations macroscopiques et histologiques : les cartilages étaient considérés non arthrosiques et utilisables dans l'étude histomorphométrique si avaient un score d'Outerbridge de 1 ou 2 AVEC un score de Mankin inférieur ou égal à 4 ET un score cellulaire de Mankin inférieur ou égal à 1.

Sujet	Age	Sexe	BMI	h depuis le décès	IPP			MCP			genou		
					Macro	Micro	OA	Macro	Micro	OA	Macro	Micro	OA
4136	85	H	C	120	1	4	N	1	2	N	1	3	N
4119	81	H	N	48	3	4	O	1	3	N	1	2	N
4123	80	F	N	72	4	8	O	1	4	O	1	6	O
4192	94	F	N	24	1	7	O	3	7	O	1	3	N
4202	80	H	N	72	4	7	O	4	3	O	1	3	N
4251	80	F	O	36	3	4	O	3	2	O	4	13	O
4273	67	H	N	120	1	4	N	1	2	N	1	2	N
4306	55	H	N	72	1	1	N	1	0	N	1	2	N
4326	80	F	O	48	1	3	N	1	2	N	4	9	O
4348	79	H	N	96	3	ND	O	3	5	O	4	ND	O
4502	69	F	N	24	1	1	N	1	0	N	1	4	O
4460	83	H	N	24	1	3	N	1	0	N	4	1	O
4551	82	F	O	24	3	3	O	4	1	O	4	6	O
4608	78	H	N	24	3	5	O	1	0	N	1	0	N

Tableau 5 : Données épidémiologiques de la série et scores d'arthrose des échantillons : macroscopique selon la classification d'Outerbridge et microscopique selon Mankin. Les échantillons sont classés en arthrosiques (OA) ou non en associant les deux informations, en vue des analyses d'histomorphométrie. H : homme ; F : femme ; O : oui ; N : non, ND : non disponible. C : cachectique ; N : normal ; O : obèse.

Afin d'illustrer ces aspects macroscopiques et microscopiques, les articulations de plusieurs sujets sont visibles en annexe.

	Macro		Macro+micro	
	sain	pathologique	sain	arthrosique
IPP	7	6	6	7
MCP	8	5	7	6
genou	8	5	6	7

Tableau 6 : Classement final des échantillons de cartilage : macroscopique en vue des études cellulaires et de composition biochimique, et associant analyses macroscopique et microscopique en vue de l'analyse histomorphométrique.

Au total le score microscopique a conduit à un classement final comme arthrosique de 4 échantillons de cartilage sain macroscopiquement (score 0 selon Outerbridge) : IPP du sujet 4192, MCP (score cellulaire à 2) et genou du sujet 4123, genou 4502 (score cellulaire 2).

A noter qu'un échantillon de cartilage était considéré comme macroscopiquement arthrosique mais avait un score de Mankin à 1.

L'âge moyen des patients ayant des IPP non arthrosiques était de 76 ans, versus 80 ans pour les arthrosiques, l'âge de ceux ayant des MCP non arthrosiques était de 75 ans versus 83 ans pour les arthrosiques, l'âge de ceux ayant des genoux non arthrosiques était de 77 ans versus 81 ans pour les arthrosiques.

II. Objectif 1

A. Histomorphométrie des cartilages macroscopiquement et microscopiquement non arthrosiques

Parmi les 14 sujets analysés, 6 genoux, 6 IPP et 7 MCP étaient considérés comme non arthrosiques. Il existait un gradient d'épaisseur en rapport avec la taille des articulations, le cartilage de genou étant plus épais que celui des MCP qui lui même était plus épais que celui des IPP (respectivement $p=0,0006$, $p=0,003$) (Figures 14 et 15).

La densité cellulaire était quant à elle plus importante dans les IPP que dans les MCP ($p=0,02$) et que dans les genoux ($p=0,07$) (Figure 15). Cette différence concernait les couches intermédiaire et profonde mais pas la couche superficielle (Figure 16).

La densité cellulaire était inversement corrélée à l'épaisseur du cartilage lorsqu'on regroupait toutes les localisations (Spearman $r=-0,76$ et $p=0,0002$).

La surface des cellules ne différait pas d'une articulation à l'autre, et ce pour chaque couche du cartilage (Figure 17).

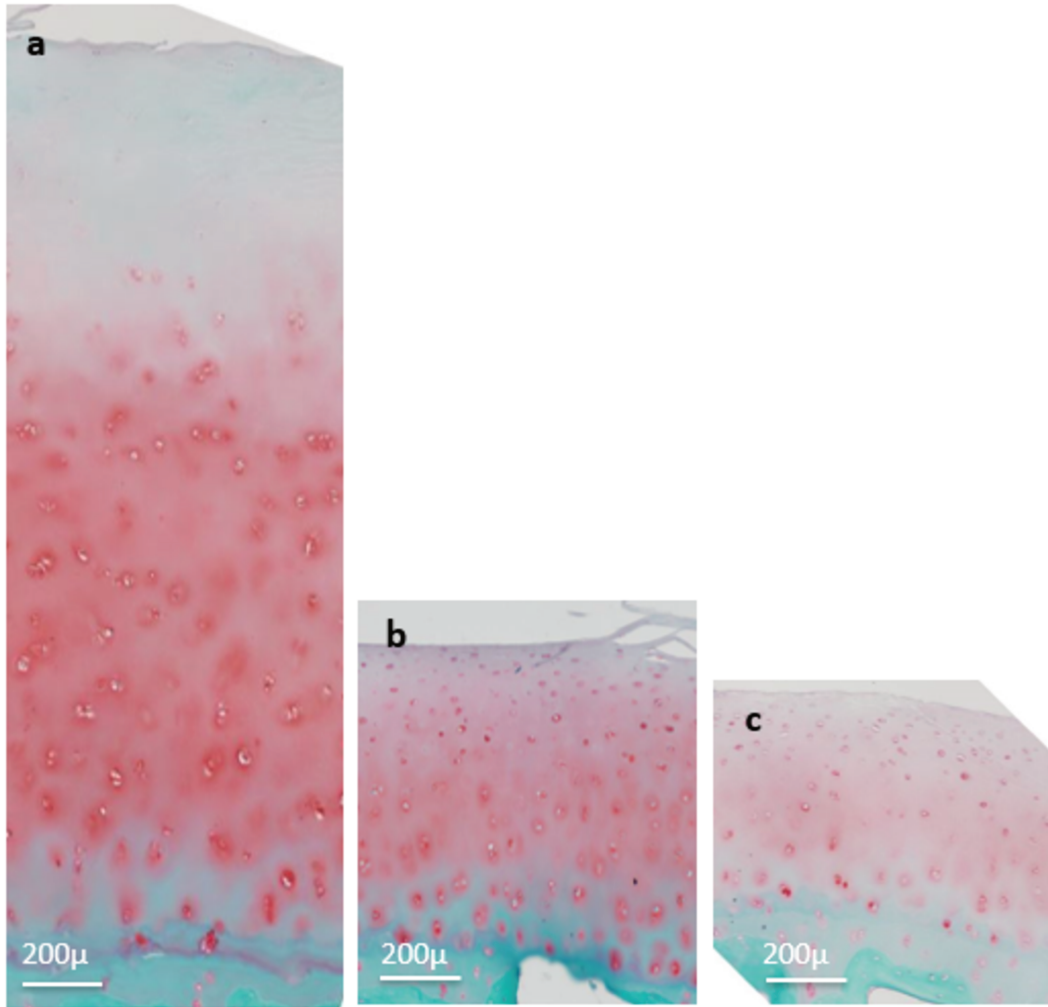


Figure 14 : Coupes de cartilage de genou (a), de MCP (b) et d'IPP (c) colorées par Safranine O, fast Green et hématoxyline, provenant d'un homme de 85 ans J5 post-mortem. Grade 1 d'Outerbridge. Grade 3 selon Mankin, dont grade 0 pour la cellularité. Les images sont à la même échelle.

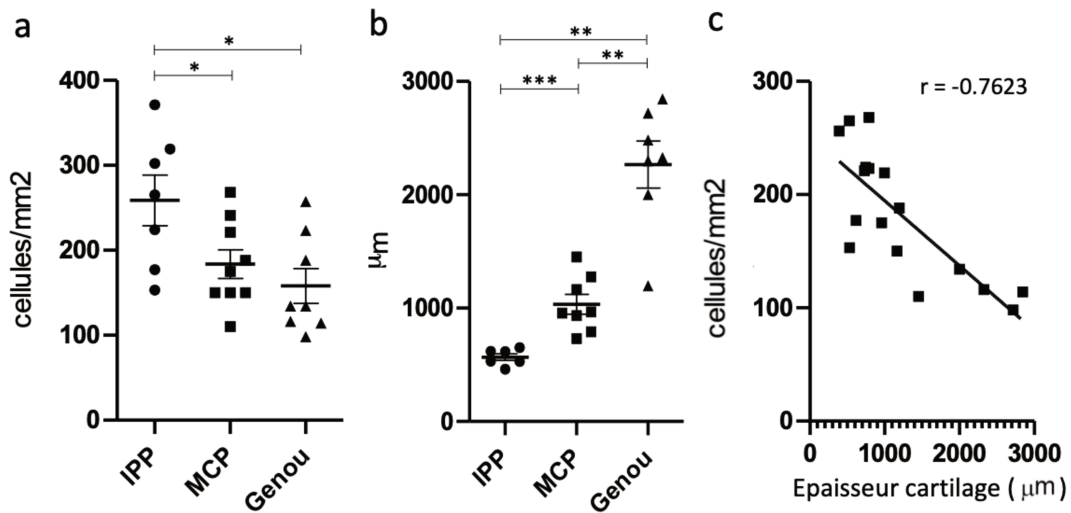


Figure 15 : Résultats de l'analyse histologiques des cartilages sains de genou, de MCP et d'IPP : densité cellulaire des cartilages (a), épaisseur des cartilages (b), corrélation entre la densité cellulaire et l'épaisseur des cartilages (c). Toutes les localisations ont été réunies pour ce dernier graphique. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; *** : $p < 0,0005$

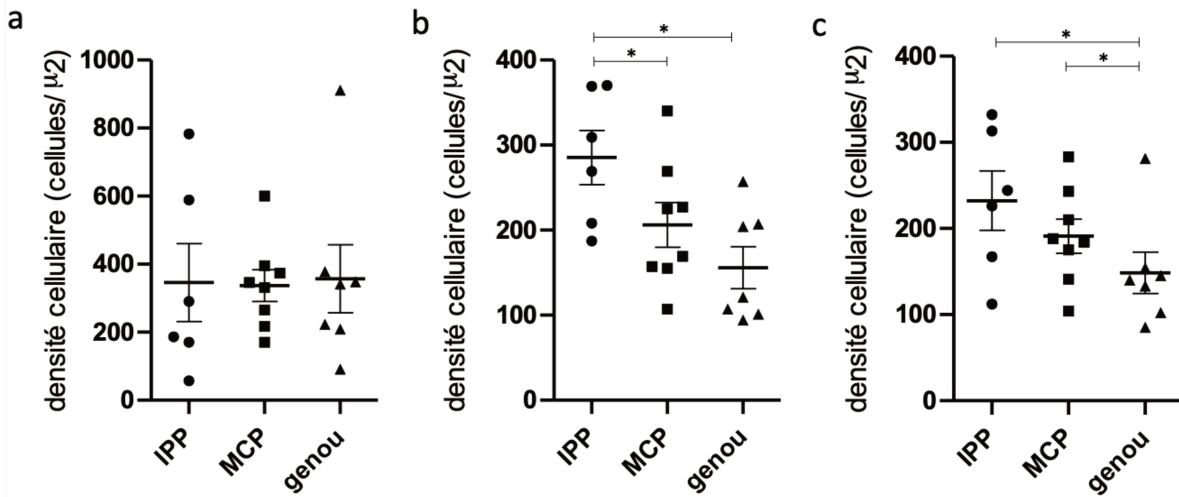


Figure 16 : Densité des chondrocytes dans les cartilages IPP, MCP et de genou : dans la couche superficielle (a), la couche intermédiaire (b) et la couche profonde (c). * : $p < 0,05$

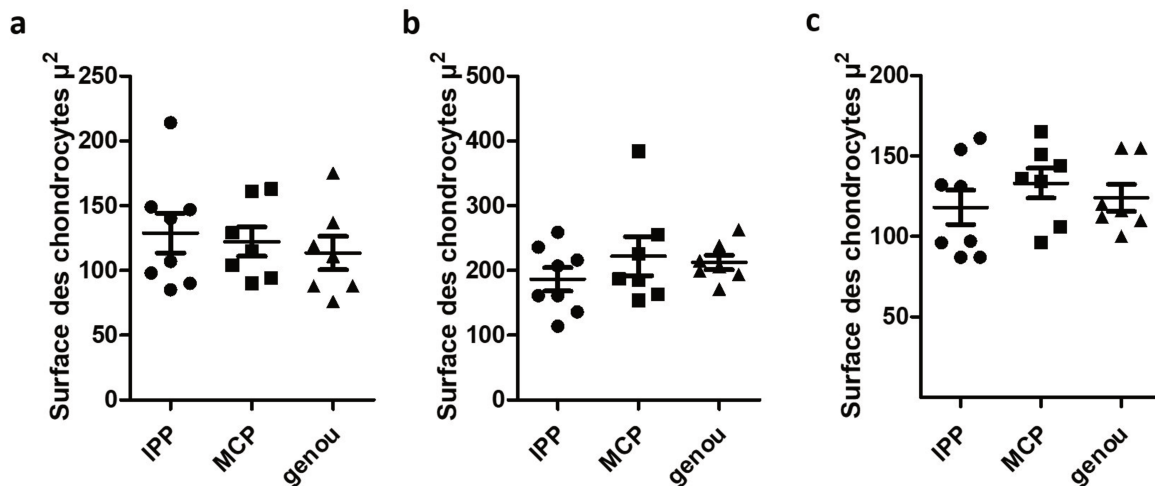


Figure 17 : Surface des chondrocytes dans les couches superficielle (a) ; intermédiaire (b) et profonde (c) des échantillons de cartilages.

B. Mesure des altérations biochimiques de la matrice extracellulaire liées à l'âge

1. Taux d'HCit

Pour chaque localisation, on ne mettait pas en évidence de différence significative entre les cartilages arthrosiques et non arthrosiques.

Cependant, pour une condition donnée (arthrosique ou non), il y avait des différences entre les cartilages de localisations différentes. Ainsi, l'analyse des cartilages non arthrosiques a montré que les IPP avaient un taux d'HCit inférieur à celui des MCP ($p=0,05$) (Figure 18). De la même manière, les IPP arthrosiques avaient un taux d'HCit inférieur aux MCP arthrosiques ($p=0,04$).

On ne retrouvait pas de corrélation entre l'âge des sujets et le taux de carbamylation, quelle que soit l'articulation considérée et l'atteinte arthrosique ou non.

Par ailleurs, la comparaison des taux d'HCit entre différents tissus dans un groupe de 7 sujets a mis en évidence des taux supérieurs dans les cartilages et les tendons par rapport à la peau ($p<0.0005$) et un taux d'HCit supérieur dans les tendons par rapport aux cartilages ($p=0.01$)(Figure 17). Il n'a pas été possible de quantifier l'HCit dans les échantillons d'os spongieux prélevés chez les mêmes sujets pour des raisons techniques.

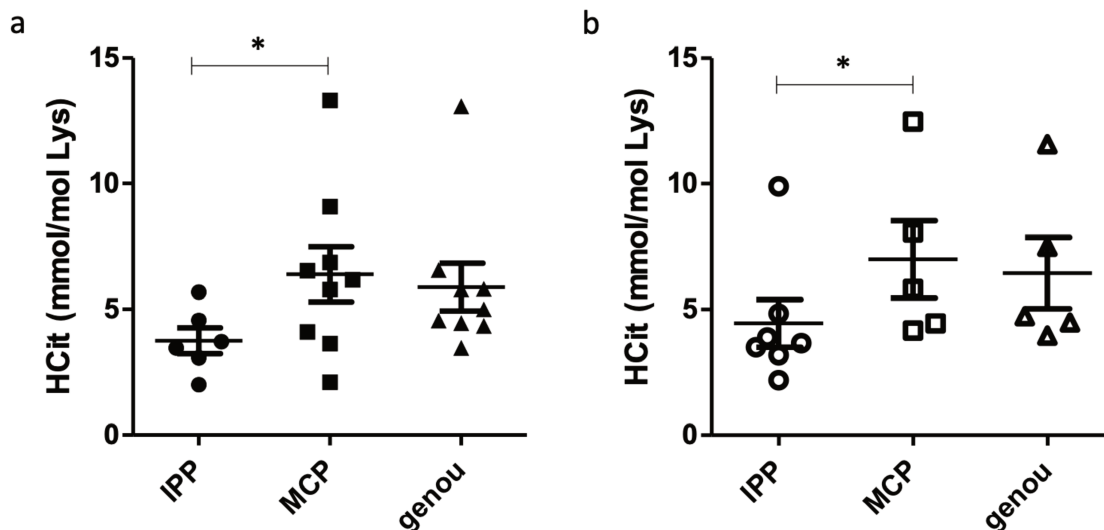


Figure 18 : Mesure de la proportion d'HCit dans des cartilages non arthrosiques (a) et arthrosiques (b) d'IPP, MCP et de genou. * : $p<0,05$

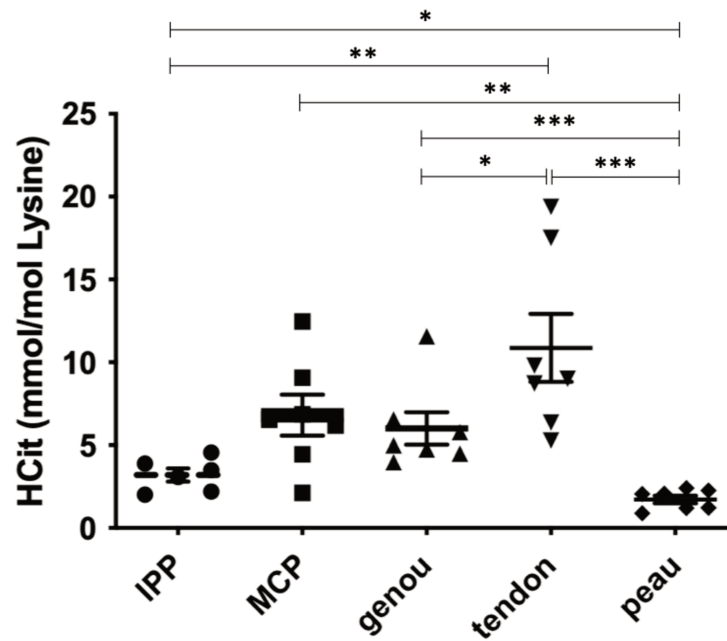


Figure 19 : Mesure de la proportion de Lysines carbamylées dans des cartilages d'IPP, MCP et genou, la peau et le tendon quadricepsital. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; *** : $p < 0,0005$

2. Taux de CML

En ce qui concerne le taux de CML, on n'observait pas de différence entre les IPP et les genoux arthrosiques versus non arthrosiques. En revanche, les MCP arthrosiques avaient un taux de CML significativement supérieur aux MCP non arthrosiques: 7 mmol/mL de Lysine versus 4 en moyenne ($p=0,01$).

Le taux ne différait pas significativement entre les 3 localisations de cartilages sains. Cependant, les MCP arthrosiques avaient un taux de CML significativement supérieur aux IPP ($p=0,015$) et aux genoux arthrosiques ($p=0,006$)(Figure 20).

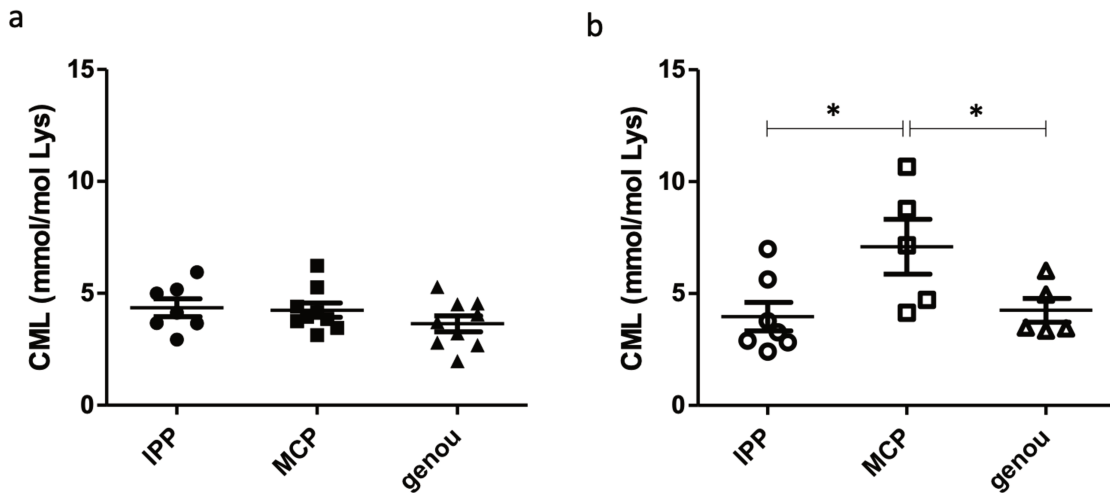


Figure 20 : Mesure de la proportion de CML dans des cartilages non arthrosiques (a) et arthrosiques (b) d'IPP, MCP et de genou. * : $p < 0,05$

Contrairement à HCit, On retrouvait une corrélation entre l'âge des sujets et le taux de CML, quelle que soit l'articulation considérée et l'atteinte arthrosique ou non (Figure 21). Par articulation, les taux de corrélation pour les IPP, MCP et les genoux étaient respectivement 0,7, 0,17 et 0,45.

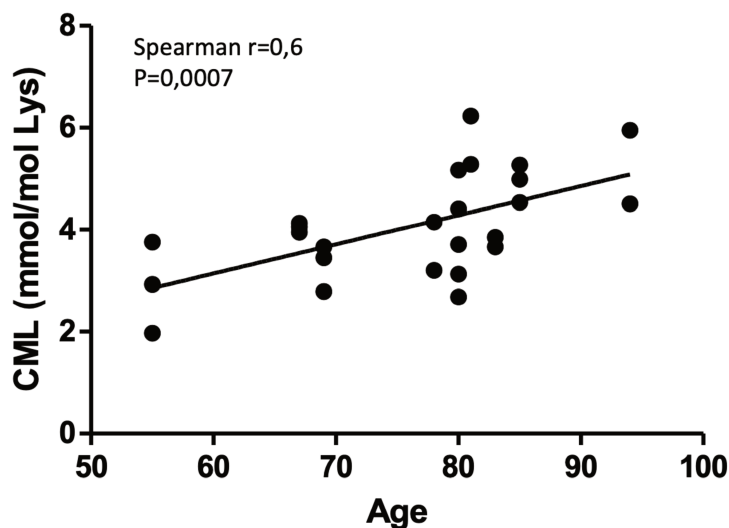


Figure 21 : Corrélation entre l'âge et le taux de CML dans les cartilages non arthrosiques, toutes localisations confondues.

La comparaison des taux de CML entre différents tissus a mis en évidence des taux supérieurs dans les cartilages et les tendons par rapport à la peau ($p < 0,05$) et un taux de CML supérieur dans les tendons par rapport à la peau ($p = 0,0003$) (Figure 22).

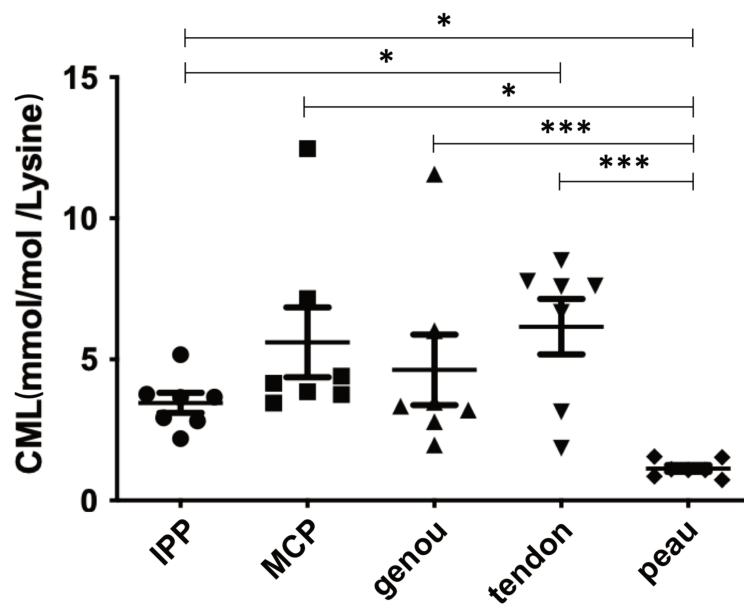


Figure 22 : Mesure de la proportion de CML dans des cartilages d'IPP, MCP et genou, la peau et le tendon quadricipital. * : $p < 0.05$

Les taux d'HCit et de CML étaient corrélés entre eux (Figure 23).

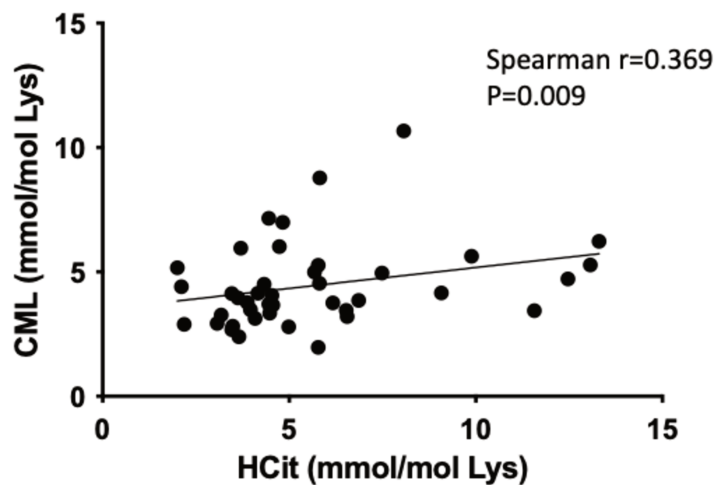


Figure 23 : Mesure de la corrélation entre les proportions d'HCit et de CML dans tous les échantillons de cartilages sains ou arthrosiques. HCit : Homocitrulline CML : Carboxyméthyllysine. Toutes les localisations ont été réunies pour ce graphique.

III. Objectif 2 : Réponse biologique du cartilage sain à un stress inflammatoire par IL-1 β

L'analyse au Bleu Trypan des cellules libérées à partir de cartilages d'IPP, MCP et genoux d'un sujet a révélé des taux de survie respectivement de 90%, 95% et 88%.

L'analyse de la sécrétion basale d'IL-6 par les cartilages n'a pas retrouvé de différence significative entre les localisations anatomiques (Figure 24).

En ce qui concerne la MMP-3, la sécrétion de base était plus importante dans les cartilages MCP qu'aux IPP ($p=0,03$).

Les sécrétions basales de MCP-1 et de PGE₂ ne différaient pas entre les 3 localisations articulaires.

La stimulation par IL-1 β augmentait la production d'IL-6 dans les genoux, mais non significativement aux IPP ($p=0,07$) et MCP ($p=0,06$); de MCP-1 dans les IPP et MCP, mais non significativement dans les genoux ($p=0,06$); PGE₂ uniquement dans les genoux ($p=0,01$). L'IL-1 β n'augmentait pas la sécrétion de MMP-3 quelque soit la localisation du cartilage étudié.

Sous IL-1 β , le taux d'accroissement de sécrétion d'IL-6 était significativement plus important aux genoux qu'aux IPP : la sécrétion augmentait d'un facteur 17 en moyenne pour le genou (ET 20,7), versus 3 (ET 1,9) aux IPP ($p=0,02$).

L'IPP était la localisation pour laquelle l'augmentation de sécrétion de MMP-3 était la plus importante des 3 localisations ($p=0,03$).

On n'observait pas de différence d'accroissement de sécrétion de MCP-1 et de PGE₂ entre les 3 localisations.

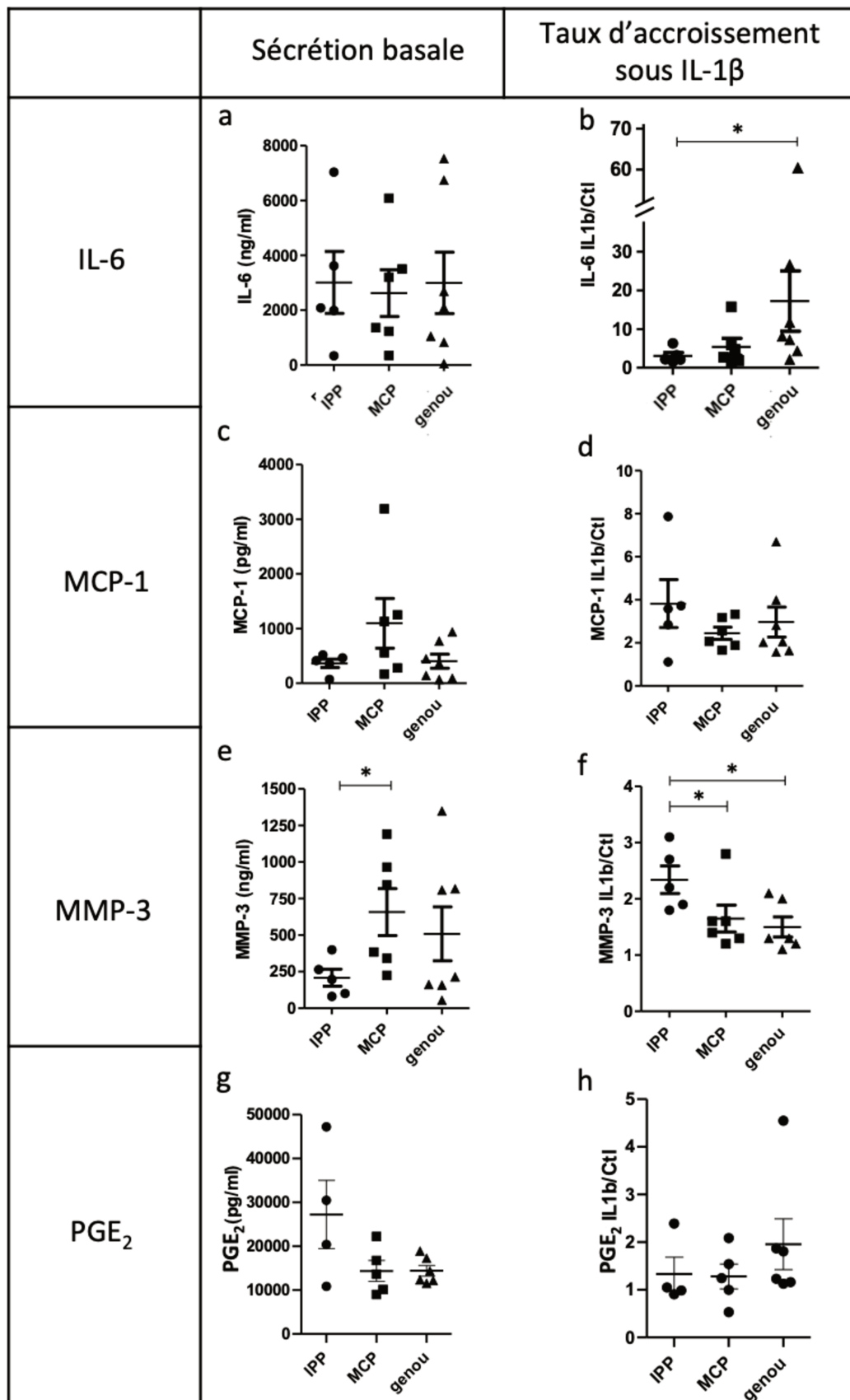


Figure 24 : Sécrétion basale des cartilages non arthrosiques d'IPP, MCP et de genou : d'IL-6 (a), MCP-1 (c), MMP-3 (e) et PGE₂ (g). Taux d'accroissement sous IL-1 β de la sécrétion d'IL6 (b), MCP-1 (d), MMP-3 (f) et PGE₂ (h). * : p<0.05

IV. Objectif 3 : Réponse biologique du cartilage arthrosique à un stress inflammatoire par IL-1 β

L'analyse de la sécrétion basale d'IL-6, de MCP-1 et de MMP-3 par les cartilages n'a pas retrouvé de différence significative entre les localisations anatomiques (Figure 25). En revanche les IPP produisaient plus de PGE₂ que les MCP (p=0.015).

La stimulation par IL-1 β augmentait la production d'IL-6 et de MCP-1 dans les 3 articulations, non de la MMP-3 quelque soit la localisation du cartilage étudié. En ce qui concerne la PGE₂, la production était augmentée sous IL-1 β uniquement dans les genoux (p=0,03).

L'accroissement de la sécrétion d'IL-6 sous IL1- β était plus important aux genoux qu'aux IPP (p=0.019).

On n'observait pas de différence d'accroissement de sécrétion de MMP-3 et de MCP-1 entre les 3 localisations. Enfin il existait une tendance aux genoux à augmenter leur sécrétion de PGE₂ plus que les IPP (p=0.057).

La comparaison des cartilages non arthrosiques et arthrosiques pour chaque localisation ne retrouvait pas de différence significative de taux d'accroissement de production des 4 protéines d'intérêt.

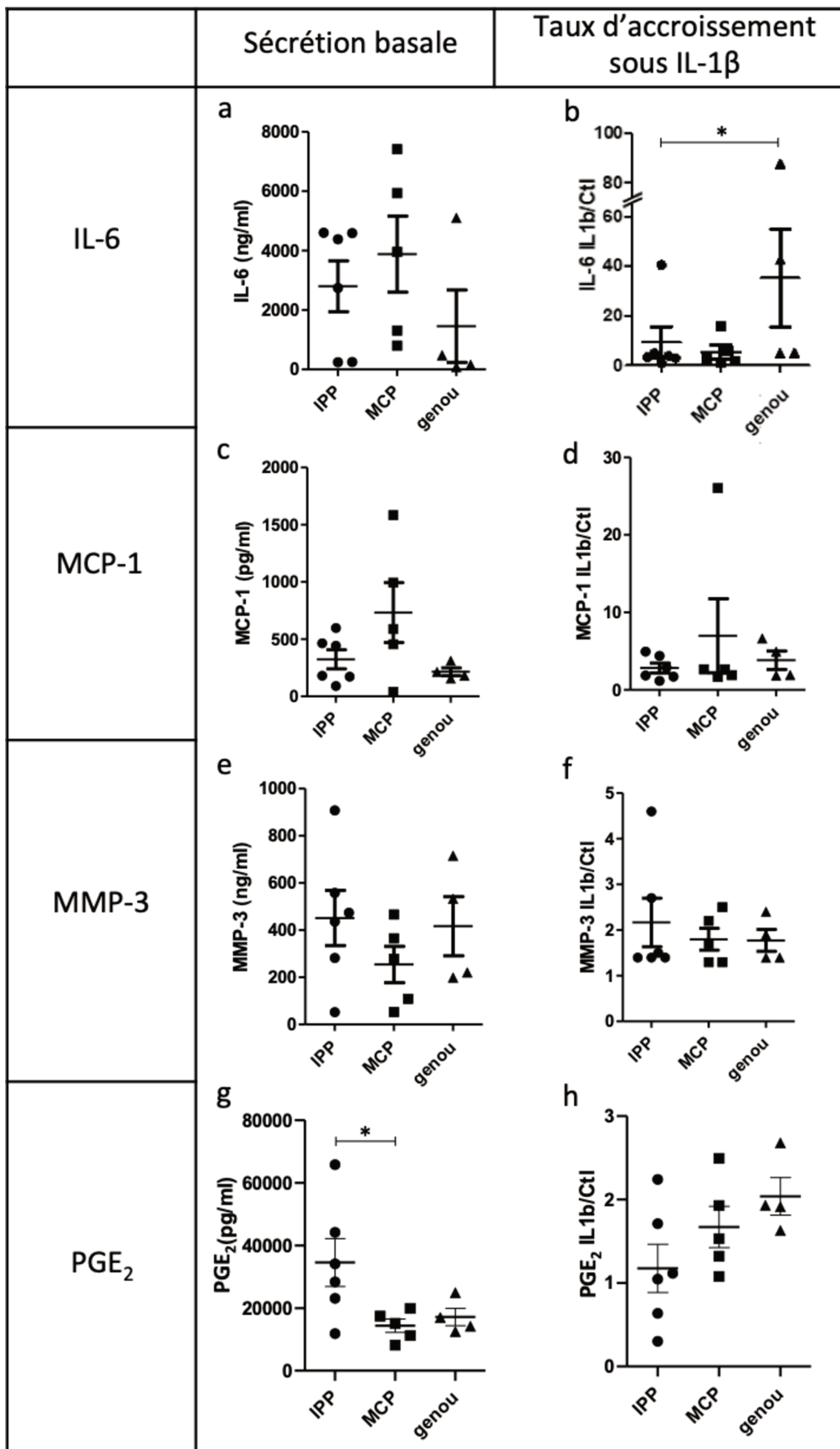


Figure 25: Sécrétion basale des cartilages arthrosiques d'IPP, MCP et de genou: d'IL-6 (a), MCP-1 (c), MMP-3 (e) et PGE₂ (g). Taux d'accroissement sous IL-1 β de la sécrétion d'IL6 (b), MCP-1 (d), MMP-3 (f) et PGE₂ (h). * : p<0.05

V. Objectif 4 : Recherche d'une association entre la quantification de l'HCit et de la CML dans le sérum et la gravité de l'atteinte structurelle du cartilage dans une cohorte de patients atteints d'arthrose de la main

A. Taux d'HCit et arthrose

1. Diagramme de flux

La population d'analyse de la cohorte DIGICOD comportait 426 patients, inclus entre le 10/04/2013 et le 30/06/2017 à l'hôpital Saint-Antoine.

La population d'analyse se composait des 386 patients pour lesquels toutes les variables étudiées étaient disponibles (tableau 7).

Les caractéristiques de la population étudiée sont détaillées dans le tableau 8.

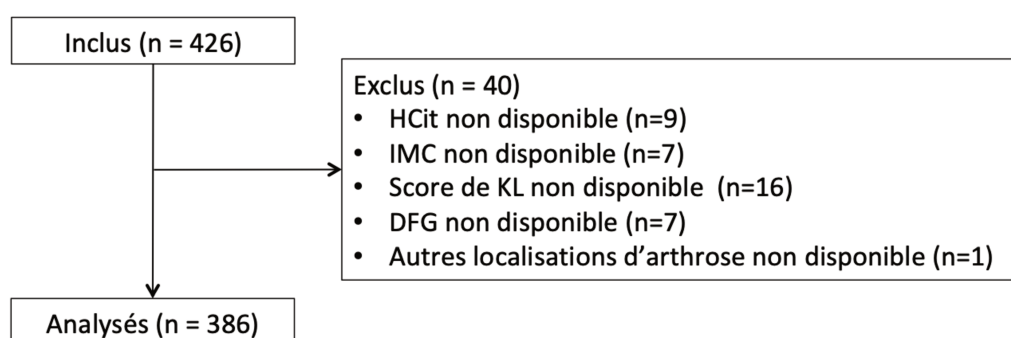


Tableau 7 : Diagramme de flux pour l'étude des taux d'HCit

Variable	Population totale N=386	
	n (%) ou m ± sd ; P50 [P25 ; P75]	(min - max)
FACTEURS DE RISQUE		
Age à l'inclusion (ans)	66.7 ± 7.3	(43.1 - 86.9)
Sexe		
Homme	63 (16.3)	
Femme	323 (83.7)	
Indice de Masse Corporelle	25.1 ± 4.3	(16.4 - 50.3)
Créatinine (µmol/L)	76.0 [70.0 ; 84.0]	(53.0 - 173.0)
Débit de Filtration Glomérulaire (mL / min / 1.73m ²)	68.9 [61.6 ; 75.8]	(28.9 - 113.6)
Perte de la fonction rénale (DFG≤60 mL / min / 1.73m ²)	79 (20.5)	
Pathologies cardiovasculaires	216 (56.0)	
Type de pathologie cardiovasculaire		
Infarctus du myocarde	3 (0.8)	
Angine de poitrine	5 (1.3)	
Insuffisance cardiaque	1 (0.3)	
Accident vasculaire cérébral (AVC ou AIT)	8 (2.1)	
Artériopathie oblitérante des membres inférieurs	1 (0.3)	
Hypertension artérielle	213 (55.2)	
HCit (µmol/mol Lys)	193.9 [159.1 ; 229.1]	(85.9 - 614.9)
CRITERES ETUDIÉS		
Somme du score de KL	46.7 ± 18.0	(4.0 - 95.0)
Nombre d'articulations avec un score KL ≥ 2	15.1 ± 6.3	(0.0 - 31.0)
Nombre d'articulations érosives		
Patients avec au moins une articulation érosive (E ou R)	168 (43.5)	
Patients avec au moins 2 articulations érosives (E ou R)	122 (31.6)	
Autre(s) localisation(s) d'arthrose (parmi les genoux, les hanches ou les épaules)	56 (14.5)	
Autre(s) localisation(s) d'arthrose symptomatique		
Non applicable	330 (85.5)	
Gonarthrose	33 (8.5)	
Coxarthrose	11 (2.8)	
Omarthrose	1 (0.3)	
Gonarthrose + Coxarthrose	3 (0.8)	
Gonarthrose + Omarthrose	4 (1.0)	
Coxarthrose + Omarthrose	2 (0.5)	
Gonarthrose + Coxarthrose + Omarthrose	2 (0.5)	

Tableau 8 : Descriptif des facteurs de risque et des critères étudiés

2. Taux d'HCit et caractéristiques générales de la population

Les valeurs d'HCit suivaient une distribution normale (Figure 26).

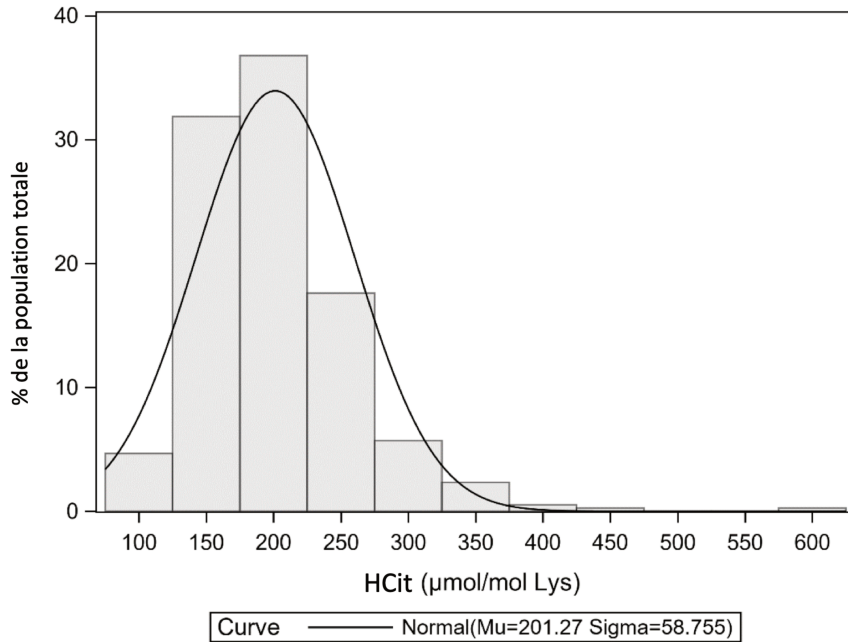


Figure 26 : Distribution de la concentration sérique de HCit

On observait une faible corrélation négative entre de taux d'HCit et le DFG : moins la fonction rénale était bonne, plus le taux d'HCit était élevé (r Pearson = -0.25)(Figure 27).

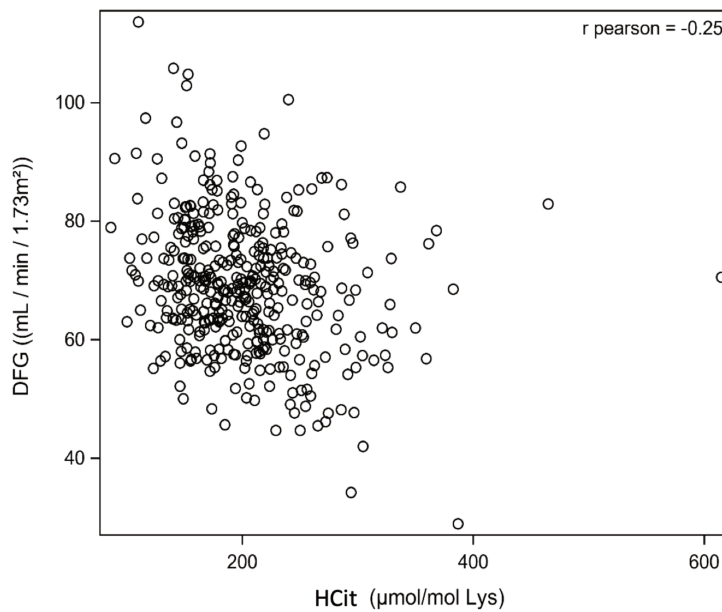


Figure 27 : Corrélation entre le taux d'HCit et le DFG

On observait une faible corrélation entre l'âge et le taux d'HCit : plus les patients étaient âgés, plus leur taux d'HCit était élevé (ρ Pearson = 0.18) (Figure 28).

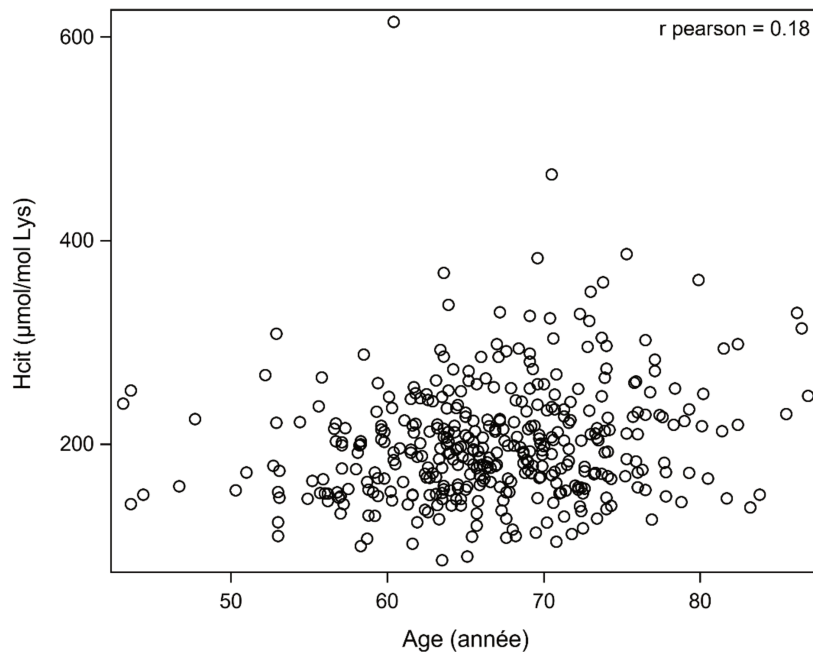


Figure 28 : Corrélation entre l'âge et le taux sérique de HCit

3. Taux sérique d'HCit et arthrose érosive

Cent soixante-huit patients soit 43% des patients analysés avaient au moins une articulation érosive.

L'effet de chaque facteur de risque potentiel (âge, sexe, IMC, DFG, antécédent de maladie cardiovasculaire) sur la probabilité d'avoir au moins une articulation érosive a été étudié tout d'abord au moyen d'un modèle de régression logistique non ajusté. Un sur-risque était mis en évidence chez les patients présentant une maladie cardio-vasculaire, mais il disparaissait après ajustement par l'ensemble des autres variables (Tableau 9).

On ne mettait pas en évidence de relation entre le taux d'HCit et la présence d'une arthrose érosive (modèle non ajusté, $p = 0,7371$; modèle ajusté, $p=0,8$)(Figure 29).

Modèles non ajustés		
Variable	OR [IC à 95%]	P-Value
Age à l'inclusion (ans)	1,05 [1,02-1,08]	0,0012
Sexe (Femme vs Homme)	0,70 [0,41-1,21]	0,2046
IMC	0,98 [0,93-1,03]	0,3540
DFG (mL / min / 1.73m ²)	1,01 [0,99-1,03]	0,2198
Pathologies cardiovasculaires (Oui vs Non)	1,54 [1,02-2,32]	0,0393
HCit (μmol/mol Lys), valeur brute	1,00 [1,00-1,00]	0,7371
HCit (μmol/mol Lys), quartiles		0,8874
[85 - 160[1	
[160 - 195[1,16 [0,66-2,03]	0,6088
[195 - 232[0,98 [0,55-1,72]	0,9323
[232 - 615[1,17 [0,66-2,07]	0,5963

Tableau 9 : Résultats des modèles de régression logistique non ajustés sur l'évènement étudié : présence d'au moins une articulation érosive.

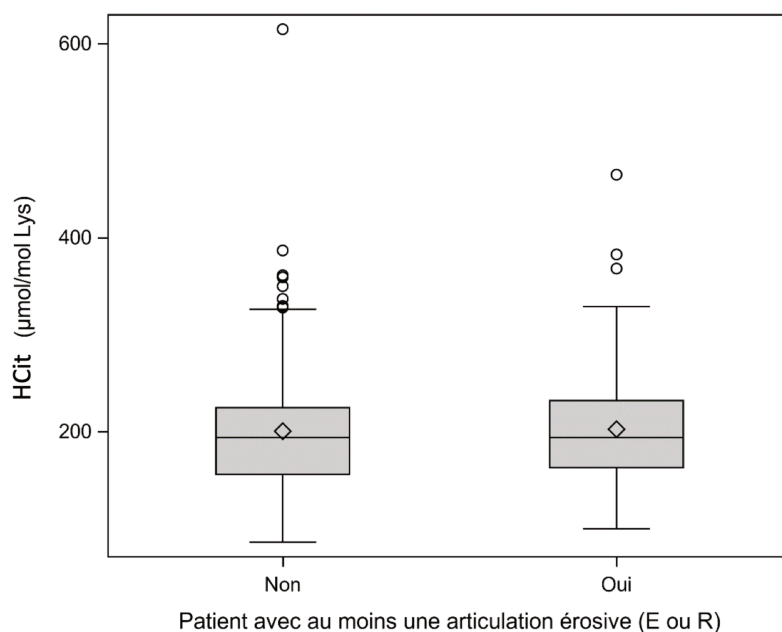


Figure 29 : Taux sérique d'HCit selon la présence ou non d'au moins une articulation érosive

Cent vingt-deux patients avaient au moins deux articulations érosives. On ne mettait pas en évidence de corrélation entre le taux d'HCit et la présence d'au moins deux articulations érosives (modèle non ajusté, $p = 0.6080$).

Enfin, on ne mettait pas en évidence de relation entre la concentration d'HCit et le nombre d'articulations érosives (ρ spearman = 0.06).

4. Taux sérique d'HCit et sévérité de l'arthrose

a. Taux sérique d'HCit et score total de KL

On ne mettait pas en évidence de corrélation entre le taux d'HCit et le score total de KL, c'est à dire la somme des scores de KL de toutes les articulations des doigts longs et de la colonne du pouce des deux mains (ρ pearson = 0.01)(Figure 30).

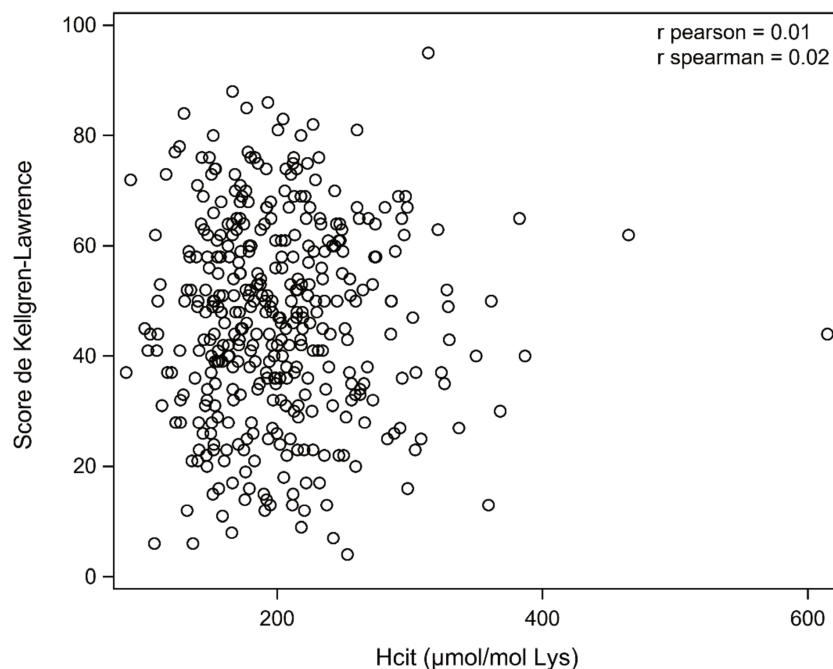


Figure 30 : Relation entre le taux sérique d'HCit et le score de KL

De plus, on ne mettait pas en évidence de relation entre le taux sérique d'HCit et le nombre d'articulations avec un score de Kellgren-Lawrence ≥ 2 (ρ spearman = 0.00).

b. Taux sérique d'HCit et symptômes

On ne mettait pas en évidence de relation entre le taux sérique d'HCit et les scores AUSCAN de douleur, raideur et fonction, ni avec le degré de douleur au repos et à l'activité mesurée par l'EVA.

5. Concentration sérique d'HCit et autres localisations arthrosiques

On ne mettait pas en évidence de relation entre le taux d'HCit et la présence d'autres localisations d'arthrose (modèle non ajusté, $p = 0.3921$)(Figure 31).

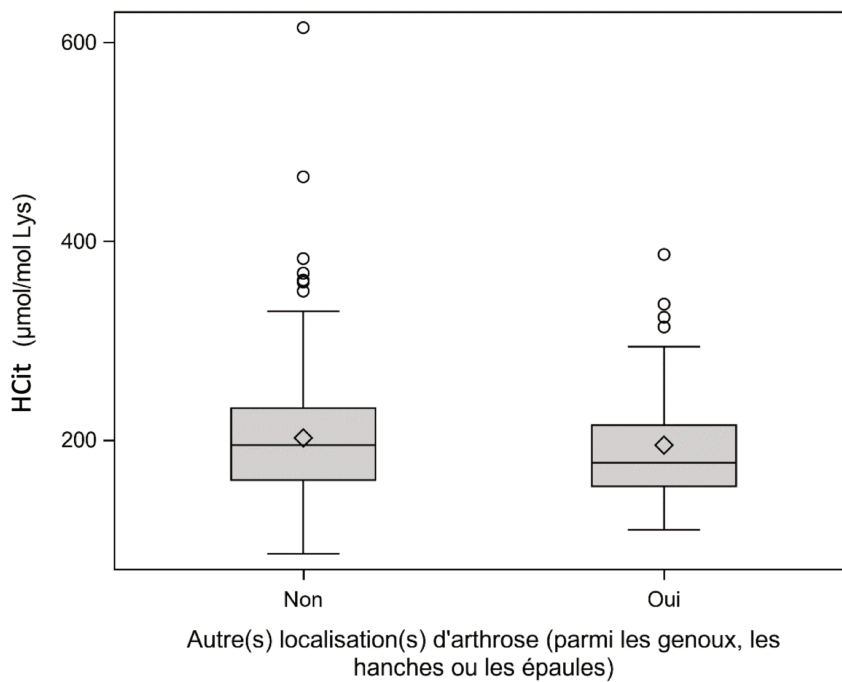


Figure 31: Taux sérique d'HCit selon la présence d'autres localisations d'arthrose

B. Taux de CML et arthrose

1. Diagramme de flux

La population d'analyse se composait des 381 patients pour lesquels toutes les variables étudiées étaient disponibles (tableau 10).

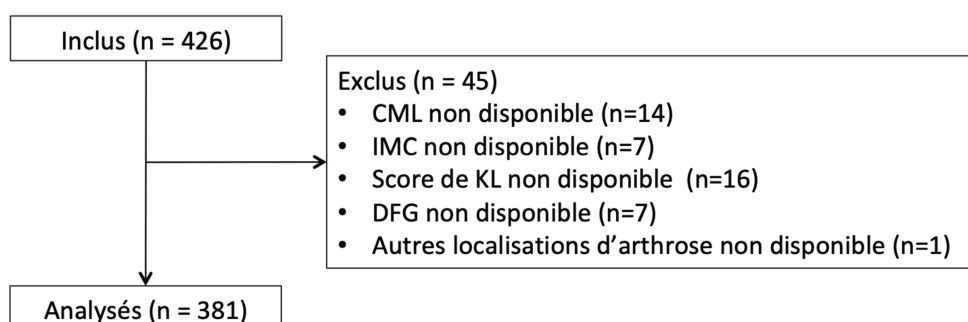


Tableau 10 : Diagramme de flux pour l'étude des taux de CML

2. Taux de CML et caractéristiques générales de la population

Les valeurs de CML suivaient une distribution normale (Figure 32).

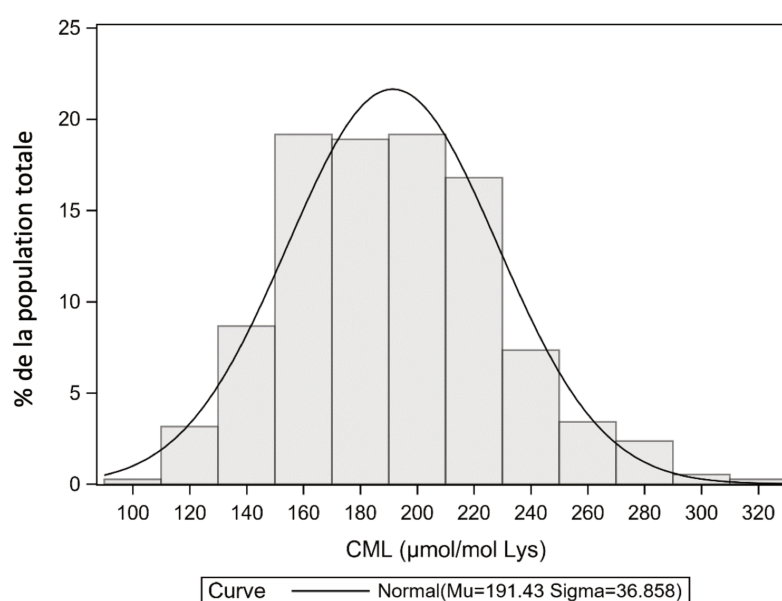


Figure 32 : Distribution des taux sériques de CML

On ne mettait pas en évidence de corrélation entre le taux de CML et le DFG (ρ Pearson = -0.10), ni avec l'âge (ρ Pearson = 0.09).

3. Taux sérique de CML et arthrose érosive

Il existait une association entre le taux de CML et la présence d'une arthrose érosive (modèle non ajusté, OR=0,99 ($p = 0,002$) ; modèle ajusté, OR=0 ;99 ($p=0,001$))(Figure 33).

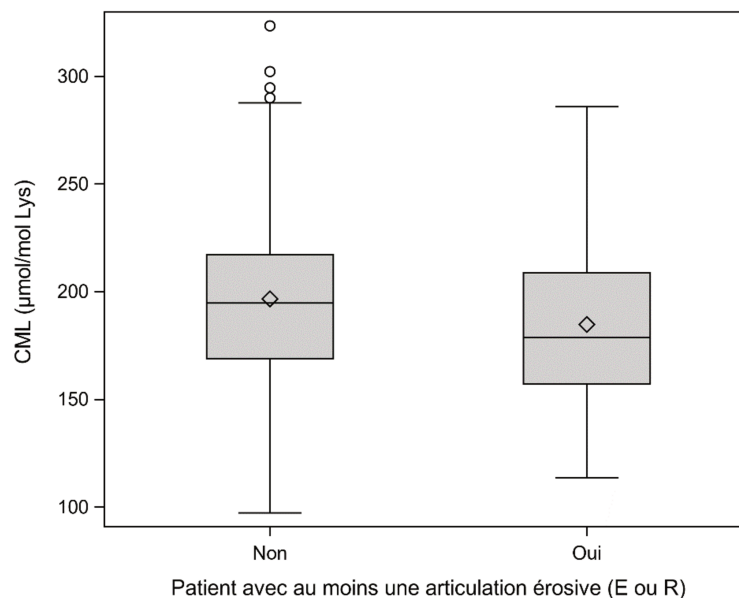


Figure 33 : Taux sérique de CML selon la présence d'au moins une articulation érosive

Après ajustement, on mettait également en évidence une association entre le taux sérique de CML et la présence d'au moins deux articulations érosives (modèle ajusté, $p=0.0003$). Une diminution de la concentration sérique de CML augmentait le risque d'avoir au moins deux articulations érosives : OR (IC 95%)=0.99 [0.98-0.99]($p=0,0003$).

Enfin, on observait une légère tendance à la baisse du nombre d'articulations érosives lorsque la concentration sérique de CML augmentait (ρ spearman = -0.20).

4. Taux sérique de CML et sévérité de l'arthrose

a. Taux sérique de CML et score total de KL

On ne mettait pas en évidence de relation entre la concentration de CML et le score de Kellgren-Lawrence (ρ pearson = -0.02), ni avec le nombre d'articulations avec un score de $KL \geq 2$ (ρ spearman = 0.00).

b. Taux sérique de CML et symptômes

On ne mettait pas en évidence de relation entre le taux sérique de CML et les scores AUSCAN de douleur, raideur et fonction, ni avec le degré de douleur au repos et à l'activité mesurée par l'EVA.

DISCUSSION

I. Synthèse des principales observations

Les différentes expérimentations ont permis d'observer que :

- Il existait un gradient croissant d'épaisseur et décroissant de densité cellulaire entre les IPP, les MCP et les genoux.
- Les taux d'HCit et de CML dans le cartilage variaient suivant la localisation anatomique : ainsi, les MCP avaient plus d'HCit que les IPP et plus de CML que les IPP et les genoux.
- Les cartilages non arthrosiques avaient des profils de sécrétion de base différents selon leur localisation : les IPP sécrètent moins de MMP-3 que les MCP.
- Sous l'influence d'un stimulus pro-inflammatoire (IL-1 β), les cartilages non arthrosiques avaient des comportements différents selon leur localisation : l'accroissement de sécrétion de l'IL-6 était 6 fois plus importante au genou qu'aux IPP, celui de la MMP-3 plus important aux IPP qu'aux MCP et qu'aux genoux.
- Les cartilages arthrosiques d'IPP produisaient basalement plus de PGE₂ que les MCP.
- Sous l'influence d'un stimulus pro-inflammatoire (IL-1 β), les accroissements de sécrétion de l'IL-6 et de la PGE₂ dans les cartilages arthrosiques étaient plus importants aux genoux qu'aux IPP.
- Les dosages sériques des taux d'HCit et de CML n'étaient pas corrélés à la sévérité structurale radiographique de l'arthrose ni aux symptômes dans une cohorte de patients souffrant d'arthrose des mains.

Au total, nous avons mis en évidence des différences de composition biochimique et plus précisément de contenu en produits de modifications post-traductionnelles des protéines, ainsi que des différences fonctionnelles biologiques entre les cartilages digitaux et de genoux.

II. Le modèle cadavérique humain : justification, avantages et inconvénients

La majorité des concepts étiopathogéniques sur la dégradation du cartilage dans l'arthrose sont issues de travaux sur la hanche et le genou, articulations dites « portantes » c'est-à-dire soumises aux contraintes mécaniques en rapport avec le statut pondéral. Les raisons principales sont probablement l'existence de modèles animaux et la relative facilité d'obtention des prélèvements de cartilage humain en quantité importante provenant de ces articulations, à l'occasion d'une arthroplastie, intervention fréquente en orthopédie. A l'inverse, il n'existe pas de modèle animal d'arthrose digitale inter-phalangienne ; le modèle humain était donc nécessaire pour étudier des cartilages digitaux.

L'obtention de cartilages sains de différentes articulations n'est possible que dans 3 situations : le Don des corps, les Dons d'organes et les amputations de membre (pour des motifs carcinologiques, infectieux ou traumatiques, qui restent peu fréquentes). Nous avons opté pour la première option pour des raisons pratiques. Il s'agit ainsi d'échantillons rares (d'autant qu'il était nécessaire que les individus soient décédés depuis moins de 5 jours), ce qui explique l'effectif de 14 cadavres étudiés ici. Le principal avantage d'effectuer les prélèvements chez des individus ayant donné leur corps est qu'il est possible de prélever les cartilages de différentes articulations simultanément.

L'inconvénient du Don des corps est qu'on ne dispose pas des données cliniques et socio-professionnelles, telles la profession antérieure, le côté dominant aux mains, la fonction rénale et les pathologies cardio-vasculaires (qui ont un impact connu sur la carbamylation), l'existence d'un diabète.

Les cartilages issus de donneurs vivants sur lesquels il est possible de travailler sont des cartilages de genou à l'occasion de la mise en place d'une prothèse de genou, et sont donc le siège d'une dégradation arthrosique. Il existe des prothèses d'IPP et de MCP, d'indication plus rare, mais il ne reste plus de cartilage au moment de la chirurgie en général. Enfin, en dehors des considérations éthiques (geste invasif) et des risques pour le patient, il n'aurait pas été possible de prélever un échantillon de cartilage d'articulations saines digitales, au vu du volume nécessaire aux expérimentations : 100mg pour doser le taux d'HCit, alors que le volume moyen de cartilage d'une seule IPP était de 38mg.

Notre modèle est plus celui d'un cartilage *sénescent* que normal vu l'âge des donneurs. Il nous est apparu que le fait de travailler sur des échantillons de sujets âgés était pertinent puisque l'arthrose est une pathologie du sujet âgé. En pratique, la majorité des sujets disponibles étaient âgés. Les rares études qui ont analysé des cartilages sains de sujets jeunes provenaient de prélèvements multi-organes.

Nous prélevions la même zone du cartilage du genou pour tous les sujets, considérant qu'en dehors de potentielles différences d'une articulation à l'autre, il est probable que le cartilage d'une seule articulation soit hétérogène d'une zone à l'autre de celle-ci. Ceci a été montré au genou, dans des cartilages prélevés à l'occasion d'une arthroplastie totale (Venkatesan 2012). La zone que nous avons choisie est la zone centrale distale du condyle médial du fémur, le compartiment médial du genou étant celui sur lequel s'exercent les contraintes les plus importantes (Adouni 2012).

Un modèle cadavérique ne reproduit pas parfaitement la physiologie normale. Cependant, il a été montré que les chondrocytes articulaires étaient capables de survivre en post-mortem (Lasczkowski 2002), ce qui est possiblement en rapport avec l'absence de vascularisation des cartilages. Ainsi, l'utilisation couplée de colorants vitaux et de microscopie confocale laser 3D permettait d'estimer que la survie des chondrocytes atteignait 88 à 96% après 4,5 jours, 58% après 6 jours et 9% à 6 semaines pour peu que les sujets aient été conservés à 4°C (Lasczkowski 2002). A température ambiante, la survie était de 70% après 2 jours et 8% après 14 jours. Depuis, plusieurs auteurs ont ainsi utilisé comme modèle des cultures de chondrocytes de sujets décédés depuis 8 à 136h (Manning 1967, Kang 1998, Eger 2002, Stradner 2016).

Le délai moyen de prélèvement de nos cartilages était quant à lui de 53 h, ce qui correspondrait à un taux de survie extrapolé de 80%, concordant avec notre observation sur un sujet.

III. Choix des articulations : rationnel

Nous avons choisi une articulation portante du membre inférieur, considérée comme le gold standard de l'articulation étudiée en recherche : le genou. En parallèle, nous avons choisi deux articulations non portantes, de dimensions proches, mais de susceptibilité à l'arthrose très différente, les IPP et les MCP des doigts longs. En effet, l'arthrose des MCP est beaucoup moins fréquente que celle des IPP, tant au plan radiologique que clinique (Addamanda 2017, Haugen 2011). De plus, leurs facteurs de risque semblent être différents, puisque Kouki a montré récemment dans la cohorte DIGICOD que les facteurs de risque d'arthrose des MCP étaient mécaniques (profession manuelle) et non métaboliques (pas de lien avec le syndrome métabolique) (Kouki 2021). Par ailleurs, l'arthrose des MCP était associée au nombre d'interphalangiennes arthrosiques. Pour Chaisson, le facteur de risque mécanique n'existait aux IPP que chez les hommes (Chaisson 2000).

D'un point de vue biomécanique, le genou et l'IPP sont des ginglymes ou articulations trochléennes (roulement entre une surface convexe et une surface concave) à un seul degré de liberté, tandis que la MCP est une articulation ellipsoïde ou condylienne à 2 degrés de liberté. En pratique sa mobilité s'effectue essentiellement dans un plan sagittal tout comme l'IPP mais elle est également possible dans le plan frontal, en particulier au niveau de l'index qui subit d'importantes contraintes latérales en lien avec la pince pouce-index.

En terme de contraintes biomécaniques in vivo, étant une articulation portante, le genou est automatiquement considéré comme soumis à des contraintes plus importantes que les articulations des doigts. Cependant, il est probable qu'en dépit de leur taille, les contraintes mécaniques exercées sur les articulations des doigts soient importantes. Par la méthode des éléments finis, Butz a montré que les forces développées au niveau des doigts lors des gestes de la vie quotidienne pouvaient être élevées (Butz 2014). En dehors de l'ouverture d'un pot, toutes les activités testées (utilisation d'un clavier d'ordinateur, d'un piano, d'un stylo ou soulèvement d'un poids) engendraient des contraintes supérieures aux MCP qu'aux IPP. Ainsi, en cas de force appliquée de 45N, les contraintes résultantes aux IPP et MCP étaient respectivement de 84 et 197N. Cette force pouvait atteindre 2.51 MPa au niveau de la MCP en cas de portage de charge, en sachant que la force subie par les genoux est située entre 10 et 20 MPa (Freegly 2003). Cette augmentation des contraintes de distal en proximal s'explique probablement par le bras de levier qui est plus important en proximal, pour des forces exercées à l'extrémité de la chaîne digitale. D'autres auteurs ont montré que des forces de 450 N pouvaient être subies par les IPP (Fowler 2000). Un argument indirect en faveur des

contraintes mécaniques importantes subies par les articulations des doigts est la durée de vie des prothèses IPP et MCP qui reste inférieure actuellement à celles de genou ou de hanche.

IV. Constatations histomorphométriques

Nous avons constaté qu'il existait un gradient croissant d'épaisseur et décroissant de densité cellulaire entre les IPP, les MCP et les genoux. Au vu de la prévalence de l'arthrose nettement plus fréquente aux IPP et genoux qu'aux MCP, on peut voir qu'il n'y a pas de lien direct entre l'épaisseur du cartilage et le risque d'arthrose.

Cette notion d'une densité des chondrocytes inversement proportionnelle à l'épaisseur du cartilage considéré n'est pas nouvelle. Ainsi, Stockwell l'a montré dans des cartilages humains et issus de 7 mammifères quadrupèdes (Stockwell 1971). De plus, il existe une relation allométrique (l'allométrie est l'étude des échelles de relation non linéaires entre une partie du corps et son ensemble, particulièrement pendant la croissance) entre l'épaisseur du cartilage et le poids des individus d'espèces différentes, pour une localisation articulaire donnée (Simon 1970). D'un point de vue mécanique, l'épaisseur du cartilage semble être liée aux fonctions de support de pression de l'articulation dans son ensemble, bien qu'elle puisse être modifiée par la conformation anatomique des surfaces articulaires. La plus grande épaisseur des cartilages dans les articulations à forte charge leur confère probablement plus de déformabilité. Une plus grande surface de contact permet également de réduire la pression sur la plaque osseuse sous-chondrale.

Le fait que notre étude ait été réalisée à partir de donneurs âgés ne remet pas en question sa validité, dans la mesure où il est connu que l'âge n'a pas d'effet significatif sur l'épaisseur des cartilages (non arthrosiques) (Meachim 1971). Le fait que nous n'ayons pas observé de différence significative d'épaisseur de la couche superficielle entre les 3 articulations, est compatible avec une nature très spécifique de cette couche, composée de chondrocytes phénotypiquement à part, potentiellement impliqués dans le renouvellement tissulaire.

V. Rôle des MPTNE dans la genèse de l'arthrose ?

A. Carbamylation des protéines du cartilage

Notre hypothèse était que la carbamylation était un processus qui pouvait être impliqué dans la physiopathologie de l'arthrose. En effet il s'agit d'une pathologie liée à l'âge ainsi qu'à un état inflammatoire, qui sont les deux facteurs d'accroissement du taux de carbamylation des tissus (Jaisson 2018). Toute MPTNE des protéines était susceptible de perturber le réseau collagène-PG constituant le micro-environnement des chondrocytes. Or, le cartilage est constitué pour deux tiers de son poids sec de collagène. La carbamylation en perturbant la fibrillogenèse du collagène et en nuisant à l'action des collagénases et donc au turn-over de la matrice extra-cellulaire pourrait contribuer à augmenter la rigidité du cartilage. C'est un phénomène connu pour le collagène de type I (Jaisson 2006, Jaisson 2007). De manière intéressante, il a été montré que la rigidité du cartilage augmentait avec l'âge. Hudelmaier a étudié la déformabilité du cartilage patellaire par la mesure de l'épaisseur du cartilage en IRM après 30 flexions de genou, chez 30 sujets de 60 ans en moyenne et 12 sujets jeunes de 25 ans en moyenne (Hudelmaier 2001). La différence d'épaisseur du cartilage au repos et après exercice était significativement plus importante chez les jeunes que chez les sujets âgés. De son côté, Wen a observé dans une courte série de 6 sujets que les fibrilles de collagène du cartilage (donc de type II), étaient plus rigides dans un tissu arthrosique que dans un tissu sain, par microscopie à force atomique de type indentation (Wen 2012).

Contrairement à la polyarthrite rhumatoïde, il semble qu'un phénomène auto-immun dirigé contre des protéines carbamylées articulaires soit peu impliqué dans l'arthrose : ainsi, Xie a comparé la fréquence d'anticorps anti-protéines carbamylées dans les liquides synoviaux et les sérums de patients arthrosiques ou ayant une polyarthrite rhumatoïde, et observé que cette fréquence était bien plus faible chez les patients arthrosiques, mais non nulle (Xie 2021).

Au total, il est possible que la carbamylation ne soit pas un mécanisme impliqué dans le développement de l'arthrose elle-même mais plutôt dans les caractéristiques biomécaniques du cartilage.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de taux d'HCit entre les cartilages arthrosiques ou non quelle que soit l'articulation considérée. Les limites principales de ce résultat négatif sont le faible effectif de sujets dans l'étude cadavérique, et l'absence de données sur le caractère symptomatique ou non des articulations diagnostiquées comme

arthrosiques. Il est possible que la comparaison des articulations symptomatiques versus non symptomatiques (indépendamment du degré d'altération structurale) aurait permis de mettre en évidence une association avec le taux d'HCit. De plus, nous n'avons étudié le taux d'HCit que dans le cartilage et non dans les autres tissus composant l'articulation : synoviale et os sous-chondral, impliqués également dans la physiopathologie de l'arthrose.

La constatation de différences de taux d'HCit entre les localisations de cartilages différentes pour une condition donnée (arthrosique ou non), montre bien que les caractéristiques biochimiques des cartilages diffèrent selon leur localisation, et que la physiologie ou la pathologie d'une localisation donnée ne peut pas être extrapolée à une autre par simple analogie. Il semble bien que tous les cartilages n'aient pas la même sensibilité aux MPTNE, et donc « vieillissent » différemment. Ainsi, nous avons observé que les cartilages de MCP étaient plus carbamylés que ceux d'IPP, cela étant valable chez les échantillons non arthrosiques comme chez les arthrosiques. Or la carbamylation et la glycoxydation des protéines sont essentiellement le fait d'une part de la demi-vie des protéines et d'autre part de facteurs systémiques augmentant leurs « précurseurs » (respectivement urée et glucose). Si l'on considère que les facteurs systémiques sont identiques pour toutes les articulations d'un individu, des différences de taux locaux d'HCit et de CML pourraient s'expliquer par des différences de contenu en protéines à demi-vie longue (ou demi-vie globale des protéines du tissu) ou de diffusion des précurseurs dans le tissu. Ces précurseurs circulants ne peuvent accéder au cartilage que par diffusion à partir du liquide synovial et des capillaires présents dans l'os sous-chondral, de sorte que les cartilages plus épais devraient avoir moins de produits de MPTNE des protéines. Cependant, nous n'avons pas observé de gradient décroissant de contenus en HCit et CML entre les genoux, MCP et IPP. Les produits dérivés de la carbamylation peuvent également être générés, de façon minoritaire, par l'action de la MPO. Punzi a montré que le taux sérique de MPO des patients ayant une arthrose érosive des mains était supérieur à celui de ceux ayant une forme non érosive (Punzi 2012).

Nous avons observé que les taux d'HCit et de CML étaient plus importants dans les cartilages que dans la peau, principal tissu analysé jusqu'à présent dans les études sur les MPTNE des protéines, en raison de sa haute teneur en collagène de type I (principal type de collagène du tissu osseux également), protéine de longue demi-vie, et à son accessibilité dans le cadre de la recherche. Il n'est pas étonnant que les cartilages soient touchés à ce point par ces phénomènes, compte tenu de leur composition en protéines de durée de vie extrême, et

leur renouvellement tissulaire inférieur à la peau. Cette constatation justifie l'intérêt porté sur les MPTNE dans le cartilage, et fait des cartilages un bon modèle pour leur étude.

B. Carboxyméthylation des protéines du cartilage

Nous avons observé que les MCP arthrosiques avaient un contenu en CML supérieur de 50% en moyenne aux MCP sains. Comme Trellu, nous avons constaté que les CML s'accumulaient dans les cartilages de genou avec l'âge (Trellu 2019). Cependant, il n'y avait pas de corrélation entre le contenu en CML et l'âge dans les MCP, ce qui suggère que la participation des CML dans la genèse de l'arthrose au niveau des MCP n'est pas expliquée uniquement par le vieillissement.

VI. Taux sériques d'HCit et CML et sévérité de l'arthrose des mains

Nous avons souhaité évaluer l'intérêt du taux d'HCit sérique en tant que potentiel biomarqueur systémique de la sévérité structurale de l'arthrose des mains, de même que Punzi l'a fait pour la MPO.

Nous n'avons pas observé de lien entre le taux d'HCit sérique et celle-ci, ou avec une polyarthrose. Il semble donc que le taux sérique d'HCit ne puisse être un biomarqueur pertinent. Cependant, il n'est pas exclu qu'il puisse refléter le risque de progression de l'arthrose. Ceci pourrait être évalué en analysant la sévérité de l'arthrose des patients de la cohorte à distance de la première mesure.

Le taux d'HCit sérique représente la carbamylation des protéines circulantes, dont la plus abondante est l'albumine, dont la demi-vie est brève (environ 20 jours). Cependant, le sérum et les urines contiennent également des produits de dégradation du cartilage en faible quantité. Ainsi, la quantité de peptides collagéniques dans les urines est associée à la sévérité clinique de l'arthrose et est prédictive de la progression du pincement articulaire (Deberg 2015). Bien que l'HCit sérique puisse être utilisée comme biomarqueur de pathologies

chronique telles l'athérosclérose ou l'insuffisance rénale (Jaisson 2010), jusqu'à présent il n'y a pas eu de corrélation établie entre le taux sérique d'HCit et son taux tissulaire.

La cohorte de patients formait un groupe globalement homogène en terme d'âge, de fonction rénale (absence d'insuffisance rénale terminale), de sexe, et tous les individus souffraient d'arthrose, de sorte que l'observation d'une différence aurait probablement nécessité une puissance plus importante, et dans l'idéal la présence d'un groupe apparié d'individus non arthrosiques. Pour l'instant on ne dispose pas d'une telle cohorte contrôle.

Le taux sérique d'HCit ne différait pas significativement entre les patients ayant une arthrose érosive et ceux ayant une forme non érosive, tandis que la différence mesurée pour le taux de CML n'était pas cliniquement pertinente. Comme il a été montré que le taux sérique de MPO était plus important dans les formes érosives (Punzi 2012), et que la MPO est capable de générer des produits de carbamylation, on se serait attendu à mettre également en évidence une différence de taux d'HCit.

VII. Réponse des cartilages à un stimulus pro-inflammatoire

L'IL-1 β est communément utilisée dans les études in vitro sur les chondrocytes ou sur le cartilage pour potentialiser la réponse à différents stimuli biologiques.

Les différences de réponse biologique à l'IL-1 β entre les différentes localisations articulaires que nous avons observées peuvent avoir plusieurs explications : différences de pénétration/diffusion dans les cartilages de l'IL-1 β , différence de nombre de récepteurs membranaires, différences de voies de signalisation. Ces différences suggèrent que l'état d'activité biologique des cellules diffère d'une articulation à une autre.

Nous avons observé des différences de comportement entre les cartilages non arthrosiques d'IPP et de MCP : la sécrétion basale de MMP-3 était plus importante aux MCP qu'aux IPP, tandis que la sécrétion de MCP-1 tendait à être plus importante aux MCP, celle de PGE₂ tendait à être supérieure dans les IPP, ce qui suggère des états métaboliques différents entre ces 2 articulations contigües, et contribuerait à expliquer que ces deux

articulations aient un risque d'arthrose très différent. A notre connaissance il s'agit de la première étude ayant analysé les propriétés biologiques des cartilages MCP.

Le mode de réaction des cartilages sains différait après application de l'IL-1 β : il était plus « inflammatoire » aux genoux qu'aux IPP (ils accroissaient considérablement leur sécrétion d'IL-6 comparativement aux IPP), tandis qu'il était plus « catabolique » aux IPP qu'aux genoux (elles augmentaient leur sécrétion de MMP-3 comparativement aux genoux). Il est intéressant de rapprocher ces constatations des modes de présentation clinique usuels de ces deux localisations arthrosiques. En effet, à âge égal, les doigts (IPD) sont le siège de plus de dégradation arthrosique que les genoux : van Saase l'a montré dans l'étude épidémiologique radiologique de la population hollandaise (van Saase 1989). A l'inverse, le taux d'incidence symptomatique standardisé pour l'âge et le sexe du Fallon Community Health Plan du Massachusetts était le plus élevé pour l'arthrose du genou (240/100 000 personnes-années) qu'à la main (100/100 000 personnes-années)(Oliveria 1995). Ainsi, les genoux sont plus symptomatiques c'est à dire plus douloureux que les mains (Figure 34).

Dans l'arthrose, la douleur est un phénomène complexe intégrant des processus sensoriels, affectifs et cognitifs, qui varient probablement d'un patient à l'autre et mettent en jeu une variété de mécanismes cellulaires au sein du système nerveux périphérique et central. Le cartilage n'étant pas innervé, la douleur serait plutôt véhiculée par des fibres nerveuses amyéliniques et sympathiques aboutissant dans la synoviale, l'os sous-chondral (Malfait 2013, Courties 2020), la capsule articulaire et les ligaments collatéraux. Les nocicepteurs peuvent être activés par de nombreux facteurs locaux cataboliques comme l'IL-1, l'IL-6, la PGE-2 (Lee 2013), et des facteurs mécaniques pour lesquels on dispose de peu d'informations pour l'instant (Heppelmann 2005). Enfin, un état inflammatoire local va provoquer la libération de NGF (Nerve growth factor), médiateur périphérique de la douleur qui a un effet d'hypersensitivation locale (Malfait 2013).

Plusieurs études ont montré que le taux d'IL-6 sérique était corrélé à l'intensité de la douleur dans la gonarthrose (Stannus 2013, Imamurea 2015, Azim 2018). A l'inverse, le tocilizumab, anticorps anti-IL6R, bloquant la voie de l'IL-6, n'est pas efficace sur les douleurs dans l'arthrose des mains (Richette 2020). Tester le blocage de la voie de l'IL-6 dans la gonarthrose pourrait s'avérer intéressant.

Le comportement basal et après stimulation des cartilages arthrosiques différait également d'une articulation à l'autre, suggérant des phénotypes d'arthrose différents ou bien

l'atteinte de cartilages intrinsèquement différents. Ainsi, les IPP sécrétaient de base plus de PGE₂ que les genoux, tandis que les genoux augmentaient leur sécrétion d'IL-6 et de PGE₂ plus que les IPP. La deuxième hypothèse de cartilages intrinsèquement différents paraît plus plausible, vu l'absence de différence mise en évidence entre les cartilages arthrosiques ou non pour chaque localisation et pour chaque marqueur considéré.

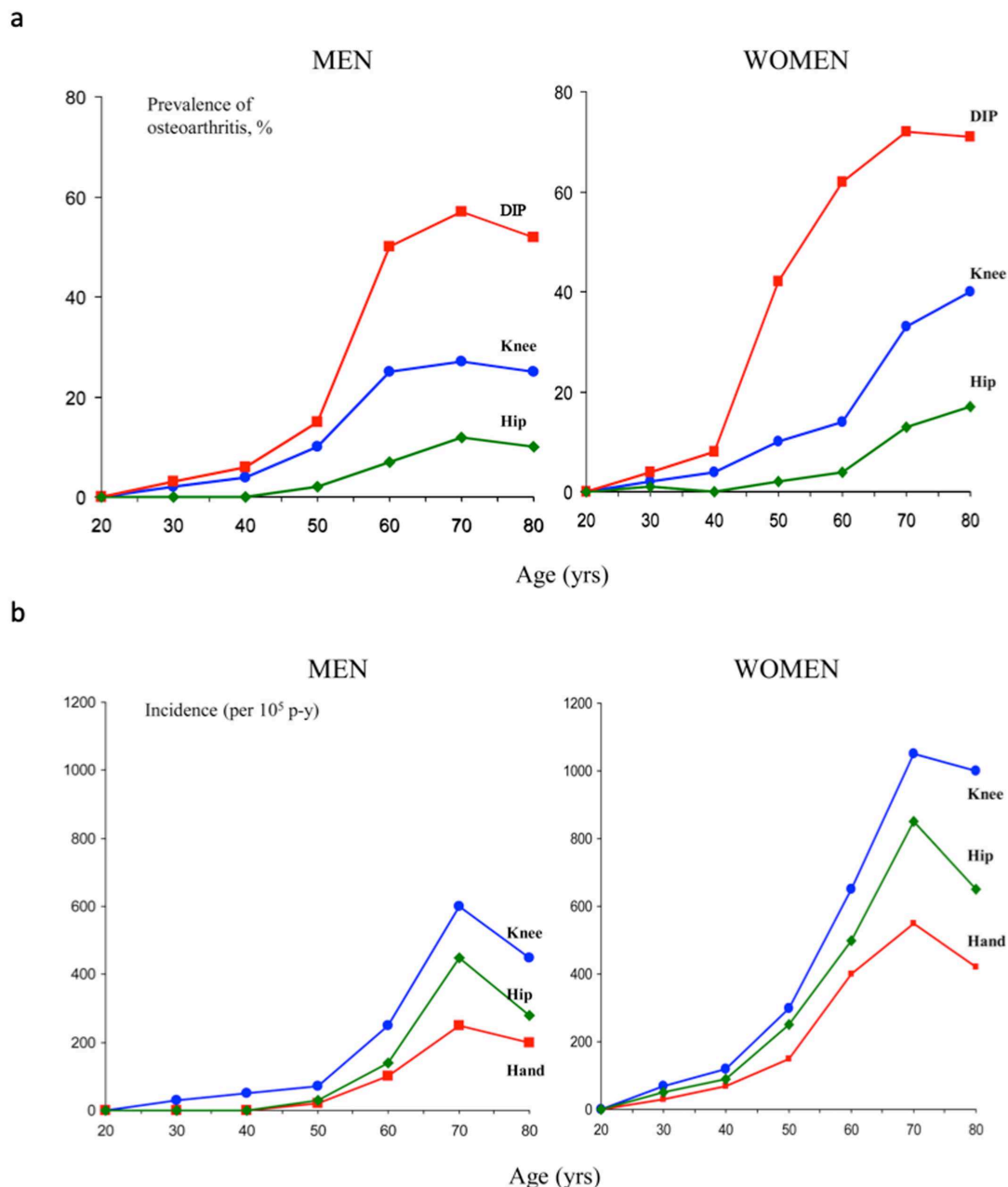


Figure 34 : Prévalence de l'arthrose radiographique des articulations inter-phalangiennes distales, de genou et de la hanche dans une population hollandaise (a), et incidence de l'arthrose symptomatique de la main, du genou et de la hanche dans une population américaine (b). Issu de Litwic 2020 et Oliveira 1995.

Cependant, le fait d'observer des réponses aiguës à un stimulus biologique *in vitro* ne permet pas d'extrapoler une réponse sur la durée. De plus, les contraintes mécaniques du quotidien sont un facteur non pris en compte dans l'étude, pouvant expliquer des différences de physiologie des chondrocytes. Enfin, ces analyses de sécrétion protéiques gagneraient à être complétées par des études transcriptomiques, protéomiques et fonctionnelles (zymographie). En pratique de multiples tentatives d'extraction d'ARN ont été faites, sans parvenir à obtenir un ARN de qualité suffisante pour effectuer une qPCR.

VIII. IPP et genoux : 2 articulations biologiquement différentes ?

Nous avons montré que les cartilages issus d'IPP, de MCP ou de genou ne réagissaient pas de manière similaire à un stimulus inflammatoire *in vitro*. Dans la littérature, à notre connaissance il n'existe que deux études ayant comparé les IPP et les genoux, qui mettaient également en évidence des différences entre ces 2 localisations articulaires.

Il s'agissait d'études transcriptomiques. La première a analysé l'expression de chondrocytes en culture, issus de 3 donneurs décédés (Stradner 2016). Comme nous, les auteurs ont observé qu'il y avait plus de similitudes entre les articulations de même localisation issus de sujets différents qu'entre articulations différentes de mêmes sujets. Les gènes les plus surexprimés dans les IPP comparativement aux genoux étaient DKK1 (Dickkopf 1, inhibiteur de la voie WNT et de la croissance des chondrocytes et de l'expression de la MMP-13), HOXD13 (Homeobox D13, facteur de transcription induisant WNT5a et RUNX2, impliqué dans le développement du membre supérieur et en particulier des doigts) et FGF-5 (Fibroblast growth factor 5). Les 3 gènes les moins exprimés comparativement aux genoux étaient PLA2G2A (Phospholipase A2 sécrétée du groupe 2A), RSPO2 (R-spondin 2, agoniste de WNT), et SERPINA3 (Serpine peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotéine), dont l'expression est corrélée à la chondrogénèse des cellules souches mésenchymateuses). Le peu d'échantillons et le fait que les chondrocytes aient été cultivés sur 3 passages avant les mesures doit faire analyser ces résultats avec prudence. Les auteurs ont

vérifié que les cellules exprimaient le collagène de type II, l'aggrécane et Sox9 (facteur de transcription impliqué dans la différenciation des chondrocytes). Cependant, un travail antérieur de l'équipe de recherche a montré dans une étude sur les chondrocytes issus de souriceaux nouveaux-nés, que dès le premier passage les sécrétions de collagène II et d'aggrécane diminuaient, tandis que celle du collagène de type I augmentait, pour atteindre un phénotype de type fibroblastique aux 3^{ème} et 4^{ème} passages (Salvat 2005).

La seconde étude concernait l'expression des longs ARN non codants (Dong 2017). Il s'agit de transcrits constitués de plus de 200 nucléotides, qui ne codent pas pour des protéines. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques, la carcinogenèse, le métabolisme, la différenciation cellulaire, et régulent l'expression de facteurs impliqués dans la genèse de l'arthrose (Zhang 2016). Dong a procédé à une analyse transcriptomique bio-informatique de 3 échantillons d'IPP et 3 de genoux contenus dans la base publique de données Gene Expression Omnibus, probablement les mêmes que ceux utilisés par Stradner. Ils ont observé des différences notables entre les 2 types articulaires, concernant des fonctions de type morphogénèse des membres ou développement du cartilage.

IX. Perspectives et projets

A. Implications des résultats observés

Au vu des différences de phénotype et de fonctionnement entre les cartilages de localisations différentes, on ne peut extrapoler les connaissances en physiologie, physiopathologie, ou en thérapeutique d'une articulation comme le genou à celles des mains. A l'avenir, le développement de thérapeutiques devra être ciblé pour une localisation donnée, ou du moins être testé dans chaque articulation cible et non plus considéré automatiquement efficace pour l'arthrose digitale s'il l'est au genou. Ainsi, les injections d'acide hyaluronique n'ont pas fait la preuve de leur efficacité dans l'arthrose digitale (Tran 2019), contrairement au genou (Phillips 2021).

B. Exploration des différences entre chondrocytes

Afin de poursuivre la comparaison des cartilages à des stress biologiques en fonction de leur localisation anatomique, nous souhaiterions analyser l'expression génique des cellules via l'extraction d'ARN et la réalisation de qPCR. Nous avons testé l'extraction d'ARN des fragments de cartilage par différentes techniques sans succès (broyage par billes ou mortier et marteau en azote liquide, kits variés de mini-colonnes, trizol) de sorte qu'à présent des cultures cellulaires (comme Stradner) semblent une stratégie plus réaliste, l'extraction d'ARN de chondrocytes en culture étant une technique de routine au laboratoire.

C. Carbamylation et cartilage

Cette étude est la première à avoir exploré la carbamylation des protéines du cartilage. Jusqu'à présent, les travaux portant sur la carbamylation dans le contexte des maladies rhumatismales concernaient exclusivement le rôle d'anticorps anti-protéines carbamylées dans des pathologies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde. De plus, nous n'avons pas retrouvé d'étude portant sur la carbamylation du collagène de type II.

Il est nécessaire de confirmer l'hypothèse selon laquelle le taux de carbamylation augmente dans le cartilage avec l'âge. Cela n'a pas pu être effectué dans la courte série de sujets compte tenu de la faible différence d'âge.

Il reste donc de nombreuses questions à élucider afin de comprendre l'impact de la carbamylation du cartilage sur ses propriétés biomécaniques et fonctionnelles.

Les conséquences physiques de la carbamylation sur le tissu peuvent s'explorer en terme d'organisation de la matrice extracellulaire, ainsi que de rigidité. Premièrement il serait intéressant d'étudier les conséquences de la carbamylation sur les composants de la matrice extra-cellulaire et en particulier le collagène de type II : solubilité, conformation en triple hélice, en suivant les méthodes utilisées par Jaisson pour le collagène de type I (2006).

La microscopie en force atomique (Chandrasekaran 2017, Doué 2021) est une technique permettant d'apprécier de manière quantitative l'organisation des fibrilles de collagène. Nos hypothèses sont : que les cartilages d'IPP et de genou ont un aspect fibrillaire différent de ceux des MCP, et que le degré d'organisation des fibrilles est corrélé au degré de carbamylation du cartilage. En effet, ces modifications post-traductionnelles sont connues

pour perturber la conformation et la fonction de multiples protéines, et du collagène de type I en particulier (Jaisson 2006).

Il serait également possible de calculer la rigidité du tissu au moyen du module de Young qui serait mis en corrélation avec le taux de carbamylation du cartilage (Plodinec 2010, Piétrement 2021).

De plus, afin d'évaluer l'influence de la carbamylation des protéines de la matrice extra-cellulaire sur les chondrocytes, nous souhaiterions étudier l'expression génique et protéique de chondrocytes ensemencés et cultivés sur du collagène de type II carbamylé ou non.

L'utilisation d'un modèle animal permettrait de répondre à la question d'un impact du taux sanguin de carbamylation sur le contenu cartilagineux en protéines carbamylées et sur un potentiel rôle arthrogène. Il est en effet possible de compléter l'alimentation de souris par du cyanate, ce qui accroît le taux sanguin d'HCit (Pietrement 2013).

X. Conclusion

Au vu de l'ensemble des observations et de la littérature, nous concluons que les chondrocytes ont des caractéristiques différentes selon les articulations, et que le tissu cartilage a une composition biochimique qui varie également. Il n'est donc pas adapté d'extrapoler à une articulation les observations et recommandations thérapeutiques concernant une localisation spécifique différente. Il était déjà bien connu que la maladie arthrosique regroupait en fait un prisme de phénotypes différents. Il semble que chaque localisation développe sa propre arthrose sous l'effet de facteurs extrinsèques mais aussi de facteurs intrinsèques, ce qui devrait conduire à la recherche de traitements ciblés articulation-spécifiques.

REFERENCES

- Abraham AM, Pearce MS, Mann KD, Francis RM, Birrell F. Population prevalence of ultrasound features of osteoarthritis in the hand, knee and hip at age 63 years: the Newcastle thousand families birth cohort. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014 May 19;15:162.
- Addimanda O, Cavallari C, Pignotti E, Pulsatelli L, Mancarella L, Ramonda R, Fioravanti A, Meliconi R. Radiographic involvement of metacarpophalangeal and radiocarpal joints in hand osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2017 May;36(5):1077-1082.
- Adouni M, Shirazi-Adl A, Shirazi R. Computational biodynamics of human knee joint in gait: from muscle forces to cartilage stresses. *J Biomech*. 2012 Aug 9;45(12):2149-56.
- Agricola R, Waarsing JH, Arden NK, et al. Cam impingement of the hip: a risk factor for hip osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9: 630-34.
- Allen KD, Golightly YM. *Curr Opin Rheumatol*. State of the evidence. 2015 May;27(3):276-83.
- Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Gray R, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum*. 1990 Nov;33(11):1601-10.
- Altman RD, Gold GE. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthr Cartil* 15(Suppl A) 2007:A1-56.
- Alvarez-Garcia O, Rogers NH, Smith RG, Lotz MK. Palmitate has proapoptotic and proinflammatory effects on articular cartilage and synergizes with interleukin-1. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(7):1779-1788.
- An KN, Chao EY, Cooney WP, Linscheid RL. Forces in the normal and abnormal hand. *J Orthop Res*. 1985;3:202-11.
- Apostolov EO, Ray D, Savenka AV, Shah SV, Basnakian AG. Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Nov;21(11):1852-7.
- Archer CW, Morrison H, Pitsillides AA. Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage. *J. Anat*. 1994; 184:447.

- Asci G, Basci A, Shah SV, Basnakian A, Toz H, Ozkahya M, Duman S, Ok E. Carbamylated low-density lipoprotein induces proliferation and increases adhesion molecule expression of human coronary artery smooth muscle cells. *Nephrology (Carlton)*. 2008 Dec;13(6):480-6.
- Ashraf S, Mapp PI, Walsh DA. Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Sep;63(9):2700-10.
- Aubert CE, Michel PL, Gillery P, Jaisson S, Fonfrede M, Morel F, Hartemann A, Bourron O. Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014 Nov;30(8):679-85.
- Azim S, Nicholson J, Rebecchi MJ, Galbavy W, Feng T, Rizwan S, Reinsel RA, Kaczocha M, Benveniste H. Interleukin-6 and leptin levels are associated with preoperative pain severity in patients with osteoarthritis but not with acute pain after total knee arthroplasty. *Knee*. 2018 Jan;25(1):25-33.
- B**ank RA, Bayliss MT, Lafeber FP, Maroudas A, Tekoppele JM. Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage. *Biochem J*. 1998 Feb 15;330 (Pt 1):345-51.
- Balion CM, Draisey TF, Thibert RJ. Carbamylated hemoglobin and carbamylated plasma protein in hemodialyzed patients. *Kidney Int*. 1998;53:488-95.
- Barr L, Getgood A, Guehring H, Rushton N, Henson FM. The effect of recombinant human fibroblast growth factor-18 on articular cartilage following single impact load. *J Orthop Res*. 2014;32(7):923-927.
- Barreto G, Sandelin J, Salem A, Nordström DC, Waris E. Toll-like receptors and their soluble forms differ in the knee and thumb basal osteoarthritic joints. *Acta Orthop*. 2017 Jun;88(3):326-333.
- Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008 Jan;196(1):9-21.
- Baudart P, Louati K, Marcelli C, Berenbaum F, Sellam J. Association between osteoarthritis and dyslipidaemia: a systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open*. 2017 Aug 29;3(2):e000442.
- Bedson J, Croft PR. The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008; 9: 116.
- Beswick HT, Harding JJ. High-molecular-weight crystallin aggregate formation resulting from non-enzymic carbamylation of lens crystallins: relevance to cataract formation. *Exp Eye Res*. 1987 Oct;45(4):569-78.

- Berenbaum F, Eymard F, Houard X. Osteoarthritis, inflammation and obesity. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25:114-8.
- Berenbaum F, Blanco FJ, Guermazi A, Miki K, Yamabe T, Viktrup L, Junor R, Carey W, Brown MT, West CR, Verburg KM. Subcutaneous tanezumab for osteoarthritis of the hip or knee: efficacy and safety results from a 24-week randomised phase III study with a 24-week follow-up period. *Ann Rheum Dis*. 2020 Jun;79(6):800-810.
- Berlin A, Simon D, Tascilar K, Figueiredo C, Bayat S, Finzel S, Klaus E, Rech J, Hueber AJ, Kleyer A, Schett G. The ageing joint-standard age- and sex-related values of bone erosions and osteophytes in the hand joints of healthy individuals. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 Jul;27(7):1043-1047.
- Bertrand J, Cromme C, Umlauf D, Frank S, Pap T. Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Oct;42(10):1594-601.
- Beswick HT, Harding JJ. Conformational changes induced in bovine lens alpha-crystallin by carbamylation. Relevance to cataract. *Biochem J*. 1984 Oct 1;223(1):221-7.
- Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011 Jun 18;377(9783):2115-26.
- Bijsterbosch J, Meulenbelt I, Watt I, Rosendaal FR, Huizinga TW, Kloppenburg M. Clustering of hand osteoarthritis progression and its relationship to progression of osteoarthritis at the knee. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):567-572.
- Binder V, Bergum B, Jaisson S, Gillery P, Scavenius C, Spriet E, Nyhaug AK, Roberts HM, Chapple ILC, Hellvard A, Delaleu N, Mydel P. Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability. *Thromb Haemost*. 2017 May 3;117(5):899-910.
- Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Jan;18(1):24-33.
- Blain EJ, Gilbert SJ, Wardale RJ, Capper SJ, Mason DJ, Duance VC: Up-regulation of matrix metalloproteinase expression and activation following cyclical compressive loading of articular cartilage in vitro. *Arch Biochem Biophys*. 2001;396:49-55.
- Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R187.
- Borzi RM, Mazzetti I, Cattini L, Ugucioni M, Baggiolini M, Facchini A. Human chondrocytes express functional chemokine receptors and release matrix-degrading enzymes in response to CxXc and CcC chemokines. *Arthritis Rheum*. 2000;43:1734e41.
- Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis*. 2006;65: 1261–64.

- Brouwer GM, van Tol AW, Bergink AP, et al. Association between valgus and varus alignment and the development and progression of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 2007;56: 1204-11.
- Brown TD, Shaw DT. In vitro contact stress distribution on the femoral condyles. *Journal of Orthopaedic Research.* 1984;2(2):190-199.
- Bruckner P, van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech.* 1994 Aug 1;28(5):378-84.
- Buetler TM, Leclerc E, Baumeyer A, Latado H, Newell J, Adolfsson O, et al. N(epsilon)-carboxymethyllysine-modified proteins are unable to bind to RAGE and activate an inflammatory response. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52: 370-8.
- Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *J Am Acad Orthop Surg.* 1994 Jul;2(4):192-201.
- Butz KD, Merrell G, Nauman EA. A biomechanical analysis of finger joint forces and stresses developed during common daily activities. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2012;15(2):131-40.
- C**ambon-Binder A, Courties A. Nouveautés médicales et prise en charge chirurgicale dans l'arthrose digitale. *Revue du rhumatisme monographies.* 2021;88:145-153.
- Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1535-44.
- Cecil DL, Johnson K, Rediske J, Lotz M, Schmidt AM, Terkeltaub R. Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):8296-302.
- Chaisson CE, Zhang Y, Sharma L, Felson DT: Higher grip strength increases the risk of incident radiographic osteoarthritis in proximal hand joints. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000, 8:S29-S32.
- Chandrasekaran P, Doyran B, Li Q, Han B, Bechtold TE, Koyama E, Lu XL, Han L. Biomechanical properties of murine TMJ articular disc and condyle cartilage via AFM-nanoindentation. *J Biomech.* 2017 26;60:134-141.
- Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Jul;2(7):373-82.
- Chen XX, Yang T. Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. *J Bone Miner Metab.* 2015 Sep;33(5):474-85.

- Chen YJ, Sheu ML, Tsai KS, Yang RS, Liu SH. Advanced glycation end products induce peroxisome proliferator-activated receptor γ down-regulation-related inflammatory signals in human chondrocytes via Toll-like receptor-4 and receptor for advanced glycation end products. *PLoS One*. 2013 Jun 12;8(6):e66611.
- Chevalier X. Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage. *Presse Med*. 1998 ;27:75-80.
- Chevalier X, Richette P. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement, EMC - Rhumatologie-Orthopédie, Volume 2, Issue 1, 2005, 41-58.
- Choei H, Sasaki N, Takeuchi M, Yoshida T, Ukai W, Yamagishi S, Kikuchi S, Saito T. Glyceraldehyde-derived advanced glycation end products in Alzheimer's disease *Acta Neuropathol*. 2004;108:189-193.
- Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, Cs-Szabo G, Hasty KA, Kuettner KE, Cole AA. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. *Lab Invest*. 1996 Jan;74(1):232-40.
- Cole AA, Margulis A, Kuettner KE. Distinguishing ankle and knee articular cartilage. *Foot Ankle Clin*. 2003 Jun;8(2):305-16
- Cooney WP, Chao EYS. Biomechanical analysis of static forces in the thumb during hand function. *J Bone Joint Surg Am*. 1977;59-A:27-36.
- Cotten A, Flipo RM, Boutry N, Cortet B, Chastanet P, Foissac-Gegoux P, Delcambre B. Natural course of erosive arthropathy of the hand in patients undergoing hemodialysis. *Skeletal Radiol*. 1997 Jan;26(1):20-6.
- Corvol MT. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2000;67(6):557-60.
- Courties A, Gualillo O, Berenbaum F, Sellam J. Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1955-65.
- Courties A, Sellam J. Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links? *Diabetes Res Clin Pract*. 2016 Dec;122:198-206.
- Courties A, Belle M, Senay S, Cambon-Binder A, Sautet A, Chédotal A, Berenbaum F, Sellam J. Clearing method for 3-dimensional immunofluorescence of osteoarthritic subchondral human bone reveals peripheral cholinergic nerves. *Sci Rep*. 2020 Jun 1;10(1):8852.
- Courties A, Do A, Leite S, Legris M, Sudre L, Pigenet A, Petit J, Nourissat G, Cambon-Binder A, Maskos U, Berenbaum F, Sellam J. The Role of the Non-neuronal Cholinergic System in Inflammation and Degradation Processes in Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2020 Dec;72(12):2072-2082.
- Cucchiari M, Henrionnet C, Mainard D, Pinzano A, Madry H. New trends in articular cartilage repair. *J Exp Orthop*. 2015 Dec;2(1):8.

- D**ahaghin S, Bierma-Zeinstra SM, Ginai AZ, Pols HA, Hazes JM, Koes BW. Prevalence and pattern of radiographic hand osteoarthritis and association with pain and disability (the Rotterdam study). *Ann Rheum Dis*. 2005;64:682–687.
- Dahlberg LE, Aydemir A, Muurahainen N, Gühring H, Fredberg Edebo H, Krarup-Jensen N, Ladel CH, Jurvelin JS. A first-in-human, double-blind, randomised, placebo-controlled, dose ascending study of intra-articular rhFGF18 (sprifermin) in patients with advanced knee osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(3):445-450.
- Dang Y, Cole AA, Homandberg GA. Comparison of the catabolic effects of fibronectin fragments in human knee and ankle cartilages. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Jul;11(7):538-47.
- Deberg MA, Labasse AH, Collette J, Seidel L, Reginster JY, Henrotin YE. One-year increase of Coll 2-1, a new marker of type II collagen degradation, in urine is highly predictive of radiological OA progression. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Dec;13(12):1059-65.
- Decker RS. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Feb;62:50-56.
- de Munter W, van der Kraan PM, van den Berg WB, van Lent PL. High systemic levels of low-density lipoprotein cholesterol: fuel to the flames in inflammatory osteoarthritis? *Rheumatology (Oxford)*. 2016 Jan;55(1):16-24.
- Derksen VFAM, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017 Jun;39(4):437-446.
- Desmons A, Okwieka A, Doué M, Gorisse L, Vuiblet V, Pietrement C, Gillery P, Jaisson S. Proteasome-dependent degradation of intracellular carbamylated proteins. *Aging (Albany NY)*. 2019 Jun 6;11(11):3624-3638.
- D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW Jr, Lotz MK. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001 Nov;9(8):712-9.
- Dong LV, Shangzheng S, Zhen L, Xingyu C, Zhengwen X, Tao P. Expression of long non-coding RNAs in chondrocytes from proximal interphalangeal joints. *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):5175-5180.
- Doué M, Okwieka A, Berquand A, Gorisse L, Maurice P, Velard F, Terryn C, Molinari M, Duca L, Piétrement C, Gillery P, Jaisson S. Carbamylation of elastic fibers is a molecular substratum of aortic stiffness. *Sci Rep*. 2021 Sep 8;11(1):17827.
- Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*. 2004 Feb 29;117(Pt 6):889-97.

- Dozin B, Malpeli M, Camardella L, Cancedda R, Pietrangelo A. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *Matrix Biol.* 2002 Aug;21(5):449-59.
- Driban JB, Hootman JM, Sitler MR, Harris KP, Cattano NM. Is participation in certain sports associated with knee osteoarthritis? A systematic review. *J Athl Train.* 2017; 52: 497-506.
- Dubey NK, Wei HJ, Yu SH, Williams DF, Wang JR, Deng YH, Tsai FC, Wang PD, Deng WP. Adipose-derived Stem Cells Attenuates Diabetic Osteoarthritis via Inhibition of Glycation-mediated Inflammatory Cascade. *Aging Dis.* 2019 Jun 1;10(3):483-496.
- Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottier P. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Nov;48(11):3118-29.
- E**ckstein F, Wirth W, Lohmander LS, Hudelmaier MI, Frobell RB. Five-year followup of knee joint cartilage thickness changes after acute rupture of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Jan;67(1):152-61.
- Eger W, Schumacher BL, Mollenhauer J, Kuettner KE, Cole AA. Human knee and ankle cartilage explants: catabolic differences. *J Orthop Res.* 2002;20(3):526-534.
- Endres M, Andreas K, Kalwitz G, Freymann U, Neumann K, Ringe J, Sittlinger M, Häupl T, Kaps C. Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010 Nov;18(11):1458-66.
- F**audot B, Milan JL, Goislard de Monsabert B, Le Corroller T, Vigouroux L. Estimation of joint contact pressure in the index finger using a hybrid finite element musculoskeletal approach. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2020 Nov;23(15):1225-1235.
- Favreau H, Pijnenburg L, Seitlinger J, Fioretti F, Keller L, Scipioni D, Adriaensen H, Kuchler-Bopp S, Ehlinger M, Mainard D, Rosset P, Hua G, Gentile L, Benkirane-Jessel N. Osteochondral repair combining therapeutics implant with mesenchymal stem cells spheroids. *Nanomedicine.* 2020 Oct;29:102253.
- Felson DT, Naimark A, Anderson JJ, Kazis L, Castelli W, Meenan RF: The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 1987, 30:914-918.
- Felson DT. The sources of pain in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005 Sep;17(5):624-8.
- Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Banes AJ, Guilak F: The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants. *J Orthop Res.* 2001;19:729-737.

- Forsyth CB, Cole A, Murphy G, Bienias JL, Im HJ, Loeser RF Jr. Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005 Sep;60(9):1118-24.
- Fowler NK, Nicol AC. Interphalangeal joint and tendon forces: normal model and biomechanical consequences of surgical reconstruction. *J Biomech.* 2000 Sep;33(9):1055-62.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;908:244-54.
- Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1,3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis.* 1997;56:542-549.
- Fregly BJ, Bei Y, Sylvester ME. Experimental evaluation of an elastic foundation model to predict contact pressures in knee replacements. *J Biomech.* 2003;36:1659-1668.
- French HP, Smart KM, Doyle F. Prevalence of neuropathic pain in knee or hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;47:1-8.
- G**arnotel R, Sabbah N, Jaisson S, Gillery P. Enhanced activation of and increased production of matrix metalloproteinase-9 by human blood monocytes upon adhering to carbamylated collagen. *FEBS Lett.* 2004 Apr 9;563(1-3):13-6.
- Gautieri A, Passini FS, Silván U, Guizar-Sicairos M, Carimati G, Volpi P, Moretti M, Schoenhuber H, Redaelli A, Berli M, Snedeker JG. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biol.* 2017 May;59:95-108.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016; 388:1545-602.
- Gigout A, Guehring H, Froemel D, Meurer A, Ladel C, Reker D, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, Lindemann S. Sprifermin (rhFGF18) enables proliferation of chondrocytes producing a hyaline cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(11):1858-1867.
- Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Sep;15(9):1061-9.
- Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015 Jul 25;386(9991):376-87.

- Goekoop RJ, Kloppenburg M, Kroon HM, Dirkse LE, Huizinga TW, Westendorp RG, Gussekloo J. Determinants of absence of osteoarthritis in old age. *Scand J Rheumatol.* 2011 Jan;40(1):68-73.
- Gorisse L, Pietrement C, Vuiblet V, Schmelzer CE, Köhler M, Duca L, Debelle L, Fornès P, Jaisson S, Gillery P. Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Feb 2;113(5):1191-6.
- Gosset M, Berenbaum F, Salvat C, Sautet A, Pigenet A, Tahiri K, Jacques C. Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008a, 58:1399-1409. (1)
- Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Cavadias S, Jacques C. Mechanical stress and prostaglandin E2 synthesis in cartilage. *Biorheology.* 2008b;45(3-4):301-320. (2)
- Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc.* 2008c;3(8):1253-60. (3)
- Gosset M, Pigenet A, Salvat C, Berenbaum F, Jacques C. Inhibition of matrix metalloproteinase-3 and -13 synthesis induced by IL-1beta in chondrocytes from mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J Immunol.* 2010 Nov 15;185(10):6244-52.
- Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids.* 2008; 35:29-36.
- Grushko G, Schneiderman R, Maroudas A. Some biochemical and biophysical parameters for the study of the pathogenesis of osteoarthritis: a comparison between the processes of ageing and degeneration in human hip cartilage. *Connect Tissue Res.* 1989;19(2-4):149-76.
- Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum.* 1995 Jul;38(7):960-8.
- H**aara MM, Manninen P, Kröger H, Arokoski JP, Kärkkäinen A, Knekt P, Aromaa A, Heliövaara M. Osteoarthritis of finger joints in Finns aged 30 or over: prevalence, determinants, and association with mortality. *Ann Rheum Dis.* 2003 Feb;62(2):151-8.
- Hall AJ, Stubbs B, Mamas MA, Myint PK, Smith TO. Association between osteoarthritis and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2016; 23: 938-46.
- Hansberry DR, Shah K, Agarwal P, Agarwal N. Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Cureus.* 2017 Jan 31;9(1):e1004.

- Hardin JA, Cobelli N, Santambrogio L. Consequences of metabolic and oxidative modifications of cartilage tissue. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Sep;11(9):521-9.
- Harding JJ. Viewing molecular mechanisms of ageing through a lens. *Ageing Res Rev*. 2002;1:465-79.
- Hart DJ, Spector TD, Egger P, Coggon D, Cooper C: Defining osteoarthritis of the hand for epidemiological studies: the Chingford study. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:220-223.
- Hasuike Y, Nakanishi T, Maeda K, Tanaka T, Inoue T, Takamitsu Y. Carbamylated hemoglobin as a therapeutic marker in hemodialysis. *Nephron*. 2002;91:228-34.
- Haugen IK, Magnusson K, Turkiewicz A, Englund M. The Prevalence, Incidence, and Progression of Hand Osteoarthritis in Relation to Body Mass Index, Smoking, and Alcohol Consumption. *J Rheumatol*. 2017 Sep;44(9):1402-1409.
- Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res*. 2001;3:118-126.
- Heppelmann B, McDougall JJ. Inhibitory effect of amiloride and gadolinium on fine afferent nerves in the rat knee: evidence of mechanogated ion channels in joints. *Exp Brain Res*. 2005 Nov;167(1):114-8.
- Higashi S, Miyazaki K. Reactive site-modified tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the cell-mediated activation of progelatinase A. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):10497-504.
- Hochberg MC, Guermazi A, Guehring H, Aydemir A, Wax S, Fleuranceau-Morel P, Reinstrop Bihlet A, Byrjalsen I, Ragnar Andersen J, Eckstein F. Effect of Intra-Articular Sprifermin vs Placebo on Femorotibial Joint Cartilage Thickness in Patients With Osteoarthritis: The FORWARD Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019 Oct 8;322(14):1360-1370.
- Hodkinson B, Maheu E, Michon M, Carrat F, Berenbaum F. Assessment and determinants of aesthetic discomfort in hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jan;71(1):45-9.
- Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest*. 1995 Dec;96(6):2859-69.
- Hörkkö S, Huttunen K, Kervinen K, Kesäniemi YA. Decreased clearance of uraemic and mildly carbamylated low-density lipoprotein. *Eur J Clin Invest*. 1994 Feb;24(2):105-13.
- Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013 Nov;15(11):375.

- Hsia AW, Emami AJ, Tarke FD, et al. Osteophytes and fracture calluses share developmental milestones and are diminished by unloading. *J Orthop Res.* 2018;36:699-710.
- Hsu PS, Lin HH, Li CR, Chung WS. Increased risk of stroke in patients with osteoarthritis: a population-based cohort study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25:1026-31.
- Huang CY, Lai KY, Hung LF, Wu WL, Liu FC, Ho LJ. Advanced glycation end products cause collagen II reduction by activating Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in porcine chondrocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Aug;50(8):1379-89.
- Huch K, Kuettner KE, Dieppe P. Osteoarthritis in ankle and knee joints. *Semin Arthritis Rheum.* 1997 Feb;26(4):667-74.
- Hudelmaier M, Glaser C, Hohe J, Englmeier KH, Reiser M, Putz R, Eckstein F. Age-related changes in the morphology and deformational behavior of knee joint cartilage. *Arthritis Rheum.* 2001 Nov;44(11):2556-61.
- Hughes LC, Archer CW, Ap Gwynn I. The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eur Cell Mater.* 2005; 9:68-84.
- Hunter DJ, Zhang Y, Nevitt MC, Xu L, Niu J, Lui LY, Yu W, Aliabadi P, Felson DT. Chopstick arthropathy: the Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5):1495-500.
- Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Jul;10(7):437-41.
- Hunziker EB, Kapfinger E, Geiss J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development. *Osteoarthr. Cartilage.* 2007; 15:403-413.
- Hurnakova J, Filippucci E, Cipolletta E, Di Matteo A, Salaffi F, Carotti M, Draghessi A, Di Donato E, Di Carlo M, Lato V, Horvath R, Komarc M, Pavelka K, Grassi W. Prevalence and distribution of cartilage damage at the metacarpal head level in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: an ultrasound study. *Rheumatology (Oxford).* 2019 Jul 1;58(7):1206-1213.
- Hussain SM, Cicuttini FM, Alyousef B, Wang Y. Female hormonal factors and osteoarthritis of the knee, hip and hand: a narrative review. *Climacteric.* 2018 Apr;21(2):132-139.
- I**mamura M, Ezquerro F, Alfieri FM, Vilas Boas L, Tozetto-Mendoza TR, Chen J, Özçakar L, Arendt-Nielsen L, Rizzo Battistella L. Serum levels of proinflammatory cytokines in painful knee osteoarthritis and sensitization. *Int J Inflamm* 2015;2015:329792.
- J**acques C, Gosset M, Berenbaum F, Gaby C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm.* 2006;74:371-403.

- Jaisson S, Lorimier S, Ricard-Blum S, Sockalingum GD, Delevallée-Forte C, Kegelaer G, Manfait M, Garnotel R, Gillery P. Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils. *Chem Biol.* 2006;13(2):149-59.
- Jaisson S, Larreta-Garde V, Bellon G, Hornebeck W, Garnotel R, Gillery P. Carbamylation differentially alters type I collagen sensitivity to various collagenases. *Matrix Biol.* 2007 Apr;26(3):190-6.
- Jaisson S, Sartelet H, Perreau C, Blanchevoye C, Garnotel R, Gillery P. Involvement of lysine 1047 in type I collagen-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils. *FEBS J.* 2008 Jun;275(12):3226-35.
- Jaisson S, Kerkeni M, Santos-Weiss IC, Addad F, Hammami M, Gillery P. Increased serum homocitrulline concentrations are associated with the severity of coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Jan;53(1):103-10.
- Jaisson S, Desmons A, Doué M, Gorisse L, Pietrement C, Gillery P. Measurement of Homocitrulline, A Carbamylation-derived Product, in Serum and Tissues by LC-MS/MS. *Curr Protoc Protein Sci.* 2018 Apr;92(1):e56.
- Jaisson S, Pietrement C, Gillery P. Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers. *Adv Clin Chem.* 2018;84:1-38.
- Jiang L, Xie X, Wang Y, Wang Y, Lu Y, Tian T, Chu M, Shen Y. Body mass index and hand osteoarthritis susceptibility: an updated meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* 2016 Dec;19(12):1244-1254.
- K**alichman L, Hernández-Molina G. Hand osteoarthritis: an epidemiological perspective. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;39(6):465-476.
- Kang Y, Koepp H, Cole AA, Kuettner KE, Homandberg GA: Cultured human ankle and knee cartilage differ in susceptibility to damage mediated by fibronectin fragments. *J Orthop Res.* 1998;16(5):551-556.
- Karalezli N, Durduran SS, Ogün TC, Uysal II, Unver Doğan N, Oz M. Is the rabbit knee a suitable model for the human interphalangeal and metacarpophalangeal joints of the hand? *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2010;44(5):361-364.
- Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis.* 1957 Dec;16(4):494-502.
- Kidd BL, Photiou A, Inglis JJ. The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. *Novartis Found Symp.* 2004;260:122-133.
- Kjeken I, Dagfinrud H, Slatkowsky-Christensen B, Mowinckel P, Uhlig T, Kvien TK, Finset A. Activity limitations and participation restrictions in women with hand osteoarthritis: patients' descriptions and associations between dimensions of functioning. *Ann Rheum Dis.* 2005 Nov;64(11):1633-8.

- Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Herzig E, Kwoh CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra D, Shah AA, Shmigel AK, Thoma LM, Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Rheumatol.* 2020 Feb;72(2):220-233.
- Kouki I, Tuffet S, Crema MD, Rousseau A, Richette P, Dougados M, Berenbaum F, Sellam J, Courties A. Metacarpophalangeal impairment in hand osteoarthritis is not rare and is associated with mechanical factors: Results from the DIGICOD hand osteoarthritis cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2021 May 10.
- Kraus LM, Gaber L, Handorf CR, Marti HP, Kraus AP. Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage. *Swiss Med. Wkly* 2001;131:139-144.
- Kraus LM, Kraus AP Jr. Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int Suppl.* 2001;78:S102-7.
- Kronheim SR, Mumma A, Greenstreet T, Glackin PJ, van Ness K, March CJ, et al. Purification of interleukin-1 beta converting enzyme, the protease that cleaves the interleukin-1 beta precursor. *Arch Biochem Biophys.* 1992;296:698-703.
- Kroon FPB, Carmona L, Schoones JW, Kloppenburg M. Efficacy and safety of non-pharmacological, pharmacological and surgical treatment for hand osteoarthritis: a systematic literature review informing the 2018 update of the EULAR recommendations for the management of hand osteoarthritis. *RMD Open.* 2018 Oct 11;4(2):e000734.
- Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, et al. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* 2009;28:1431-5.
- Kuckel CL, Lubit BW, Lambooy PK, Farnsworth PN. Methylisocyanate and actin polymerization: the in vitro effects of carbamylation. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Mar 5;1162(1-2):143-8.
- Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(2):93-103.
- Kühn K, D'Lima DD, Hashimoto S, Lotz M. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Jan;12(1):1-16.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010 Nov 15;24(22):2463-79.

- L**aiguillon MC, Courties A, Houard X, Auclair M, Sautet A, Capeau J, Fève B, Berenbaum F, Sellam J. Characterization of diabetic osteoarthritic cartilage and role of high glucose environment on chondrocyte activation: toward pathophysiological delineation of diabetes mellitus-related osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(9):1513-1522.
- Laiguillon MC, Houard X, Bougault C, Gosset M, Nourissat G, Sautet A, Jacques C, Berenbaum F, Sellam J. Expression and function of visfatin (Nampt), an adipokine-enzyme involved in inflammatory pathways of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jan 31;16(1):R38.
- Lane NE, Bloch DA, Jones HH, Simpson U, Fries JF. Osteoarthritis in the hand: a comparison of handedness and hand use. *J Rheumatol*. 1989 May;16(5):637-42.
- Larson KM, Zhang L, Elsaid KA, Schmidt TA, Fleming BC, Badger GJ, Jay GD. Reduction of friction by recombinant human proteoglycan 4 in IL-1 α stimulated bovine cartilage explants. *J Orthop Res*. 2017;35(3):580-589.
- Larson KM, Zhang L, Badger GJ, Jay GD. Early genetic restoration of lubricin expression in transgenic mice mitigates chondrocyte peroxynitrite release and caspase-3 activation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(9):1488-1495.
- Lasczkowski GE, Aigner T, Gamerding U, Weiler G, Bratzke H. Visualization of postmortem chondrocyte damage by vital staining and confocal laser scanning 3D microscopy. *J Forensic Sci*. 2002 May;47(3):663-6.
- Latourte A, Cherifi C, Maillet J, Ea HK, Bouaziz W, Funck-Brentano T, Cohen-Solal M, Hay E, Richette P. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017 Apr;76(4):748-755.
- Legendre F, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol JP. Role of interleukin 6 (IL-6)/IL-6R-induced signal transducers and activators of transcription and mitogen-activated protein kinase/extracellular. *J Rheumatol*. 2005 Jul;32(7):1307-16.
- Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Apr;1862(4):576-591.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999 Mar 16;130(6):461-70.
- Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br Med Bull*. 2013;105:185-99.
- Loeser RF, Collins JA, Diekmann BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12: 412-20.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153:1194-1217.

- Louati K, Vidal C, Berenbaum F, Sellam J. Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open*. 2015 Jun 2;1(1):e000077.
- Loza E, Lopez-Gomez JM, Abasolo L, Maese J, Carmona L, Batlle-Gualda E. Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis Rheum*. 2009 Feb 15; 61(2):158-65.
- Lundquist P, Backman-Gullers B, Kagedal B, Nilsson L, Rosling H. Fluorometric determination of cyanate in plasma by conversion to 2,4(1H,3H)-quinazolinedione and separation by highperformance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1993;211:23-7.
- M**ahjoub M, Berenbaum F, Houard X. Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int*. 2012 Dec;23 Suppl 8:S841-6.
- Malfait AM, Schnitzer TJ. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Nov;9(11):654-64.
- Mannkin HJ. Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. *J. Bone Joint Surg*. 1962; 44:688-698.
- Mankin HJ. Biochemical and metabolic aspects of osteoarthritis. *Orthop Clin North Am*. 1971;2:19e31.
- Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 May 29;8(7):390-8.
- Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Iacono F, Neri MP, Vascellari A, Visani A, Russo A. Multiple osteochondral arthroscopic grafting (mosaicplasty) for cartilage defects of the knee: prospective study results at 2-year follow-up. *Arthroscopy*. 2005 Apr;21(4):462-70.
- Marshall M, Watt FE, Vincent TL, Dziedzic K. Hand osteoarthritis: clinical phenotypes, molecular mechanisms and disease management. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Nov;14(11):641-656.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, Di Battista J, Faure M-P, Chin JA, Fournier S, Sarfati M, Pelletier JP. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes: identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum*. 1992; 35: 530-40.
- Martin JA, Buckwalter JA. Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *Iowa Orthop J*. 2001;21:1-7.
- McKinley TO, Borrelli J Jr, D'Lima DD, Furman BD, Giannoudis PV. Basic science of intra-articular fractures and posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Trauma*. 2010 Sep;24(9):567-70.

- Michael JW, Schlüter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Mar;107(9):152-62.
- Middleton J, Arnott N, Walsh S, Beresford J. Osteoblasts and osteoclasts in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin-like growth factors I and II and the type I IGF receptor. *Bone.* 1995 Mar;16(3):287-93.
- Millward-Sadler SJ, Salter DM. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng.* 2004 Mar;32(3):435-46.
- Molnar V, Matišić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz D, Rod E, Čukelj F, Vrdoljak T, Vidović D, Starešinić M, Sabalić S, Dobričić B, Petrović T, Antičević D, Borić I, Košir R, Zmrzljak UP, Primorac D. Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 26;22(17):9208.
- Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggle KS, Reardon B, Ellsworth JL. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(7):623-631.
- Moran JM, Hemann JH, Greenwald AS. Finger joint contact areas and pressures. *J Orthop Res.* 1985;3:49-55.
- Mori Y, Saito T, Chang SH, Kobayashi H, Ladel CH, Guehring H, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling. *J Biol Chem.* 2014;289(14):10192-10200.
- Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2002 Jul 11;347(2):81-8.
- Muhammad H, Rais Y, Miosge N, Ornan EM. The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Jul;69(13):2101-7.
- Mun KC, Golper TA. Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif.* 2000;18(1):13-7.
- Nakabo S, Hashimoto M, Ito S, Furu M, Ito H, Fujii T, Yoshifuji H, Imura Y, Nakashima R, Murakami K, Kuramoto N, Tanaka M, Satoh J, Ishigami A, Morita S, Mimori T, Ohmura K. Carbamylated albumin is one of the target antigens of anti-carbamylated protein antibodies. *Rheumatology (Oxford).* 2017 Jul 1;56(7):1217-1226.
- Nakabo S, Ohmura K, Akizuki S, Murakami K, Nakashima R, Hashimoto M, Yoshifuji H, Tanaka M, Mimori T. Activated neutrophil carbamylates albumin via the release of myeloperoxidase and reactive oxygen species regardless of NETosis. *Mod Rheumatol.* 2020 Mar;30(2):345-349.
- Namba RS, Meuli M, Sullivan KM, Le AX, Adzick NS. Spontaneous repair of superficial defects in articular cartilage in a fetal lamb model. *J. Bone Joint Surg.* 1998; 80:4.

- National Institute for Health and Care Excellence. Osteoarthritis: care and management. Clinical guideline (CG177). London: NICE, 2014.
- Nguyen C, Ea HK, Thiaudiere D, Reguer S, Hannouche D, Daudon M, Lioté F, Bazin D. Calcifications in human osteoarthritic articular cartilage: ex vivo assessment of calcium compounds using XANES spectroscopy. *J Synchrotron Radiat*. 2011 May;18(Pt 3):475-80.
- Nguyen C, Lefèvre-Colau MM, Poiraudreau S, Rannou F. Rehabilitation (exercise and strength training) and osteoarthritis: A critical narrative review. *Ann Phys Rehabil Med*. 2016 Jun;59(3):190-195.
- Nguyen C, Lefèvre-Colau MM, Poiraudreau S, Rannou F. Evidence and recommendations for use of intra-articular injections for knee osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med*. 2016 Jun;59(3):184-189.
- Nigen AM, Njikam N, Lee CK, Manning JM. Studies on the mechanism of action of cyanate in sickle cell disease. Oxygen affinity and gelling properties of hemoglobin S carbamylated on specific chains. *J Biol Chem*. 1974 Oct 25;249(20):6611-6.
- Nilsson L, Lundquist P, Kagedal B, Larsson R ; Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure ; *Clin Chem*. 1996 ;42 :482-483.
- Novakofski KD, Berg LC, Bronzini I, Bonnevie ED, Poland SG, Bonassar LJ, Fortier LA. Joint-dependent response to impact and implications for post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23(7):1130-1137.
- O**liveria SA, Felson DT, Reed JI, et al. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis and Rheumatism*. 1995; 38(8):1134-1141.
- Outerbridge RE. The etiology of chondromataciae patellae. *J Bone Joint Surg*. 1961 ;43:752-757.
- P**ecchi E, Priam S, Gosset M, Pigenet A, Sudre L, Laiguillon MC, Berenbaum F, Houard X. Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jan 20;16(1):R16.
- Pedchenko VK, Chetyrkin SV, Chuang P, Ham AJ, Saleem MA, Mathieson PW, et al. Mechanism of perturbation of integrin-mediated cell-matrix interactions by reactive carbonyl compounds and its implication for pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2005;54:2952-60.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1237-1247.

- Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Nov;19(11):1270-85.
- Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Mar 18;2020:3818196.
- Pestka JM, Schmal H, Salzmann G, Hecky J, Südkamp NP, Niemeyer P. In vitro cell quality of articular chondrocytes assigned for autologous implantation in dependence of specific patient characteristics. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011 Jun;131(6):779-89.
- Phillips M, Bhandari M, Grant J, Bedi A, Trojian T, Johnson A, Schemitsch E. A Systematic Review of Current Clinical Practice Guidelines on Intra-articular Hyaluronic Acid, Corticosteroid, and Platelet-Rich Plasma Injection for Knee Osteoarthritis: An International Perspective. *Orthop J Sports Med*. 2021 Aug 31;9(8):23259671211030272.
- Pietremont C, Gorisse L, Jaisson S, Gillery P. Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD. *PLoS One*. 2013 Dec 4;8(12):e82506.
- Plodinec M, Loparic M, Aebi U. Imaging articular cartilage tissue using atomic force microscopy (AFM). *Cold Spring Harb Protoc*. 2010 Oct 1;2010(10):pdb.prot5499.
- Poole J, Sayer AA, Hardy R, Wadsworth M, Kuh D, Cooper C: Patterns of interphalangeal hand joint involvement of osteoarthritis among men and women: a British cohort study. *Arthritis Rheum*. 2003, 48:3371-3376.
- Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73: 1659-64.
- Pulsatelli L, Dolzani P, Piacentini A, Silvestri T, Ruggeri R, Gualtieri G, et al. Chemokine production by human chondrocytes. *J Rheumatol*. 1999;26:1992e2001.
- Punzi L, Ramonda R, Deberg M, Frallonardo P, Campana C, Musacchio E, Henrotin Y. Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Jun;20(6):557-61.
- R**amasamy TS, Yee YM, Khan IM. Chondrocyte Aging: The Molecular Determinants and Therapeutic Opportunities. *Verbruggen 2000*). 2021 Jul 14;9:625497.
- Reyes C, Leyland KM, Peat G, Cooper C, Arden NK, Prieto-Alhambra D. Association Between Overweight and Obesity and Risk of Clinically Diagnosed Knee, Hip, and Hand Osteoarthritis: A Population-Based Cohort Study. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Aug;68(8):1869-75.

- Richette P, Latourte A, Sellam J, Wendling D, Piperno M, Goupille P, Pers YM, Eymard F, Ottaviani S, Ornetti P, Flipo RM, Fautrel B, Peyr O, Bertola JP, Vicaut E, Chevalier X. Efficacy of tocilizumab in patients with hand osteoarthritis: double blind, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Ann Rheum Dis*. 2020 Oct 14;annrheumdis-2020-218547.
- Riegger J, Joos H, Palm HG, Friemert B, Reichel H, Ignatius A, Brenner RE. Striking a new path in reducing cartilage breakdown: combination of antioxidative therapy and chondroanabolic stimulation after blunt cartilage trauma. *J Cell Mol Med*. 2017;22(1):77-88.
- Roberts JM, Veres PR, Cochran AK, Warneke C, Burling IR, Yokelson RJ, Lerner B, Gilman JB, Kuster WC, Fall R, de Gouw J. Isocyanic acid in the atmosphere and its possible link to smoke-related health effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):8966-71.
- Rolauffs B, Williams JM, Aurich M, Grodzinsky AJ, Kuettner KE, Cole AA. Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62:489-498.
- Rose J, Söder S, Skhirtladze C, Schmitz N, Gebhard PM, Sesselmann S, Aigner T. DNA damage, disorganized gene expression and cellular senescence in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Sep;20(9):1020-8.
- Rossignol M, Leclerc A, Allaert FA, Rozenberg S, Valat JP, Avouac B, Coste P, Litvak E, Hilliqui P. Osteoarthritis of hip, knee, and hand in relation to occupational exposure. *Occup Environ Med*. 2005;62:772-777.
- S**aberi Hosnijeh F, Zuiderwijk ME, Versteeg M, et al. Cam deformity and acetabular dysplasia as risk factors for hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69: 86–93. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Nov;6(11):625-35.
- Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier J-P, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. Interleukin-1 β -converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1 β and interleukin-18. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 1577-87.
- Saltzherr MS, Muradin GSR, Haugen IK, Selles RW, van Neck JW, Coert JH, Hazes JMW, Luime JJ. Cartilage evaluation in finger joints in healthy controls and early hand osteoarthritis patients using high-resolution MRI. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 Aug;27(8):1148-1151.
- Sakellariou G, Conaghan PG, Zhang W, et al. EULAR recommendations for the use of imaging in the clinical management of peripheral joint osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76: 1484-94.
- Salvat C, Pigenet A, Humbert L, Berenbaum F, Thirion S. Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Mar;13(3):243-9.

- Shekhawat VK, Schmid TM, Pennekamp PH, Pacione CA, Chubinskaya S, Wimmer MA. Implications of trauma and subsequent articulation on the release of Proteoglycan-4 and tissue response in adult human ankle cartilage. *J Orthop Res.* 2017;35(3):667-676.
- Scharf B, Clement CC, Yodmuang S, Urbanska AM, Suadiciani SO, Aphkhasava D, Thi MM, Perino G, Hardin JA, Cobelli N, Vunjak-Novakovic G, Santambrogio L. Age-related carbonylation of fibrocartilage structural proteins drives tissue degenerative modification. *Chem Biol.* 2013 Jul 25;20(7):922-34.
- Schofield D, Cunich M, Shrestha RN, et al. The long-term economic impacts of arthritis through lost productive life years: results from an Australian microsimulation model. *BMC Public Health.* 2018;18: 654.
- Shaykh M, Pegoraro AA, Mo W, Arruda JA, Dunea G, Singh AK. Carbamylated proteins activate glomerular mesangial cells and stimulate collagen deposition. *J Lab Clin Med.* 1999 Mar;133(3):302-8.
- Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GM, van Veelen PA, Levarht LE, van der Helm-van Mil AH, Cerami A, Huizinga TW, Toes RE, Trouw LA. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108: 17372-17377.
- Sellam J, Courties A, Eymard F, Ferrero S, Latourte A, Ornetti P, Bannwarth B, Baumann L, Berenbaum F, Chevalier X, Ea HK, Fabre MC, Forestier R, Grange L, Lellouche H, Maillet J, Mainard D, Perrot S, Rannou F, Rat AC, Roux CH, Senbel E, Richette P; French Society of Rheumatology. Recommendations of the French Society of Rheumatology on pharmacological treatment of knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2020 Dec;87(6):548-555.
- Sellam J, Maheu E, Crema MD, Touati A, Courties A, Tuffet S, Rousseau A, Chevalier X, Combe B, Dougados M, Fautrel B, Kloppenburg M, Laredo JD, Loeuille D, Miquel A, Rannou F, Richette P, Simon T, Berenbaum F. The DIGICOD cohort: A hospital-based observational prospective cohort of patients with hand osteoarthritis - methodology and baseline characteristics of the population. *Joint Bone Spine.* 2021 Jul;88(4):105171.
- Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015; 23: 507-15.
- Simon WH. Scale effects in animal joints. I. Articular cartilage thickness and compressive stress. *Arthritis Rheum.* 1970 May-Jun;13(3):244-56.
- Squires GR, Okouneff S, Ionescu M, Poole AR. The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 May;48(5):1261-70.

- Slemenda C, Brandt KD, Heilman DK, Mazucca S, Braunstein EM, Katz BP, Wolinsky FD. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med.* 1997 Jul 15;127(2):97-104.
- Sowers M, Karvonen-Gutierrez CA, Palmieri-Smith R, Jacobson JA, Jiang YB, Ashton-Miller JA. Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1328-36.
- Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12 Suppl A:S39-44.
- Speer T, Owala FO, Holy EW, Zewinger S, Frenzel FL, Stähli BE, Razavi M, Triem S, Cvija H, Rohrer L, Seiler S, Heine GH, Jankowski V, Jankowski J, Camici GG, Akhmedov A, Fliser D, Lüscher TF, Tanner FC. Carbamylated low-density lipoprotein induces endothelial dysfunction. *Eur Heart J.* 2014 Nov 14;35(43):3021-32.
- Stannus OP, Jones G, Blizzard L, Cicuttini FM, Ding C. Associations between serum levels of inflammatory markers and change in knee pain over 5 years in older adults: a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2013 Apr;72(4):535-40.
- Steinbeck MJ, Nesti LJ, Sharkey PF, Parvizi J. Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. *J Orthop Res.* 2007 Sep;25(9):1128-35.
- Steinmeyer J, Knue S. The proteoglycan metabolism of mature bovine articular cartilage explants superimposed to continuously applied cyclic mechanical loading. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240, 216-221.
- Stern AG, de Carvalho MR, Buck GA, Adler RA, Rao TP, Disler D, Moxley G; I-NODAL Network. Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003 Jun;11(6):394-402.
- Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat.* 1971 Sep;109(Pt 3):411-21.
- Stradner MH, Dreu M, Angerer H, Gruber G, Wagner K, Peischler D, Krischan V, Leithner A, Anderhuber F, Graninger WB. Chondrocyte Cultures From Human Proximal Interphalangeal Finger Joints. *Journal of orthopaedic research.* 2016 :1569-1575.
- Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther.* 2014 Jun 13;16(3):R122.
- T**an AL, Toumi H, Benjamin M, Grainger AJ, Tanner SF, Emery P, et al. Combined high resolution magnetic resonance imaging and histology to explore the role of ligaments and tendons in the phenotypic expression of early hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:1267-72.

- Tanamas S, Hanna FS, Cicuttini FM, Wluka AE, Berry P, Urquhart DM. Does knee malalignment increase the risk of development and progression of knee osteoarthritis? A systematic review. *Arthritis Rheum.* 2009 Apr 15;61(4):459-67.
- Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jul;281(1):C1-C11.
- Thomas CJ, Cleland TP, Sroga GE, Vashishth D. Accumulation of carboxymethyl-lysine (CML) in human cortical bone. *Bone.* 2018 May;110:128-133.
- Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, Dawnay A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J.* 2003;375:581-92.
- Tomi AL, Sellam J, Lacombe K, Fellahi S, Sebire M, Rey-Jouvin C, Miquel A, Bastard JP, Maheu E, Haugen IK, Felson DT, Capeau J, Girard PM, Berenbaum F, Meynard JL. Increased prevalence and severity of radiographic hand osteoarthritis in patients with HIV-1 infection associated with metabolic syndrome: data from the cross-sectional METAFIB-OA study. *Ann Rheum Dis.* 2016 Dec;75(12):2101-2107.
- Tran K, Loshak H. Intra-Articular Hyaluronic Acid for Viscosupplementation in Osteoarthritis of the Hand, Shoulder, and Temporomandibular Joint: A Review of Clinical Effectiveness and Safety. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. 2019 Jul 25.
- Trellu S, Courties A, Jaisson S, Gorisse L, Gillery P, Kerdine-Römer S, Vaamonde-Garcia C, Houard X, Ekhirch FP, Sautet A, Friguet B, Jacques C, Berenbaum F, Sellam J. Impairment of glyoxalase-1, an advanced glycation end-product detoxifying enzyme, induced by inflammation in age-related osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2019 Jan 11;21(1):18.
- Treppo S, Koepp H, Quan EC, Cole AA, Kuettner KE, Grodzinsky AJ. Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res.* 2000;18(5):739-748.
- Turkiewicz A, Petersson IF, Björk J, Hawker G, Dahlberg LE, Lohmander LS, Englund M. Current and future impact of osteoarthritis on health care: a population-based study with projections to year 2032. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014 Nov;22(11):1826-32.
- Van Eegher S, Perez-Lozano ML, Toillon I, Valour D, Pigenet A, Citadelle D, Bourrier C, Courtade-Gaïani S, Grégoire L, Cléret D, Malbos S, Nourissat G, Sautet A, Lafage-Proust MH, Pastoureau P, Rolland-Valognes G, De Ceuninck F, Berenbaum F, Houard X. The differentiation of prehypertrophic into hypertrophic chondrocytes drives an OA-remodeling program and IL-34 expression. *Osteoarthritis Cartilage.* 2021 Feb;29(2):257-268.
- Van Linthoudt D. Présentation clinique, imagerie et traitement de l'arthrose digitale. *Rev Med Suisse.* 2010 Mar 17;6(240):562-568.

- van Meurs JB. Osteoarthritis year in review 2016: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017; 25: 181-89.
- van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis*. Apr; 1989 48(4):271-280.
- Venkatesan N, Barré L, Bourhim M, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. Xylosyltransferase-I regulates glycosaminoglycan synthesis during the pathogenic process of human osteoarthritis. *PLoS One*. 2012;7(3):e34020.
- Verbruggen G, Veys EM. Numerical scoring systems for the anatomic evolution of osteoarthritis of the finger joints. *Arthritis Rheum*. 1996 Feb;39(2):308-20.
- Verbruggen G, Cornelissen M, Almqvist KF, Wang L, Elewaut D, Broddelez C, de Ridder L, Veys EM. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000 May;8(3):170-9.
- Verbruggen G, Wittoek R, Cruyssen BV, Elewaut D. Morbid anatomy of ‘erosive osteoarthritis’ of the interphalangeal finger joints: an optimised scoring system to monitor disease progression in affected joints. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:862-867.
- Veronese N, Cereda E, Maggi S, et al. Osteoarthritis and mortality: a prospective cohort study and systematic review with meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2016; 46:160-67.
- Verzijl E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Tekoppele JM. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J*. 2000 Sep 1;350(Pt 2): 381-387.
- Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel Verzijl N, DeGroot J, Bank RA, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Maroudas A, TeKoppele JM. Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol*. 2001 Nov;20(7):409-17.
- Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, Brau-Benjamin O, Maroudas A, Bank RA, Mizrahi J, Schalkwijk CG, Thorpe SR, Baynes JW, Bijlsma JW, Lafeber FP, TeKoppele JM. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2002 Jan;46(1):114-23.
- Vinatier C, Merceron C, Guicheux J. Osteoarthritis: from pathogenic mechanisms and recent clinical developments to novel prospective therapeutic options. *Drug Discov Today*. 2016 Dec;21(12):1932-1937.
- Vinatier C, Domínguez E, Guicheux J, Caramés B. Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis. *Front Physiol*. 2018 Jun 25;9:706.

- Visser AW, de Mutsert R, le Cessie S, den Heijer M, Rosendaal FR, Kloppenburg M; NEO Study Group. The relative contribution of mechanical stress and systemic processes in different types of osteoarthritis: the NEO study. *Ann Rheum Dis.* 2015 Oct;74(10):1842-7.
- W**aller KA, Chin KE, Jay GD, Zhang LX, Teeple E, McAllister S, Badger GJ, Schmidt TA, Fleming BC. Intra-articular Recombinant Human Proteoglycan 4 Mitigates Cartilage Damage After Destabilization of the Medial Meniscus in the Yucatan Minipig. *Am J Sports Med.* 2017;45(7):1512-1521.
- Wang H, Bai J, He B, Hu X, Liu D. Osteoarthritis and the risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of observational studies. *Sci Rep.* 2016; 6: 39672.
- Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018 Dec;44:38-50.
- Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Hörkö S, Barnard J, Reynolds WF, Topol EJ, DiDonato JA, Hazen SL. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med.* 2007 Oct;13(10):1176-84.
- Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, et al. Protein carbamoylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med.* 2007;13:1176-84.
- Wen CY, Wu CB, Tang B, Wang T, Yan CH, Lu WW, Pan H, Hu Y, Chiu KY. Collagen fibril stiffening in osteoarthritic cartilage of human beings revealed by atomic force microscopy. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012 Aug;20(8):916-22.
- Williams WV, Cope R, Gaunt WD, Adelstein EH, Hoyt TS, Singh A, Pressly TA, English R, Schumacher HR Jr, Walker SE. Metacarpophalangeal arthropathy associated with manual labor (Missouri metacarpal syndrome). Clinical radiographic, and pathologic characteristics of an unusual degeneration process. *Arthritis Rheum.* 1987; 30:1362-71.
- Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson I, McCarthy HE, Anabalsi T. Identification and clonal characterization of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One.* 2010a; 5:e13246.
- Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003;81:646-56.
- X**ie X, van Delft MAM, Shuweihdi F, Kingsbury SR, Trouw LA, Doody GM, Conaghan PG, Ponchel F. Auto-antibodies to post-translationally modified proteins in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2021 Jun;29(6):924-933.
- Xue M, Rabbani N, Momiji H, Imbasi P, Anwar MM, Kitteringham N, Park BK, Souma T, Moriguchi T, Yamamoto M, Thornalley PJ. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *Biochem J.* 2012 Apr 1;443(1):213-22.

- Y**azici Y, McAlindon TE, Gibofsky A, Lane NE, Clauw D, Jones M, Bergfeld J, Swearingen CJ, DiFrancesco A, Simsek I, Tambiah J, Hochberg MC. Lorecivivint, a Novel Intraarticular CDC-like Kinase 2 and Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A Inhibitor and Wnt Pathway Modulator for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase II Randomized Trial. *Arthritis Rheumatol*. 2020 Oct;72(10):1694-1706.
- Younessi P, Yoonessi A. Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress. *Iran J Med Sci*. 2011 Sep;36(3):154-66.
- Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G, Middeldorp S, Huizinga TW, Kloppenburg M. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2010 Apr;69(4):761-5.
- Yusuf E, Ioan-Facsinay A, Bijsterbosch J, Klein-Wieringa I, Kwekkeboom J, Slagboom PE, et al. Association between leptin, adiponectin and resistin and long-term progression of hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1282-4.
- Yusuf E. Metabolic factors in osteoarthritis: obese people do not walk on their hands. *Arthritis Res Ther*. 2012 Jul 19;14(4):123.
- Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, Dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow-up of the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20:1217-26.
- Z**apata-Linares N, Eymard F, Berenbaum F, Houard X. Role of adipose tissues in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2021 Jan;33(1):84-93.
- Zhang C, Wang P, Jiang P, Lv Y, Dong C, Dai X, Tan L, Wang Z. Upregulation of lncRNA HOTAIR contributes to IL-1beta-induced MMP overexpression and chondrocytes apoptosis in temporomandibular joint osteoarthritis. *Gene*. 2016 Jul 25;586(2):248-53.
- Zhang Y, Nevitt M, Niu J, et al. Fluctuation of knee pain and changes in bone marrow lesions, effusions, and synovitis on magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum*. 2011; 63: 691-99.
- Zheng H, Chen C. Body mass index and risk of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *BMJ Open*. 2015 Dec 11;5(12):e007568.
- Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):429-38.

ANNEXES

Annexe 1

Revue du rhumatisme monographies 88 (2021) 145–153



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Nouveautés médicales et prise en charge chirurgicale dans l'arthrose digitale

Medical innovations and surgical therapeutic options in hand osteoarthritis

Adeline Cambon-Binder^a, Alice Courties^{b,*}

^a Inserm UMRS 938, service de chirurgie orthopédique, Sorbonne université, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France
^b Inserm UMRS 938, service de rhumatologie, Sorbonne université, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France



INFORMATION

Historique de l'article :
Reçu le 2 novembre 2020
Accepté le 11 décembre 2020
Disponible sur Internet le 31 décembre 2020

Mots clés :
Arthrose digitale
Corticostéroïdes
Prothèse
Trapézectomie

Keywords:
Hand osteoarthritis
Corticosteroids
Prosthesis
Trapezectomy

RÉSUMÉ

L'arthrose digitale est une pathologie très fréquente et hétérogène. Sa prise en charge médicale repose actuellement sur des recommandations européennes et comprend des mesures pharmacologiques (AINS topiques, et infiltrations) et non pharmacologiques (orthèses, et ergonomie). Les traitements conventionnels synthétiques ou biologiques, utilisés dans la polyarthrite rhumatoïde n'ont pas démontré d'efficacité. Le seul essai positif de ces dernières années porte sur la corticothérapie faible dose qui a démontré un effet suspensif. Cependant, d'autres moyens thérapeutiques comme les infiltrations de toxine botulique ou encore la stimulation du nerf vague sont en cours d'évaluation. En ce qui concerne les traitements chirurgicaux, l'arthrodèse reste l'intervention de choix pour l'arthrose interphalangienne distale et de nouveaux modes de fixation autorisent une mobilisation immédiate. Au niveau de l'interphalangienne proximale, la dénervation articulaire est une solution conservatrice intéressante, tandis que le meilleur résultat fonctionnel est obtenu avec une prothèse. Les nouveaux modèles d'implants de resurfaçage donnent des amplitudes supérieures à celles des implants en silicone à charnière, mais nous ne disposons pas encore du recul que nous avons pour ces derniers. En ce qui concerne la rhizarthrose, la trapézectomie avec ou sans ligamentoplastie de suspension a été confrontée ces dernières années à la sévère concurrence des prothèses trapézométacarpiennes qui permettent une récupération fonctionnelle plus rapide malgré un taux de complications plus élevé et une survie à long terme encore mal connue. Au total, la prise de décision chirurgicale s'appuie sur de multiples facteurs : demande fonctionnelle du patient, stabilité de l'articulation arthrosique, paramètres anatomiques radiographiques.

© 2021 Société Française de Rhumatologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Hand osteoarthritis (OA) is a very frequent and heterogeneous disease. Its medical management is currently based on European recommendations and includes pharmacological (topical NSAIDs, and infiltrations) and non-pharmacological measures (orthotics, and ergonomics). Conventional synthetic or biological treatments used in rheumatoid arthritis have not demonstrated any efficacy. The only positive trial in recent years is low-dose corticosteroid therapy, which has demonstrated a suspensive effect. However, new therapeutic options such as botulinum toxin infiltrations or vagus nerve stimulation are currently being evaluated. As far as surgical treatment is concerned, arthrodesis remains the intervention of choice for distal interphalangeal OA and new fixation methods allow immediate mobilization. At the proximal interphalangeal level, joint denervation is an interesting conservative solution, while the best functional result is obtained with a prosthesis. The new models of resurfacing implants give higher amplitudes than hinged silicone implants, but we do not yet have the hindsight we have for the latter. For thumb base OA, trapezectomy with or without suspension ligamentoplasty has been confronted in

* Auteur correspondant. Hôpital Saint-Antoine, 184, rue du faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France.
Adresse e-mail : acourties@yahoo.fr (A. Courties).

<https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2020.12.006>

1878-6227/© 2021 Société Française de Rhumatologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

recent years with severe competition from trapeziometacarpal prostheses, which allow faster functional recovery despite a higher complication rate and a long-term survival that is still poorly known. In total, surgical decision-making is based on multiple factors: functional demand of the patient, stability of the osteoarthritic joint, radiographic anatomical parameters.

© 2021 Société Française de Rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

L'arthrose digitale est l'une des principales localisations d'arthroses. Elle se traduit cliniquement de manière hétérogène allant de la rhizarthrose isolée à une atteinte érosive ou nodulaire inflammatoire et polyarticulaire. Ainsi, de nombreux symptômes sont à évaluer avant de mettre en place un traitement : la douleur, la raideur, les déformations, le handicap fonctionnel et la gêne esthétique qui en résultent. Chaque stratégie thérapeutique dépend de la localisation, de l'intensité des symptômes, des comorbidités du patient et repose évidemment sur une décision partagée avec le patient. La prise en charge est pluridisciplinaire et associe généraliste, rhumatologue, rééducateur et chirurgien orthopédiste. Nous aborderons ici les nouveautés médicales et chirurgicales de ces dernières années dans la prise en charge de l'arthrose digitale. Bien que parfois source de déceptions, des espoirs naissent de certains traitements en cours d'évaluation. Des techniques chirurgicales innovantes ont émergé ces dernières années, telle que les implants de resurfacement des interphalangiennes ou encore la prothèse trapézométacarpienne.

2. Nouveautés médicales

La prise en charge médicale de l'arthrose des mains, comme pour toutes les localisations, repose sur l'association de mesures pharmacologiques et non pharmacologiques. En 2018, l'EULAR a publié une mise à jour de ses recommandations de prise en charge (Tableau 1) [1]. Après 5 principes généraux sur la prise en charge de ces patients, 10 recommandations ont été émises. Parmi les mesures non pharmacologiques, on peut ainsi proposer des mesures d'ergonomie (anciennement appelée « protection articulaire »), des exercices et le port d'orthèses pour améliorer la douleur, et dans une moindre mesure la fonction, au cours de la rhizarthrose. Le type d'orthèse n'est cependant pas précisé et son efficacité est évidente après un port prolongé d'au moins 3 mois. Concernant la prise en charge pharmacologique, les AINS topiques y figurent comme traitement de 1^{re} intention, en raison de leur efficacité et de leur meilleur profil de tolérance, suivis de traitement antalgique simple et des AINS per os. La chondroïtine sulfate peut être proposée, bien qu'elle ne soit plus remboursée, puisqu'une étude bien conduite avait démontré sa supériorité au placebo à la dose quotidienne de 800 mg (NCT00291499) [2]. Il ne faut pas pour autant pas en attendre un effet structural. Les traitements infiltratifs par glucocorticoïdes ne sont plus recommandés dans la rhizarthrose et restent à considérer en cas d'arthrose des interphalangiennes inflammatoires avec synovite. Bien qu'aucun glucocorticoïde ne soit précisé dans les recommandations, elle repose sur une étude ayant démontré la supériorité des injections d'hexacétone de triamcinolone (NCT02102620) par rapport au placebo [3]. Enfin, un suivi doit être établi au long cours et la chirurgie doit être proposée aux patients en échec d'un traitement médical bien conduit. Les recommandations américaines parues cette année reprennent globalement les mêmes principes à la seule différence qu'ils considèrent plutôt la prise d'AINS per os que topiques au vu de considération pratique (lavages de mains fréquents) et d'un niveau de preuve plus faible pour les AINS topiques [4].

Pour la première fois apparaissent dans ces recommandations américaines et européennes, la notion de traitements de fonds conventionnels synthétiques ou biologiques stipulant bien, qu'à ce jour, aucun de ces traitements ne doit être prescrit en cas d'arthrose digitale. En effet, ces dernières années ont vu naître de nombreux essais de traitements, régulièrement utilisés dans la polyarthrite rhumatoïde, par analogie dans l'arthrose digitale et notamment dans sa forme érosive polyarticulaire. Nous aborderons donc les essais récents ou en développement pharmacologiques et non pharmacologiques dans l'arthrose digitale.

2.1. Traitements pharmacologiques

2.1.1. Anti-inflammatoires

Parmi les molécules à visée anti-inflammatoire, deux ont été récemment testées : la prednisolone et la colchicine. Tout d'abord l'étude HOPE, a évalué l'intérêt de 10 mg de prednisolone pendant 6 semaines sur les symptômes d'arthrose digitale avec synovite et s'étant aggravés dans les 48 h suivant l'arrêt d'un traitement par AINS [5]. Les auteurs ont montré que la prise de 10 mg de prednisolone était supérieure au placebo sur la douleur à 6 semaines. Ils n'ont pas retrouvé de différence de tolérance dans une population avec un indice de masse corporelle moyen d'environ 27 kg/m² et dont on ignore la prévalence du diabète et de l'hypertension. Une décroissance rapide de prednisolone avait lieu après six semaines (5 mg pendant 7 jours puis 2,5 mg puis arrêt) et l'effet antalgique de la prednisolone n'était plus visible entre les deux groupes à 14 semaines. Il s'agit donc d'un traitement suspensif possible dans les formes d'arthrose inflammatoire si les comorbidités du patient le permettent. On rappellera que le même type d'étude avait été fait en 2012 avec 5 mg de prednisolone retrouvant des résultats négatifs [6].

De la même manière, la colchicine, après un échec démontré dans la gonarthrose, a été étudiée dans l'arthrose digitale. Ce travail présenté à l'EULAR 2020, a comparé la prise de colchicine au placebo chez 58 patients avec arthrose digitale. Bien que les effectifs soient faibles, aucune efficacité de la colchicine à la dose de 1 mg/j pendant 12 semaines n'a été démontrée par rapport au placebo [7].

2.1.2. Traitements conventionnels synthétiques (csDMARDs)

Le méthotrexate a aussi fait l'objet d'une étude récente dans l'arthrose des mains [8]. Cette fois les 64 patients inclus avaient une atteinte érosive, forme particulièrement sévère, et recevaient 10 mg de méthotrexate hebdomadaire ou un placebo (NCT01068405). Après 3 mois, les auteurs n'ont pas constaté de différence entre les deux traitements. D'autres essais vont débuter très prochainement et notamment un essai norvégien MERINO (NCT04579848) qui déterminera l'efficacité de 15 mg/semaine pendant 15 jours puis 20 mg/semaine de méthotrexate per os pendant 6 mois dans l'arthrose digitale érosive par rapport au placebo. Dans la même idée, l'hydroxychloroquine a été évaluée à la dose de 200 ou de 400 mg/j selon le poids du patient. Là encore, la prise d'hydroxychloroquine n'a pas montré d'efficacité supérieure à celle du placebo après 24 semaines de traitement dans deux études portant sur 196 et 248 patients avec arthrose digitale symptomatique (NCT01148043, et ISRCTN91859104) [9,10] et après 52 semaines

Tableau 1
Recommandations européennes de prise en charge de l'arthrose digitale.

Principes généraux	
L'objectif principal de la prise en charge de l'arthrose digitale (AD) est de contrôler les symptômes et d'optimiser la fonction afin d'améliorer l'activité, la participation et la qualité de vie	
Tous les patients doivent recevoir une information sur la nature, l'évolution de la maladie, ainsi que des conseils d'autogestion/auto éducation et sur les options thérapeutiques disponibles	
La prise en charge de l'AD est individualisée prenant en compte la localisation de l'arthrose digitale, sa sévérité et les comorbidités du patient	
La prise en charge doit être basée sur une décision partagée entre le patient et le professionnel de santé	
La prise en charge optimale requière habituellement une approche multidisciplinaire. En plus des modalités non pharmacologiques, les options pharmacologiques et chirurgicales doivent être considérées	
Recommandations	
Éducation	L'éducation et la formation aux principes ergonomiques, le rythme de l'activité et l'utilisation d'appareils et accessoires fonctionnels doivent être proposés à chaque patient
Exercices	Les exercices pour améliorer la fonction et la force musculaire ainsi que pour réduire la douleur doivent être recommandés à chaque patient
Orthèses	Les orthèses doivent être considérées pour soulager les symptômes chez les patients présentant une arthrose de la base du pouce. L'utilisation à long terme est préconisée
Topiques	Les traitements topiques sont préférés aux traitements systémiques pour des raisons de tolérance. Les AINS topiques sont le traitement pharmacologique topique de premier choix
Antalgiques	Les analgésiques oraux, notamment les AINS doivent être considérés pour une durée limitée pour soulager les symptômes
Anti-arthrosique d'action lente	La chondroïtine sulfate peut être utilisée chez les patients avec une AD pour soulager la douleur et améliorer la fonction
Intra-articulaire	Les injections intra-articulaires de glucocorticoïdes ne doivent généralement pas être utilisées dans l'AD, mais peuvent être considérées chez les patients avec IP douloureuses
DMARD	Les patients avec une AD ne doivent pas être traités avec un DMARD synthétique ou biologique
Chirurgie	La chirurgie doit être considérée pour les patients avec des anomalies structurales quand les autres modalités n'ont pas été suffisamment efficaces pour soulager les symptômes. La trapéziectomie doit être considérée chez les patients avec une arthrose de la base du pouce et l'arthrodèse ou l'arthroplastie chez les patients avec une arthrose des IP
Suivi	Un suivi à long terme des patients doit être adapté aux besoins individuels du patient

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdiens ; AD : arthrose digitale ; DMARD : traitement de fond conventionnel ; IP : interphalangienne.

chez des patients avec arthrose digitale érosive (ISRCTN46445413) [11]. Enfin, l'apremilast, inhibiteur de la phosphodiésterase 4 pris à la dose de 40 mg/j pendant 85 jours n'est pas supérieur au placebo pour la prise en charge symptomatique de l'arthrose digitale érosive (NCT01068405) [12].

2.1.3. Traitements conventionnels biologiques (bDMARDs)

De nombreux traitements biologiques ont été essayés ces dernières années dans l'arthrose. Au départ l'échec des premiers, principalement dans la gonarthrose, était attribué à un problème de sélection des patients qui ne présentaient alors pas forcément de poussée inflammatoire de leur maladie à l'inclusion. Force est de constater quelques années plus tard que, l'inhibition des cytokines n'est peut-être pas la bonne voie thérapeutique dans l'arthrose.

Avec le recul, beaucoup de ces molécules sont sources de déception. Ainsi, l'adalimumab a été l'objet de trois études négatives dont deux dans l'arthrose digitale érosive et inflammatoire. De même, l'étanercept n'est pas supérieur au placebo après 24 semaines dans l'arthrose digitale érosive [13].

Après avoir démontré une efficacité des anticorps (Ac) anti-IL-6 récepteur (IL-6R) sur l'arthrose post-traumatique chez la souris [14], l'essai français coordonné par Richette et al., essai randomisé contrôlé, a été mis en place pour étudier l'efficacité de 2 perfusions de tocilizumab (Ac anti-IL-6R) dans l'arthrose digitale symptomatique en échec des AINS (NCT02477059). Aucune différence ne fut observée aux semaines 4, 6, 8 ou 12 par rapport au placebo [15]. Enfin, beaucoup d'espoirs reposaient sur les biomédicaments anti-interleukine 1 (IL-1) puisque de nombreuses données expérimentales démontrent sur le rôle de l'IL-1 dans la physiopathologie de l'arthrose. Une nouvelle molécule a été mise au point évaluée dans l'arthrose digitale érosive : le lutikizumab, un Ac anti-IL-1-alpha et bêta. Après 16 semaines de traitement et malgré un blocage adéquat de l'IL-1, le lutikizumab n'a pas amélioré la douleur par rapport au placebo (NCT02384538) [16].

2.1.4. Traitements infiltratifs

L'intérêt des infiltrations dans la rhizarthrose n'est pas aussi clair qu'il n'y paraît. Les dernières recommandations EULAR ont mis en évidence que le niveau de preuve des infiltrations de glucocorticoïdes dans la rhizarthrose est plutôt en faveur d'une absence d'effet bien qu'il repose sur peu d'études. L'intérêt de l'infiltration en elle-même et du produit à infiltrer demeure encore équivoque dans la rhizarthrose. Deux essais français sont en cours dans la rhizarthrose : l'essai RHIBOT évaluant l'injection de toxine botulique par rapport au placebo (NCT02384538) et l'essai RHIZART comparant l'injection de corticoïdes seuls versus corticoïdes et acide hyaluronique (NCT02384538) [17]. À l'inverse, une étude randomisée positive dans l'arthrose des interphalangiennes plaide en faveur d'un effet antalgique de l'injection de glucocorticoïdes (hexacétonide de triamcinolone) en cas d'arthrose symptomatique et inflammatoire sans effet démontré sur la fonction [3].

2.2. Traitements non pharmacologiques

2.2.1. Exercices et orthèses

Il y a eu bien moins d'essais récents évaluant les mesures non pharmacologiques dans l'arthrose digitale. Celles ayant démontré leur efficacité dans l'arthrose digitale sont l'éducation avec la formation aux principes ergonomiques, les exercices et le port d'orthèse pour la rhizarthrose. En effet, une revue systématique de la littérature Cochrane a montré que la réalisation d'exercices utilisant les mains est efficace sur la douleur, la fonction, la raideur articulaire et sur la force de préhension. De plus, elle induit très peu d'effets indésirables [18]. Il n'y a pas de recommandation précise sur le type et la fréquence de ces exercices puisque les études sont très hétérogènes. Les effets bénéfiques ne se maintiennent pas à l'arrêt des exercices, ils doivent donc être recommandés au long cours. Concernant les orthèses, l'efficacité est démontrée pour la rhizarthrose depuis longtemps et il doit être préféré une orthèse faite sur mesure selon les recommandations EULAR [1]. Le port d'orthèse pour soulager l'arthrose des interphalangiennes

a été très peu évalué. Une récente étude démontre que le port nocturne d'orthèse aux IP pourrait avoir un effet symptomatique [19]. Il s'agit cependant d'étude sans aveugle où l'effet placebo est toujours difficile à distinguer de l'effet propre de l'orthèse. D'autres études sont nécessaires pour pouvoir confirmer ces données.

2.2.2. Dispositif : stimulation du nerf vague

Concernant les modalités non pharmacologiques, une nouvelle approche a vu le jour et sera bientôt évaluée dans l'arthrose digitale érosive et inflammatoire. Il s'agit de la stimulation auriculaire transcutanée du nerf vague. La stimulation du nerf vague, au-delà de ses fonctions végétatives parasympathiques, a des effets anti-inflammatoires et antalgiques démontrés dans des maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde ou douleurs chroniques comme dans la migraine ou la fibromyalgie [20–22]. Elle n'a, jusqu'alors, jamais été évaluée dans l'arthrose, notamment dans sa forme érosive, inflammatoire et polyarticulaire. La stimulation transcutanée du nerf vague a pour avantage d'être non invasive et se fait par l'application d'une électrode reliée à un TENS sur la cymba conchae au niveau de l'oreille, zone innervée par la branche ascendante du nerf vague. Une étude pilote en ouvert menée sur 18 patients, stimulés 1 h/j pendant 1 mois, avec une arthrose érosive symptomatique et érosive a permis de montrer que le dispositif était très bien toléré [23]. De plus, un effet antalgique et anti-inflammatoire a été observé chez la plupart des patients traités. C'est ainsi que l'essai multicentrique français randomisé contrôlé contre stimulation factice ESTIVAL (NCT04520516) va débuter en décembre 2020, dans l'arthrose digitale érosive, inflammatoire (avec synovite) et symptomatique.

3. Nouveautés chirurgicales

Les patients souffrant d'arthrose de la main ont généralement de multiples articulations atteintes, hormis la rhizarthrose, qui peut être isolée. Il n'est pas question de toutes les opérer, mais de proposer un traitement à la carte en fonction de l'efficacité du traitement médical et de l'importance de la gêne fonctionnelle de chaque articulation. Le parallélisme radioclinique est modeste. Le plus souvent les patients sont capables d'identifier la ou les articulations les plus douloureuses. La difficulté est également de différencier une gêne purement esthétique d'une gêne liée à la douleur et la raideur. Le taux de complications chirurgicales n'est pas nul, et la balance bénéfice-risque doit être envisagée pour chaque demande. Tous les gestes chirurgicaux, dénervation exceptée, améliorent l'esthétique de la main en plus de réduire les symptômes, mais il est difficile de proposer une chirurgie à visée purement esthétique chez un patient peu algique dont les mobilités sont conservées. Les objectifs de la chirurgie sont de réduire, voire supprimer la douleur, tout en améliorant la fonction de la main. Une autorééducation bien menée suffit généralement dans les suites de ces interventions, mais une rééducation effectuée par un kinésithérapeute spécialisé dans la main peut être d'un appoint intéressant lorsqu'il y a eu une immobilisation ou pour récupérer passivement les derniers degrés de mobilité.

3.1. Arthrose de l'articulation interphalangienne distale (IPD)

3.1.1. Chirurgie conservatrice

À l'instar d'autres articulations, certains auteurs ont proposé de limiter le geste chirurgical à un émondage des ostéophytes dorsaux sur la tête de la deuxième phalange (P2) et la base de la troisième (P3), en prenant garde à ne pas léser la bandelette terminale de l'appareil extenseur. Les rares séries publiées, dont le recul est relativement court, rapportent une diminution intéressante du niveau de douleur et une amélioration des amplitudes articulaires sans récurrence des ostéophytes [24].

De nombreux patients consultent pour un kyste mucoïde, développé à la face dorsale de l'IPD, qui peut comprimer la matrice unguéale et engendrer une déformation en gouttière de la tablette unguéale. Ces kystes peuvent être très superficiels ; leur ouverture met en contact le milieu extérieur et l'articulation, au risque d'infecter celle-ci. Lorsque le revêtement cutané au-dessus du kyste est fin, la plupart des chirurgiens la résèquent et couvrent la zone articulaire ainsi exposée au moyen d'un lambeau local. L'équipe de Tours a cependant récemment montré qu'il était possible de conserver la peau à l'aplomb du kyste, sans risque de nécrose secondaire [25]. Le taux de récurrence de ces kystes opérés est inférieur à 5%.

3.1.2. Arthrode de l'IPD

L'arthrode reste la solution de choix pour une IPD douloureuse, déformée et raide. Il existe des prothèses IPD en silicone, mais elles présentent des inconvénients non négligeables (taux de reprises chirurgicales, et aspect esthétique) au prix d'un bénéfice théorique de conservation de la mobilité décevant en pratique [26].

L'arthrode comprend un premier temps d'abord articulaire dorsal, avec résection des ostéophytes et avivement des surfaces articulaires, puis la mise en place d'un matériel pour stabiliser les phalanges pendant la durée de la consolidation osseuse. Contrairement aux fixations par broches ou aux cerclages, dont la stabilité requiert une protection par attelle en postopératoire et qui nécessitent le retrait du matériel à distance, de nouveaux procédés de fixation permettent actuellement au patient de mobiliser immédiatement le rayon opéré sans craindre un risque accru de pseudarthrose (échec de la fusion osseuse). Ainsi il existe de multiples modèles de vis en compression, introduites par l'extrémité de P3 au moyen d'une petite incision. Ces vis fixent les phalanges en recititude, tandis que d'autres implants tel des agrafes à mémoire de forme autorisent une fixation en légère flexion [27]. Plusieurs équipes ont proposé de s'abstenir de l'étape avivement articulaire préalable au vissage percutané en compression. Les taux de fusion obtenus semblent inférieurs à la technique conventionnelle, qui reste la règle, hormis chez les patients présentant une arthropathie évoluée [28].

3.2. Arthrose de l'articulation interphalangienne proximale (IPP)

L'arthrose IPP est le plus souvent très invalidante, car la perte de mobilité qu'elle engendre limite les possibilités de pince latérale et de prise palmodigitale. Le traitement chirurgical idéal comprend la conservation des mobilités dans un secteur fonctionnel, la relaxation du doigt si nécessaire et la suppression de la douleur.

3.2.1. Dénervation de l'IPP

Cette technique a été décrite depuis des années, mais reste sous-employée en dépit de résultats prometteurs. Elle consiste en une section des branches nerveuses destinées à l'IPP, issues des nerfs collatéraux digitaux ainsi que des branches sensitives dorsales des nerfs radial et ulnaire respectivement pour l'index et le cinquième doigt. En pratique le chirurgien sépare de manière circonférentielle les pédicules vasculonerveux avec le plan sous-cutané du squelette et ses éléments tendineux et capsuloligamentaires (Fig. 1). Les avantages de cette intervention sont l'absence de conséquences néfastes sur la mobilité ou la force du patient, l'absence d'immobilisation postopératoire, le peu de complications (certains patients ressentent des paresthésies pendant plusieurs semaines), et la possibilité de proposer en second lieu au patient une technique non conservatrice en cas d'échec [29]. Les résultats sont satisfaisants sur la douleur : celle-ci était diminuée de 88 % chez 85 % des patients dans la série de Foucher et al. ayant évalué à 5 ans 32 patients ayant eu une dénervation d'IPP [30]. L'indication idéale est une articulation douloureuse, mais encore mobile et axée [31]. Il

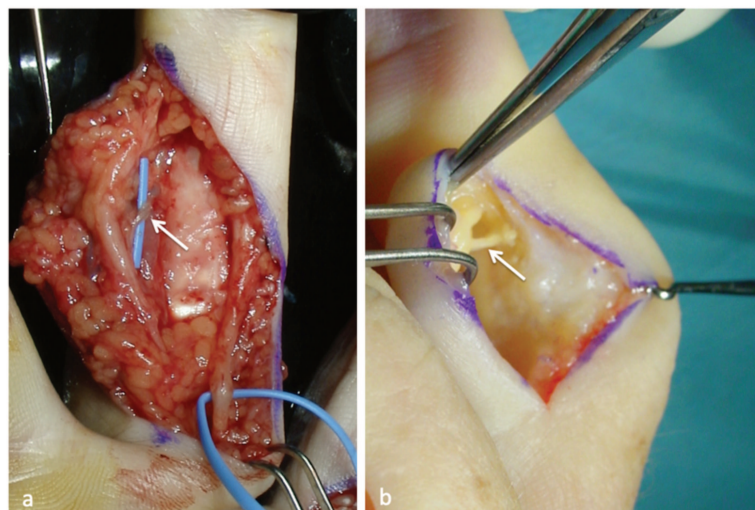


Fig. 1. Vues peropératoires de deux patients opérés d'une dénervation de l'articulation interphalangienne proximale, par voie antérieure (a) ou latérodigitale (b). Les nerfs collatéraux digitaux sont identifiés, et les branches à destinée articulaires sont réséquées (flèche blanche). Photos de Michel Chammas, Montpellier.

est probable que cette technique se répande, car elle est particulièrement intéressante chez les patients dont la mobilité est conservée donc aux stades débutants.

3.2.2. Prothèses IPP

Historiquement, l'implant en silicone de Swanson est le premier à être posé sur l'IPP et il reste actuellement le plus utilisé. Il s'agit d'un implant d'interposition, ce qui signifie qu'il ne s'ostéointègre pas, à charnière. Les résultats au long terme sont bien connus : les mobilités sont réduites, avec un arc de mobilité de 30 à 50°, et finalement peu de gain d'amplitudes postopératoires, tandis que la force augmente très peu [32]. Il arrive régulièrement que la charnière se brise, sans entraîner de gêne ressentie et donc ne nécessiter de reprise.

Plus récemment ont été développés des implants bipolaires dits de surfacage, avec deux pièces prothétiques sans charnière. Il en existe de nombreux modèles, dont les matériaux et le dessin varient. Certains implants ont des tiges métalliques revêtues d'hydroxyapatite vouées à s'intégrer à l'os, en titane ou en chrome-cobalt, avec parfois une partie articulaire en polyéthylène (matériau plastique). D'autres sont couvertes de pyrocarbone et se comportent comme des implants d'interposition. Comparativement à l'implant en silicone, les implants bipolaires nécessitent moins de résection osseuse et tendent à se rapprocher davantage de l'anatomie normale. Cependant, leur stabilité dans le plan frontal nécessite l'intégrité préopératoire et le respect peropératoire des ligaments collatéraux, ainsi que de la bandelette médiane de l'appareil extenseur. Les suites opératoires comportent généralement une immobilisation brève, voire absente ainsi que le port d'une orthèse de protection nocturne quelques semaines. Il semble que l'arc de mobilité postopératoire soit corrélé à celui préopératoire, ce qui suggère de ne pas attendre l'enraidissement complet d'une articulation pour proposer une arthroplastie, à partir du moment où le traitement médical a échoué [33].

Les principales complications de ces implants sont le descellement (ou la perte d'ostéointégration selon les modèles),

la migration et la déformation en col-de-cygne. Dans sa série d'implants revêtus de pyrocarbone, Selig et al. ont rapporté 23 % de reprises chirurgicales dans les deux premières années suivant la pose [34]. La survie des implants était de 9 ans en moyenne. À ce délai, en dépit d'une migration systématique de l'implant, le niveau de douleur était faible avec un arc de mobilité d'environ 50°. Les implants dont les tiges sont fixées à l'os donnent lieu probablement à moins de migration d'implants, avec de bons résultats en termes d'amplitudes articulaires (Fig. 2) (Annexe A, Vidéo S1 ; voir le matériel complémentaire accompagnant la version en ligne de cet article). Des ossifications péri-articulaires peuvent également être observées, sans nécessiter de reprise chirurgicale en l'absence d'effet came (butée) [33].

Le taux de complications et de réopérations ne diffère pas significativement entre les implants en silicone, en métal-poléthylène ou en pyrocarbone [35].

En dépit de durées de survie de plus en plus intéressantes, les implants d'IPP sont à réserver à des sujets dont la demande fonctionnelle est restreinte, au risque de faire face à un descellement prothétique avec une perte de substance osseuse inévitable, dont la reprise chirurgicale sera une arthrodeuse raccourcissante beaucoup moins fonctionnelle. Ainsi, Wagner a observé que les patients opérés de moins de 60 ans avaient un risque accru de révision chirurgicale, particulièrement dans un contexte d'arthrose post-traumatique [36]. En raison du risque de descellement précoce, les contre-indications classiques des prothèses sont la clinodactylie et l'atteinte de l'index, car ce doigt subit d'importantes contraintes en valgus imposées par le pouce lors de la pince latérale.

3.2.3. Arthrodeuse IPP

Une IPP arthrodeuse est généralement mal tolérée : cette intervention reste la solution de dernier recours. Elle doit être réalisée en position de fonction, c'est-à-dire, à un degré de flexion croissant de l'index vers le cinquième doigt. Une arthrodeuse peut être cependant proposée en cas d'atteinte de l'index ou d'importante désaxation du doigt.

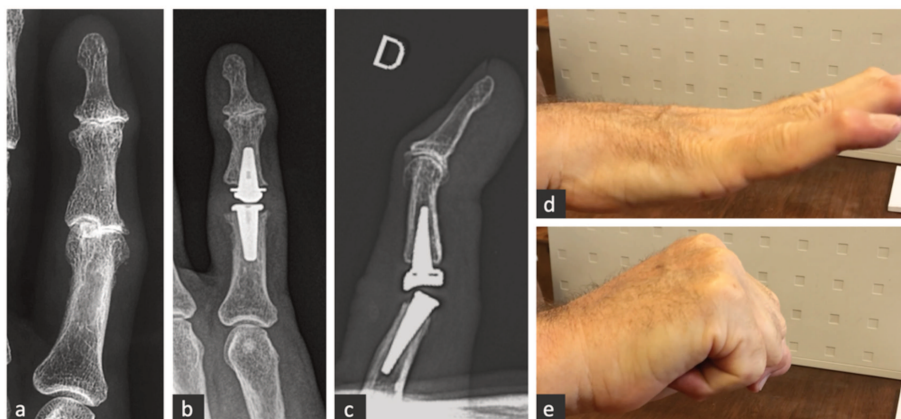


Fig. 2. Radiographies préopératoires (a) et postopératoires de face (b) et de profil (c) du cinquième doigt droit d'un patient droitier de 65 ans souffrant d'une arthrose multidigitale invalidante. Mobilités en extension (d) et flexion (e) du doigt à 7 mois de recul. L'implant est une prothèse totale modulaire comportant des tiges revêtues d'hydroxyapatite ancrées dans les phalanges et une pièce remplaçant la tête de P1 en polyéthylène Tactys® (Stryker). Dès le troisième jour postopératoire, les mobilités de l'IPP étaient de 0° d'extension et 90° de flexion. On observe une tendance au recurvatum de l'IPP, justifiant une surveillance clinique (Voir la vidéo S1 du résultat fonctionnel à 9 mois).

3.3. Rhizarthrose

Les éléments cliniques et radiographiques entrant dans la décision thérapeutique pour le chirurgien sont l'âge physiologique et le degré d'utilisation de la main, le degré d'arthrose et d'instabilité de l'articulation trapézométacarpienne (TM), la présence d'une arthrose associée symptomatique de l'articulation scapho-trapézo-trapézoïdienne, et la hauteur résiduelle du trapèze. Il est important de rechercher également une déformation adaptative de la colonne du pouce dite « pouce en M » ou pouce adductus qui comprend la rétraction de la première commissure, le recurvatum de l'articulation métacarpophalangienne (MCP) du pouce — parfois source de douleurs —, et le flessum de l'interphalangienne du pouce (IP).

3.3.1. Traitements conservateurs

Il a sa place chez les sujets jeunes, dont l'arthrose est généralement la conséquence d'une instabilité de la TM, et d'une anomalie anatomique. Celle-ci se recherche sur des radiographies de face et de profil de la colonne du pouce selon Kapandji. Un angle de « dévers » (entre l'axe du deuxième métacarpien et la tangente à la surface articulaire distale du trapèze) supérieur à 135° signe une dysplasie trapézienne pouvant justifier une ostéotomie de correction (Fig. 3).

3.3.2. Traitements non conservateurs

Ils sont proposés à partir du stade II de la classification d'Eaton et Littler. Le traitement roi de la rhizarthrose est la trapézectomie. Celle-ci est généralement associée à une ligamentoplastie de suspension du premier métacarpien, dont le but est d'éviter le recul de celui-ci et son conflit avec le scaphoïde, mais dont l'utilité reste controversée. En pratique, un tendon local, généralement la moitié de l'abductor pollicis longus ou du flexor carpi radialis laissés insérés en distal, est amarré à un point fixe à la base du deuxième métacarpien. L'excédent de longueur du tendon est utilisé pour confectionner un « anchois » qui en s'interposant dans la loge de trapézectomie est censé empêcher le recul du métacarpien (Fig. 4). Les avantages de cette intervention sont nombreux : résultats au long terme bien connus et taux de complication faible. En effet, le conflit avec le scaphoïde, pour lequel il existe peu de solutions

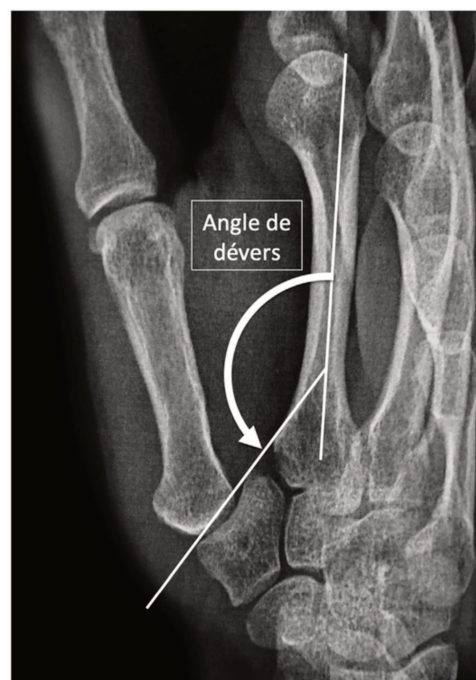


Fig. 3. Radiographie de la colonne du pouce gauche de face permettant de mesurer l'angle de dévers entre l'axe de la diaphyse du deuxième métacarpien et la tangente aux cornes du trapèze. Un angle supérieur à 135° est le signe d'une dysplasie trapézienne susceptible d'entraîner instabilité articulaire et rhizarthrose précoce.

chirurgicales, est rare. Les patients doivent être informés que le délai de récupération est de 6 à 9 mois.

Les premiers implants trapézo-métacarpiens remontent aux années 1970. L'implant en silicone de type Swanson n'est plus que

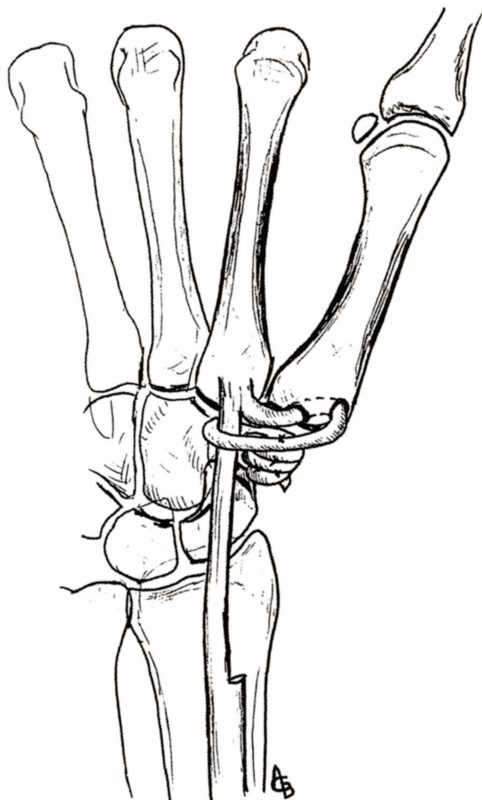


Fig. 4. Technique de ligamentoplastie-suspensoplastie du premier métacarpien utilisant la moitié du tendon flexor carpi radialis, laissé pédiculé en distal, passé dans un tunnel à la base du premier métacarpien, passé autour de la moitié encore insérée sur le deuxième métacarpien puis embobiné sous la forme d'un « anchois » occupant la lige de trapézectomie.

rarement utilisé dans des cas de reprise chirurgicale, en raison de sa fragilité et du risque de siliconite régionale. Par la suite, sont apparues des prothèses totales TM comprenant une cupule dans le trapèze et une tige dans le premier métacarpien solidaire d'un col et d'une tête sphérique, à l'instar des prothèses totales de hanche. Ces implants ont subi de nombreuses modifications : matériau, couple de frottement, dessin des pièces, et continuent à évoluer (Fig. 5). Nous disposons actuellement de données de survie intéressantes pour plusieurs implants (85 % à 10 ans), alors qu'elles étaient médiocres pour certains des premiers modèles [37]. Le principal avantage des prothèses est la brièveté de la convalescence et la rapidité de la récupération fonctionnelle (Annexe A, Vidéo S2). Elle permet de restituer la hauteur de la colonne du pouce, ce qui corrige automatiquement une déformation débutante du pouce [38]. Les principales complications de l'arthroplastie sont la perte de la fixation des pièces par non-ostéointégration ou descellement, l'instabilité, la fracture du trapèze. En cas d'échec d'une prothèse TM, il est possible d'effectuer une reprise par trapézectomie avec des résultats comparables à ceux d'une trapézectomie primaire [39]. Plus récemment ont été développés des implants d'interposition revêtus de pyrocarbone destinés à être placés dans l'espace articulaire TM après avivement des surfaces articulaires [40]. Ces implants libres ont un risque relativement élevé de luxation conduisant à des reprises chirurgicales de sorte qu'ils sont essentiellement posés par l'équipe conceptrice [41].

Au total, les résultats fonctionnels au long terme sont comparables entre trapézectomie et prothèse trapèzométacarpienne [42] (Annexe A, Vidéo S3), mais il faut considérer que les deux techniques ne peuvent être proposées indifféremment à tous les patients. Ainsi, on privilégiera la trapézectomie chez un sujet jeune avec une demande fonctionnelle élevée, en cas d'usure importante du trapèze ou d'arthrose associée de la STT. La prothèse sera plutôt indiquée en cas de début de déformation en M du pouce, chez un sujet à demande fonctionnelle limitée.

Le recurvatum de la MCP du pouce doit être traité simultanément à la rhizarthrose lorsqu'il dépasse une vingtaine de degrés : il existe plusieurs options chirurgicales, du brochage temporaire à l'arthrodèse métacarpo-phalangienne, laquelle contre-indique théoriquement la pose d'une prothèse TM en raison d'un excès de contraintes et donc d'un risque de descellement accéléré.

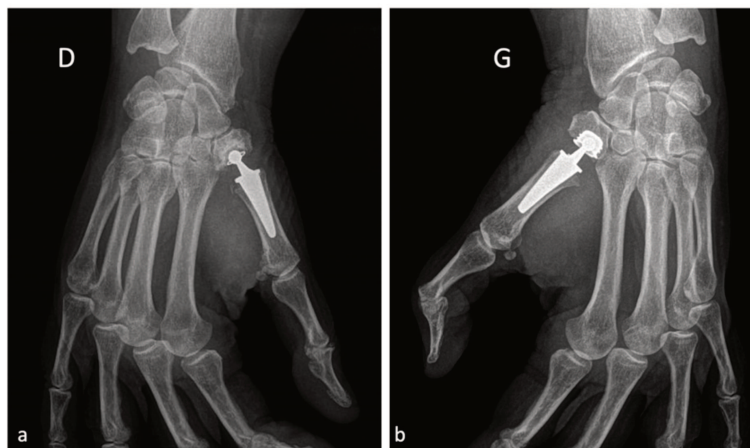


Fig. 5. Radiographies des deux mains montrant à droite deux prothèses trapèzométacarpiennes ISIS® (Tornier), comportant respectivement un implant dont la cupule trapézienne est cimentée à 18 mois de recul (a) et un implant impacté à 9 mois de recul (b) (Voir la vidéo S2 du résultat fonctionnel du côté gauche à 9 mois).

3.4. Arthrose de la MCP

L'arthrose de la MCP du pouce est généralement la conséquence d'une instabilité chronique séquellaire d'une entorse grave. En cas d'échec du traitement médical, on peut proposer une arthrodèse de la MCP en légère flexion, pour peu que les articulations IP du pouce et TM soient saines.

Au niveau des doigts longs, l'arthropathie est plus fréquemment due à un rhumatisme inflammatoire qu'à une arthrose primaire. Une arthrodèse entraînerait une importante gêne fonctionnelle, de sorte que cette solution est à réserver aux situations où une prothèse ne peut être implantée. Les implants en silicone de Swanson donnent de bons résultats à long terme avec une survie de plus de 90 % à 15 ans [43]. Plus récemment ont été développés des implants revêtus de pyrocarbone dont la survie à 10 ans atteignait 88 % dans la série de Dickson et al. [44].

4. Conclusion

S'il faut retenir quelque chose de ces dernières années c'est que l'inhibition cytokinique n'est sans doute pas la bonne piste thérapeutique dans l'arthrose digitale. La corticothérapie à faible dose peut être un recours en cas de poussée inflammatoire poly-articulaire chez un patient ne pouvant recevoir d'AINS, mais ne doit pas constituer une option récurrente au vu des complications induites. Cependant, la recherche française est à l'honneur dans le développement de nouvelles options thérapeutiques avec un essai d'infiltration de toxine botulique et un essai de stimulation transcutanée du nerf vague en cours. En cas d'échec du traitement médical avec un handicap douloureux ou fonctionnel important, il ne faut pas hésiter à envoyer les patients, voire un chirurgien qui dispose de nombreuses options thérapeutiques. Ainsi, en parallèle des interventions bien connues d'arthrodèse de l'IPD ou de trapézectomie, le remplacement prothétique des articulations IPP, MCP et TM permet le plus souvent d'obtenir une articulation indolore et mobile, au prix d'un taux de complications variable selon les modèles. À l'heure actuelle, nous disposons de trop peu d'études de haut niveau de preuve concernant certains de ces matériels et d'un recul souvent court. Ces innovations sont prometteuses, mais nécessiteront des investigations complémentaires avant de valider définitivement leur place dans l'arsenal thérapeutique de l'arthrose des mains.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Supplément en ligne. Matériel complémentaire

Le matériel complémentaire (Vidéos S1–S3) accompagnant la version en ligne de cet article est disponible sur <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2020.12.006>.

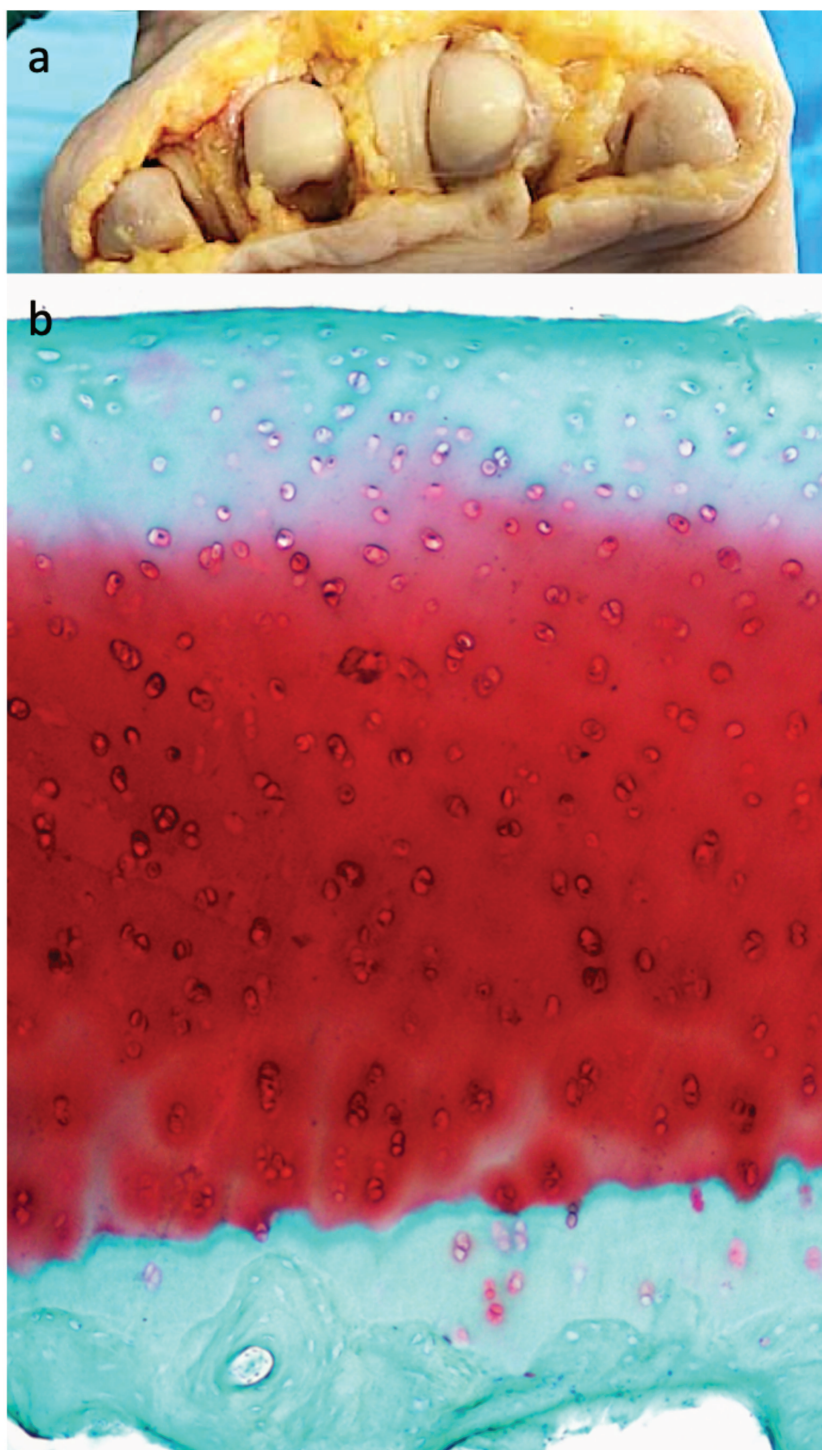
Références

- [1] Kloppenburg M, Kroon FP, Blanco FJ, et al. 2018 update of the EULAR recommendations for the management of hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2019;78:16–24.
- [2] Gabay C, Medinger-Sadowski C, Gascon D, et al. Symptomatic effects of chondroitin 4 and chondroitin 6 sulfate on hand osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial at a single center. *Arthritis Rheum* 2011;63:3383–91.
- [3] Spolidoro Paschoal N, de O, Natour J, et al. Effectiveness of triamcinolone hexacetonide intraarticular injection in interphalangeal joints: a 12-week randomized controlled trial in patients with hand osteoarthritis. *J Rheumatol* 2015;42:1869–77.
- [4] Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Rheumatol* 2020;72:220–33.
- [5] Kroon FPB, Kortekaas MC, Boonen A, et al. Results of a 6-week treatment with 10 mg prednisolone in patients with hand osteoarthritis (HOPE): a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Lancet* 2019;394:1993–2001.
- [6] Wenham CJ, Hensor EMA, Grainger AJ, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of low-dose oral prednisolone for treating painful hand osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:2286–94.
- [7] Davis CR, Ruediger CD, Dyer KA, et al. Colchicine is not effective for reducing osteoarthritic hand pain compared to placebo: a randomized, placebo-controlled trial (COLAH). *Osteoarthritis Cartilage* 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2020.11.002>.
- [8] Ferrero S, Wittoek R, Allado E, et al. Methotrexate in patients with hand erosive osteoarthritis refractory to usual treatments: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [abstract]. *Arthritis Rheumatol* 2019;71. S3149–50.
- [9] Lee W, Ruijgrok L, Boxma-de Klerk B, et al. Efficacy of hydroxychloroquine in hand osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2018;70:1320–5.
- [10] Kingsbury SR, Tharmanathan P, Keding A, et al. Hydroxychloroquine effectiveness in reducing symptoms of hand osteoarthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2018;168:385–95.
- [11] Kedor C, Detert J, Rau R, et al. Op0186 hydroxychloroquine in patients with inflammatory and erosive osteoarthritis of the hands: results of a randomized, double-blind, placebo controlled, multi-centre, investigator-initiated trial (oa Treat). *Ann Rheum Dis* 2020;79:115–6.
- [12] Rech J, Faustini F, Hueber AJ, et al. A PHASE 2, multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, efficacy study of apremilast (CC-10004) in Subjects with erosive hand osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:S972.
- [13] Kloppenburg M, Ramonda R, Bobacz K, et al. Etanercept in patients with inflammatory hand osteoarthritis (EHOA): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2018;77:1757–64.
- [14] Latourte A, Cherifi C, Maillet J, et al. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:748–55.
- [15] Richette P, Latourte A, Sellam J, et al. Efficacy of tocilizumab in patients with hand osteoarthritis: double blind, randomized, placebo-controlled, multicentre trial. *Ann Rheum Dis* 2020. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218547>.
- [16] Kloppenburg M, Peterfy C, Haugen IK, et al. Phase IIa, placebo-controlled, randomised study of lutikizumab, an anti-interleukin-1 α and anti-interleukin-1 β dual variable domain immunoglobulin, in patients with erosive hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2019;78:413–20.
- [17] Cormier G, Le Goff B, Denis A, et al. Corticosteroids injections versus corticosteroids with hyaluronic acid injections in rhizarthrosis: the randomised multicentre RHIZART trial study protocol. *BMJ Open* 2019;9:e022553.
- [18] Østerås N, Kjekshus I, Smedslund G, et al. Exercise for hand osteoarthritis: a cochrane systematic review. *J Rheumatol* 2017;44:1850–8.
- [19] Silva PG, de Carvalho Silva F, da Rocha Corrêa Fernandes A, et al. Effectiveness of nighttime orthoses in controlling pain for women with hand osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Am J Occup Ther* 2020;74 [7403205080p1-7403205080p10].
- [20] Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, et al. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:8284–9.
- [21] Straube A, Ellrich J, Eren O, et al. Treatment of chronic migraine with transcutaneous stimulation of the auricular branch of the vagal nerve (auricular t-VNS): a randomized, monocentric clinical trial. *J Headache Pain* 2015;16:543.
- [22] Lange G, Janal MN, Maniker A, et al. Safety and efficacy of vagus nerve stimulation in fibromyalgia: a phase I/II proof of concept trial. *Pain Med* 2011;12:1406–13.
- [23] Courties A, Deprouw C, Maheu E, et al. Transcutaneous auricular stimulation of the vagus nerve for erosive hand osteoarthritis: an open label pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* 2020;28:S360.
- [24] Lin EA, Papatheodorou LK, Sotereanos DG. Cheilectomy for treatment of symptomatic distal interphalangeal joint osteoarthritis: a review of 78 patients. *J Hand Surg Am* 2017;42:889–93.
- [25] Roulet S, Marteau E, Bacle G, et al. Surgical treatment of mucous cysts by subcutaneous excision and osteophyte resection: results in 68 cases at a mean 6.63 years' follow-up. *Chir Main* 2015;34:197–200.
- [26] Neukom L, Marks M, Hensler S, et al. Silicone arthroplasty versus screw arthrodesis in distal interphalangeal joint osteoarthritis. *J Hand Surg Eur Vol* 2020;45:615–21.
- [27] De Almeida YK, Athlani L, Dap F, et al. Distal interphalangeal joint arthrodesis using the X-Fuse[®] implant: a retrospective study of 54 fingers with 24 months' follow-up. *Hand Surg Rehabil* 2019;38:186–90.
- [28] Renfree KJ. Percutaneous in situ versus open arthrodesis of the distal interphalangeal joint. *J Hand Surg Eur Vol* 2015;40:379–83. <http://dx.doi.org/10.1177/1753193414527387>.
- [29] Gandolfi S, Carloni R, Mouton J, et al. Finger joint denervation in hand osteoarthritis: indications, surgical techniques and outcomes. A systematic review of published cases. *Hand Surg Rehabil* 2020;39:239–50.
- [30] Foucher G, Long Pretz P, Erhard L. Joint denervation, a simple response to complex problems in hand surgery. *Chirurgie* 1998;123:183–8.

- [31] Lorea P, Ezzedine R, Marchesi S. Denervation of the proximal interphalangeal joint: a realistic and simple procedure. *Tech Hand Up Extrem Surg* 2004;8:262–5.
- [32] Takigawa S, Meletiou S, Sauerbier M, et al. Long-term assessment of Swanson implant arthroplasty in the proximal interphalangeal joint of the hand. *J Hand Surg Am* 2004;29:785–95.
- [33] Degeorge B, Athlani L, Dap F, et al. Proximal interphalangeal joint arthroplasty with Tactys®: clinical and radiographic results with a minimum follow-up of 12 months. *Hand Surg Rehabil* 2018;37:218–24.
- [34] Selig HF, Schulz M, Pillukat T, et al. Outcome of proximal interphalangeal joint replacement with pyrocarbon implants: a long-term longitudinal follow-up study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2020;140:1847–57.
- [35] Forster N, Schindele S, Audigé L, et al. Complications, reoperations and revisions after proximal interphalangeal joint arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *J Hand Surg Eur Vol* 2018;43:1066–75.
- [36] Wagner ER, Robinson WA, Houdek MT, et al. Proximal interphalangeal joint arthroplasty in young patients. *J Am Acad Orthop Surg* 2019;27:444–50.
- [37] Dehl M, Chelli M, Lippmann S, et al. Results of 115 Rubis II reverse thumb carpometacarpal joint prostheses with a mean follow-up of 10 years. *J Hand Surg Eur Vol* 2017;42:592–8.
- [38] Degeorge B, Dagneaux L, Andrin J, et al. Do trapeziometacarpal prosthesis provide better metacarpophalangeal stability than trapeziectomy and ligamentoplasty? *Orthop Traumatol Surg Res* 2018;104:1095–100.
- [39] Lenoir H, Erbland A, Lumens D, et al. Trapeziectomy and ligament reconstruction tendon interposition after failed trapeziometacarpal joint replacement. *Hand Surg Rehabil* 2016;35:21–6.
- [40] Bellemère P. Pyrocarbon implants for the hand and wrist. *Hand Surg Rehabil* 2018;37:129–54.
- [41] van Aaken J, Holzer N, Wehrli L, et al. Unacceptable failure of the P12® implant. *J Hand Surg Eur Vol* 2016;41:917–22.
- [42] De Smet L, Vandenberghe L, Degreef I. Long-term outcome of trapeziectomy with ligament reconstruction and tendon interposition (LRTI) versus prosthesis arthroplasty for basal joint osteoarthritis of the thumb. *Acta Orthop Belg* 2013;79:146–9.
- [43] Morrell NT, Weiss A-PC. Silicone metacarpophalangeal arthroplasty for osteoarthritis: long-term results. *J Hand Surg Am* 2018;43:229–33.
- [44] Dickson DR, Badge R, Nuttall D, et al. Pyrocarbon metacarpophalangeal joint arthroplasty in noninflammatory arthritis: minimum 5-year follow-up. *J Hand Surg Am* 2015;40:1956–62.

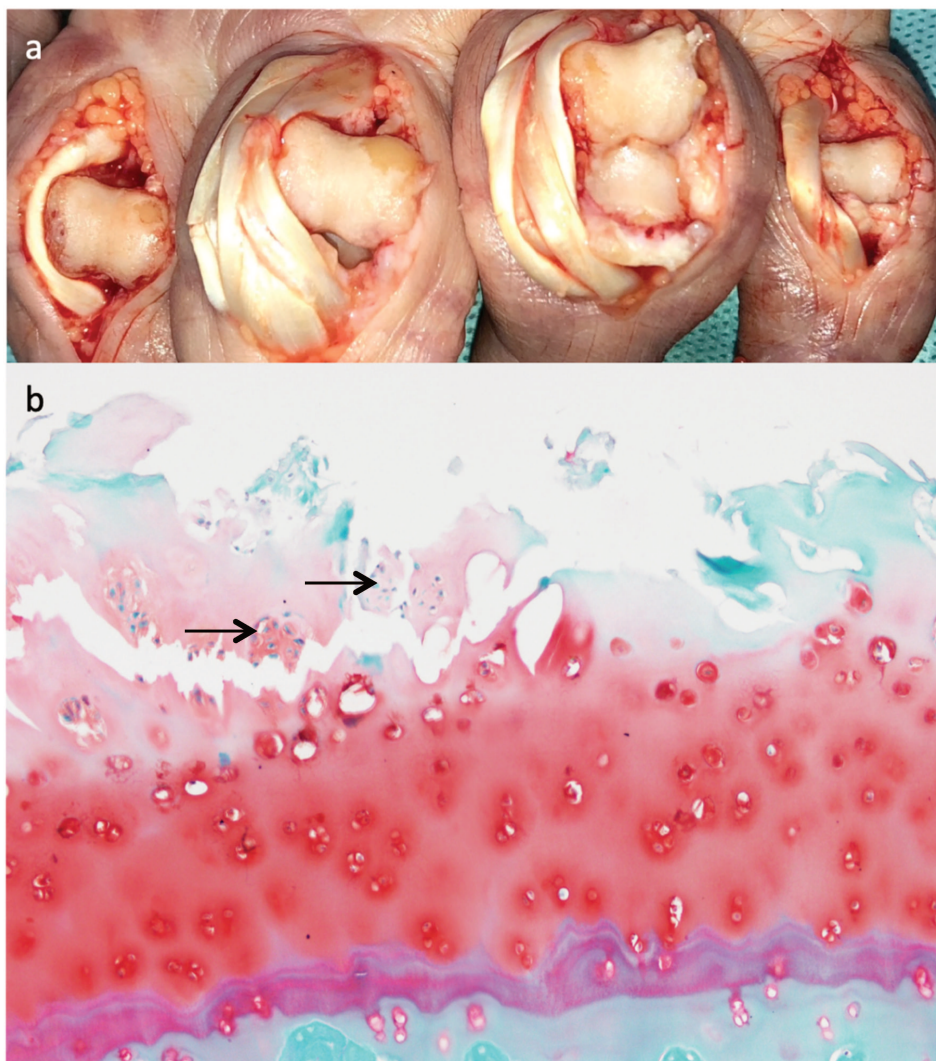
Annexe 2

Cartilage non arthrosique des métacarpo-phalangiennes du sujet 4608 : aspect macroscopique (a) brillant, lisse et uni, et histologique (b)



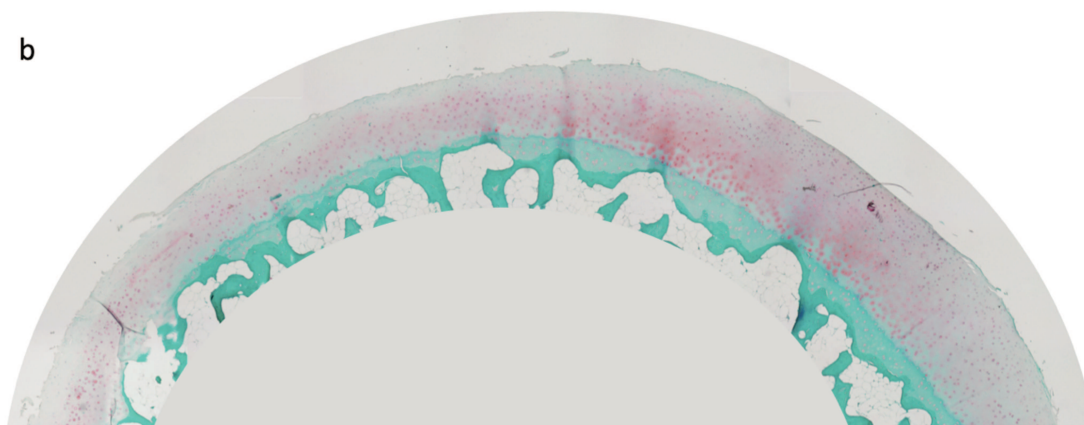
Annexe 3

Cartilage arthrosique des inter-phalangiennes proximales du sujet 4202 : aspect macroscopique (a) avec plages d'ulcérations cartilagineuses exposant l'os sous-chondral, et histologique (b) avec clusters chondrocytaires (flèches), fissures jusqu'à la couche intermédiaire, élargissement de la tide mark.



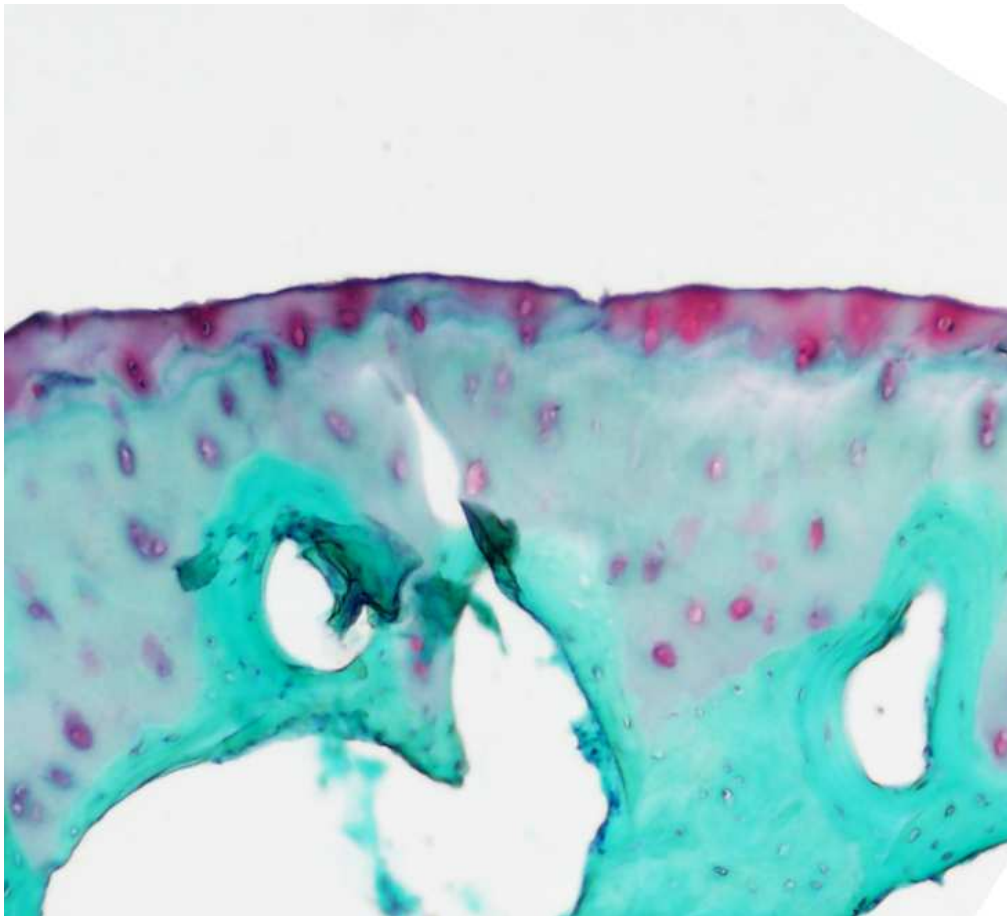
Annexe 4

Cartilage arthrosique des métacarpo-phalangiennes du sujet 4251 : aspect macroscopique (a) dépoli avec érosions superficielles cartilagineuses, et histologique (b) avec érosion de la couche superficielle et perte de coloration de Safranine-O (signant une diminution de la concentration en PG).



Annexe 5

Aspect histologique après prélèvement du cartilage d'une articulation inter-phalangienne proximale (sujet 4306) permettant de vérifier que le matériau de travail comporte bien les 3 couches du cartilage non calcifié, hormis quelques cellules de la couche profonde au plus près de la tide mark.



Annexe 6

Participation à l'article : réalisation des chirurgies chez les souris (destabilisation du ménisque médial, modèle d'arthrose du genou)



AMERICAN COLLEGE
of RHEUMATOLOGY
Empowering Rheumatology Professionals

Arthritis & Rheumatology
Vol. 72, No. 12, December 2020, pp 2072–2082
DOI 10.1002/art.41429
© 2020, American College of Rheumatology

The Role of the Non-Neuronal Cholinergic System in Inflammation and Degradation Processes in Osteoarthritis

Alice Courties,¹  Ariane Do,¹ Sarah Leite,¹ Manon Legris,¹ Laure Sudre,¹ Audrey Pigenet,¹ Juliette Petit,¹ Geoffroy Nourissat,² Adeline Cambon-Binder,¹ Uwe Maskos,³ Francis Berenbaum,¹ and Jérémie Sellam¹

Objective. The non-neuronal cholinergic system represents non-neuronal cells that have the biochemical machinery to synthesize de novo and/or respond to acetylcholine (ACh). We undertook this study to investigate this biochemical machinery in chondrocytes and its involvement in osteoarthritis (OA).

Methods. Expression of the biochemical machinery for ACh metabolism and nicotinic ACh receptors (nAChRs), particularly $\alpha 7$ -nAChR, in human OA and murine chondrocytes was determined by polymerase chain reaction and ligand-binding analyses. We investigated the expression of messenger RNA for the human duplicate $\alpha 7$ -nACh subunit *CHRFAM7A*, which is responsible for truncated $\alpha 7$ -nAChR. We assessed the effect of nAChR on chondrocytes activated by interleukin-1 β (IL-1 β) and the involvement of $\alpha 7$ -nAChR in these processes, using chondrocytes from wild-type (WT) and $\alpha 7$ -deficient *Chrna7*^{-/-} mice. The role of $\alpha 7$ -nAChR was further explored by assessing Osteoarthritis Research Society International (OARSI) histologic scores of cartilage damage in an experimental OA model using medial meniscectomy in WT and *Chrna7*^{-/-} mice.

Results. Human and murine chondrocytes expressed the biochemical partners of the non-neuronal cholinergic system and a functional $\alpha 7$ -nAChR at their cell surface ($n = 5$ experiments with 1 sample each). The expression of *CHRFAM7A* in human OA chondrocytes ($n = 23$ samples) correlated positively with expression of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) ($r = 0.38, P < 0.05$) and MMP-13 ($r = 0.48, P < 0.05$). Nicotine decreased the IL-1 β -induced expression of IL-6 and MMP, in a dose-dependent manner, in WT murine chondrocytes but not in *Chrna7*^{-/-} murine chondrocytes. After medial meniscectomy, *Chrna7*^{-/-} mice ($n = 7$) displayed more severe OA cartilage damage (mean \pm SD OARSI score 4.46 ± 1.09) compared to WT mice ($n = 9$) (mean \pm SD OARSI score 3.05 ± 0.9 ; $P < 0.05$).

Conclusion. The non-neuronal cholinergic system is functionally expressed in chondrocytes. Stimulation of nAChR induces antiinflammatory and anticatabolic activity through $\alpha 7$ -nAChR, but the anticatabolic activity may be mitigated by truncated $\alpha 7$ -nAChR in human chondrocytes. Results of in vivo experiments strongly suggest that $\alpha 7$ -nAChR has a protective role in OA.

INTRODUCTION

While osteoarthritis (OA) is the most common musculoskeletal disease, available treatments still only treat symptoms and are either not highly effective or associated with safety issues. Therefore, there remains an unmet need to develop new therapeutic targets based on a better understanding of OA pathophysiology.

The interplay between the nervous system and inflammation has been mainly described during infection or acute inflammation (1). Consistent with this notion, the autonomic nervous system, particularly the parasympathetic system, has shown immunomodulatory and antiinflammatory properties after stimulation of the vagus nerve (2). The parasympathetic system is composed of cholinergic neurons that release acetylcholine (ACh) as the chemical mediator of neurotransmission. However, ACh is not only a

Supported by the Société Française de Rhumatologie and the AP-HP. Dr. Sudre's work was supported by the Research of Osteoarthritis Diseases Network.

¹Alice Courties, MD, PhD, Ariane Do, MD, Sarah Leite, Manon Legris, Laure Sudre, PhD, Audrey Pigenet, Juliette Petit, MD, Adeline Cambon-Binder, MD, Francis Berenbaum, MD, PhD, Jérémie Sellam, MD, PhD: Sorbonne Université, INSERM UMR5 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France; ²Geoffroy Nourissat, MD, PhD: INSERM UMR5 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Clinique

Maussins, Groupe Ramsay Générale de Santé, Paris, France; ³Uwe Maskos, PhD: Institut Pasteur, Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques, CNRS UMR 3571, Paris, France.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported. Address correspondence to Francis Berenbaum, MD, PhD, Hôpital Saint-Antoine, Service de Rhumatologie, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France. Email: francis.berenbaum@aphp.fr.

Submitted for publication September 24, 2019; accepted in revised form July 1, 2020.

neurotransmitter, as it can be synthesized by non-neuronal cells such as T cells or resident cells (e.g., keratinocytes) (3). These cells can also express the biochemical machinery responsible for the transport and degradation of synthesized ACh and nicotinic and/or muscarinic ACh receptors. This ACh production and responsive system (i.e., ACh receptors) define the non-neuronal cholinergic system.

Antiinflammatory properties of non-neuronal ACh produced by T cells have been demonstrated in sepsis, viral infections, and rheumatoid arthritis (RA), involving activation of the $\alpha 7$ nicotinic ACh receptor ($\alpha 7$ -nAChR) expressed by splenic macrophages (2,4,5). The $\alpha 7$ -nAChR is composed of 5 $\alpha 7$ subunits (CHRNA7). The $\alpha 7$ -nAChR mediates its biologic effect through ionic flux, especially intracellular calcium entrance. However, it has been suggested that ACh could activate direct metabotropic signaling, such as JAK2/STAT3 or MAPK signaling (6). Recently, genetic rearrangement between a duplicate of the 5–10 exons of CHRNA7 and a copy of the FAM7A gene led to a specific human duplicate responsible for the production of a truncated protein, CHR FAM7A (7). This truncated protein may decrease the biologic response to ACh and thus promote inflammation (8,9).

In OA, chondrocytes are activated under different stresses (mechanical, inflammatory, metabolic) and are then responsible for the production of inflammatory and catabolic mediators that induce cartilage degradation. Two recent studies showed that systemic activation of nAChRs by intraperitoneal injection of nicotine may limit OA lesions in a moniodoacetate murine model of OA (10,11). Using a chemical antagonist compound (i.e., methyllycaconitine), researchers found that $\alpha 7$ -nAChR was involved in macrophage and chondrocyte activation. However, these results were not confirmed in another study (12).

Likewise, the role of nAChR in OA remains controversial. Furthermore, it is unknown whether articular chondrocytes employ the non-neuronal cholinergic system to produce ACh and express nAChRs or whether activation of cholinergic receptors influences the chondrocytic production of cytokines and metalloproteases. The objective of the present study was to determine the expression and role of the non-neuronal cholinergic system as it relates to chondrocyte activation and inflammatory processes in OA, especially through the involvement of $\alpha 7$ -nAChR.

MATERIALS AND METHODS

Animals. *Chrna7*^{-/-} mice deficient in $\alpha 7$ (B6.129S7-*Chrna7*^{tm1Bay/J}) and wild-type (WT) C57BL/6 mice were used for in vitro and in vivo experiments (13). Animals were fed ad libitum. The animal facility was granted approval by the French Administration (approval no. C-75-12-01). All experiments were conducted according to the European Communities Council Directive (2010/63/AE) for the care and use of animals for experimental procedures and complied with the regulations of the French Charles Darwin Animal Ethics Committee registered at

the Comité National de Réflexion Ethique sur l'Experimentation Animale (Paris). All procedures were approved by this committee (approval no. 9173-20170330618083277).

Induction of experimental OA. Meniscectomy was performed on 10–12-week-old male *Chrna7*^{-/-} and WT mice as previously described (14,15). Briefly, meniscectomy was performed by a trained surgeon: after cutaneous incision, the medial meniscotibial ligament was sectioned and medial meniscus extrusion and sectioning was performed on the right knee. Mice were euthanized 8 weeks after meniscectomy for analysis. Sham surgery was performed on the right knee of independent male WT and *Chrna7*^{-/-} mice using the same approach, but without any ligament transection or meniscectomy.

Histologic analysis. After euthanization, the right knee joints of mice were removed and fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde (PFA)-phosphate buffered saline (PBS) solution at 4°C. Knee joints were then decalcified in 500 mM EDTA for 4 weeks, and all tissues were embedded in paraffin. Five- μ m sagittal sections were obtained. Knee tissue sections were stained with Safranin O-fast green for Osteoarthritis Research Society International (OARSI) histologic OA scoring at the tibial and femoral condyles (16). For each knee, the final OARSI histologic score was the mean score of cartilage damage in the tibial and femoral condyles obtained from 3 slides, separated by 50 μ m, determined by 2 readers (AC and AP) who were blinded with regard to the genotype. Synovitis scores obtained were the sum of the score of synovial hyperplasia (scale 0–3) and subsynovial inflammation (scale 0–3), as previously published (17). In addition, scoring of osteophyte formation was performed using a 0–3 scale, as previously described (14).

Chondrocyte staining with α -bungarotoxin. Human and WT murine chondrocytes were grown on slides for 5 days and incubated with biotinylated α -bungarotoxin (ThermoFisher Scientific) in the cell culture medium at 4°C overnight at 5 μ g/liter and 20 μ g/liter, respectively. Cells were washed 3 times with PBS and then fixed for 15 minutes at room temperature in 4% PFA. Slides were then incubated at room temperature in streptavidin-horseradish peroxidase solution (Vectastain) using diaminobenzidine substrate (both from Vector) and counterstained with hematoxylin. Semiquantitative scoring of α -bungarotoxin staining (to assess cell surface binding to $\alpha 7$ -nAChR) was performed on 4 different zones of 0.1 mm² on the slides, and the number of stained cells reported relative to the total number of cells.

Primary murine articular chondrocyte culture. Murine chondrocytes were obtained from the femoral head and the knee articular cartilage of 5–6-day-old *Chrna7*^{-/-} and WT mice, as previously described (18). Briefly, after matrix digestion, chondrocytes were seeded at 8×10^3 cells/cm² and expanded

for a week in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1 gm/liter glucose supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 4 mM glutamine, and 10% fetal calf serum (FCS). Each littermate was used for one experiment. Cells were starved for 24 hours before treatment in serum-free medium (DMEM/penicillin/streptomycin/glutamine) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA).

Treatment of primary murine chondrocytes. *Chrna7*^{-/-} and WT murine chondrocytes were stimulated for 24 hours with interleukin-1 β (IL-1 β) (10 ng/ml; PeproTech), with or without pretreatment for 15 minutes with nicotine (Sigma) at 1, 10, or 100 μ M. After 24 hours, cell lysates were collected for messenger RNA (mRNA) isolation, and the medium was collected for protein assessment by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Human OA chondrocyte experiments. Human OA chondrocytes were isolated from the cartilage of patients undergoing joint arthroplasty for OA at Saint-Antoine Hospital or at the Clinique des Maussins-Ramsay (Paris), as previously described (19). Informed consent for the use of tissue was obtained from each patient before surgery. Experiments using human samples were approved by a French Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes, Paris and Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés). Briefly, cartilage was dissected in small pieces, rinsed in saline buffer, and digested with type I and type II collagenases (Roche). Chondrocytes were then seeded in plates at 20×10^3 cells/cm² and expanded in DMEM with 4.5 gm/liter glucose penicillin/streptomycin/glutamine containing 10% FCS. After reaching confluence, chondrocytes were starved for 24 hours in DMEM with 4.5 gm/liter glucose/penicillin/

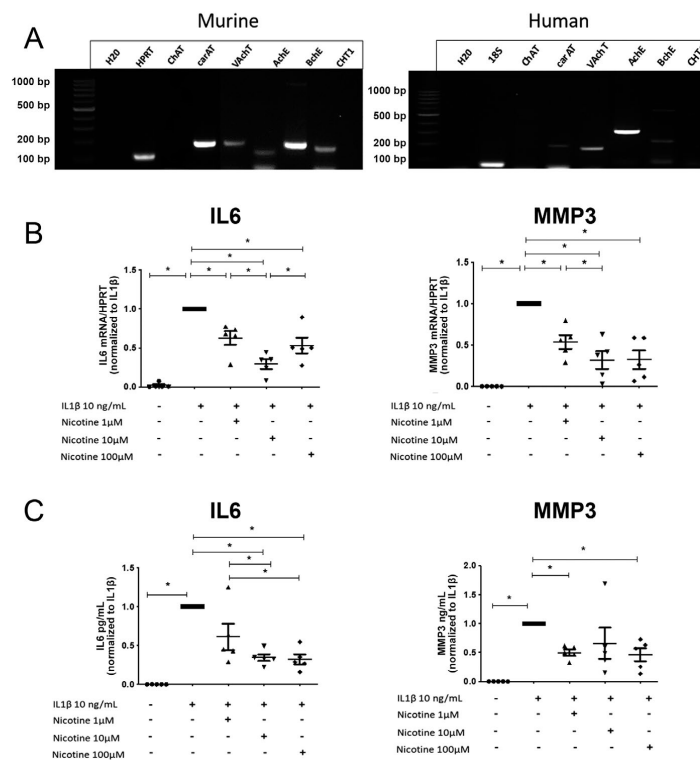


Figure 1. Expression of non-neuronal cholinergic system-involved molecules, in murine and human osteoarthritis (OA) chondrocyte primary cultures, and the in vitro effect of nicotine. **A**, Representative results from reverse transcription-polymerase chain reaction analyses of expression of factors in the cholinergic system. RNase-free water (H₂O) was used as a negative control for each primer. **B** and **C**, Quantitative expression of interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) mRNA (**B**) and protein (**C**) in wild-type (WT) murine primary chondrocyte cultures pretreated with 1, 10, or 100 μ M nicotine for 15 minutes and stimulated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours ($n = 5$ WT samples). Results were normalized to those obtained with IL-1 β stimulation alone. Symbols represent individual samples; bars show the mean \pm SEM. * = $P < 0.05$ by nonparametric test. HPRT = hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; ChAT = choline acetyltransferase; carAT = carnitine acetyltransferase; VACht = vesicular acetylcholine transporter; AChE = acetylcholine esterase; BChE = butyrylcholine esterase; CHT1 = choline transporter 1.

streptomycin/glutamine with 0.1% BSA and then stimulated for 24 hours with IL-1 β (10 ng/ml) (PeproTech) with or without pretreatment with a specific $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist, PNU-282987, at 100 μ M (Abcam) (20). After 24 hours, cell lysates were collected for mRNA analysis.

Calcium assay. Primary murine chondrocyte cultures in 96-well plates were starved after 1 week of culture. Measurements of calcium were performed using a Fluo-4 NW calcium assay kit according to instructions from the manufacturer (Molecular Probes). Briefly, after being rinsed with PBS, the cells were incubated with probenecid in the kit buffer for 30 minutes at 37°C and then 30 minutes at room temperature to block cationic organic transporters. Live analysis was performed for 3.8 minutes using an inverted fluorescence microscope (Olympus IX83), immediately after the addition of an agonist (10 μ M ionomycin [positive control] or 10 μ M nicotine). Fluorescence was then quantified with ImageJ.

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from chondrocytes using an RNeasy kit (Qiagen), and concentrations were determined using a Nanodrop instrument (DeNovix DS-11). Reverse transcription involved 500 ng total RNA with an Omniscript RT kit (Qiagen). Levels of mRNA for IL-6, matrix

metalloproteinase 3 (MMP-3), MMP-9, MMP-13, nAChR subunits ($\alpha 1-7$, $\alpha 9$, and $\beta 1-4$), and the $\alpha 7$ -nAChR human duplicate CHRFAM7A were quantified by quantitative RT-PCR using a Light Cycler LC480 (Roche Diagnostics). Levels of mRNA were normalized to those of murine hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and human 18S. The relative quantitative value is equal to $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where ΔC_t is equal to C_t target minus C_t HPRT or 18S. For analysis of nAChR expression, we normalized the expression levels on a calibrator using a mix of mRNA samples.

RT-PCR was performed to determine the expression of factors in the cholinergic system, i.e., carnitine acetyltransferase (carAT), choline acetyltransferase (ChAT), vesicular ACh transporter (VAChT), ACh esterase (AChE), butyrylcholine esterase (BChE), and choline transporter 1 (CHT-1), in human and murine chondrocytes. For RT-PCR, PCR was performed with a final volume of 20 μ l, containing 10 μ l of Taq polymerase (Qiagen), 0.25 μ M of each forward and reverse primer, and 6 μ l of complementary DNA (cDNA) (see Supplementary Table 1 for murine primers and Supplementary Table 2 for human primers, available on the *Arthritis & Rheumatology* website at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41429/abstract>). For each primer, we determined the best melting temperature and applied a negative control (water) and a positive control (murine and human cDNA from the spinal cord). Amplification was performed for 40 cycles. For

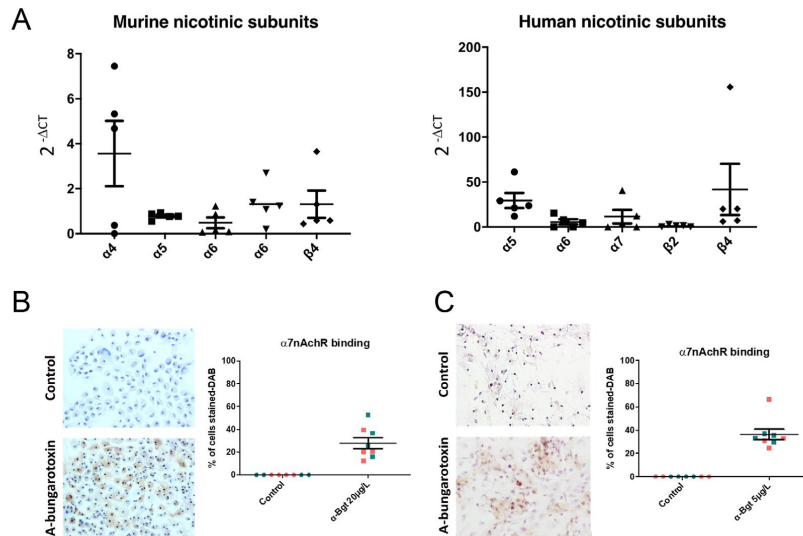


Figure 2. Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) expression by murine and human osteoarthritis (OA) chondrocytes. **A**, Results of quantitative polymerase chain reaction analysis of nAChR subunit expression by murine and human OA chondrocytes. **B** and **C**, Representative microscopic images (left) and semiquantitative scoring of α -bungarotoxin (α -Bgt) cell staining (right) for binding to $\alpha 7$ -nAChR on the surface of murine chondrocytes (**B**) and human OA chondrocytes (**C**) in primary cultures. Cells were incubated with biotinylated α -bungarotoxin at 20 μ g/ml overnight at 4°C and analyzed using a streptavidin and diaminobenzidine substrate (DAB) protocol and with standard microscopy. The control represents the same experiment without α -bungarotoxin incubation. Original magnification $\times 20$. Two independent experiments (represented by red and green symbols in the panels on the right) were performed, and each experiment was analyzed in 4 different areas of 91,000 μ m². Symbols represent individual samples; bars show the mean \pm SEM. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41429/abstract>.

electrophoretic separation, RT-PCR products were subjected to 2% Tris-acetate-EDTA agarose gel electrophoresis.

ELISA. The protein concentrations of IL-6 and MMP-3 released in the supernatant by WT and *Chrna7*^{-/-} murine chondrocytes after stimulation by IL-1 β , with or without nicotine, were measured using a Quantikine ELISA kit (R&D Systems).

Statistical analysis. A nonparametric Wilcoxon's test and a Mann-Whitney test were used for comparisons of matched paired data and unpaired data, respectively. *P* values less than 0.05 were considered significant. Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.

RESULTS

Expression of non-neuronal cholinergic system by murine and human OA chondrocytes.

Human OA and WT murine chondrocytes expressed mRNA for carAT, VAcHT, and AChE in 5 independent experiments using 5 different samples. All murine chondrocytes expressed CHT-1, while none of the human chondrocytes expressed it. Four samples of murine chondrocytes and 2 samples of human chondrocytes expressed BChE, and none of them expressed ChAT. To confirm the specificity of the primers of the non-neuronal cholinergic system, we used cDNA from the spinal cord as a positive control and water as a negative control (Figure 1A).

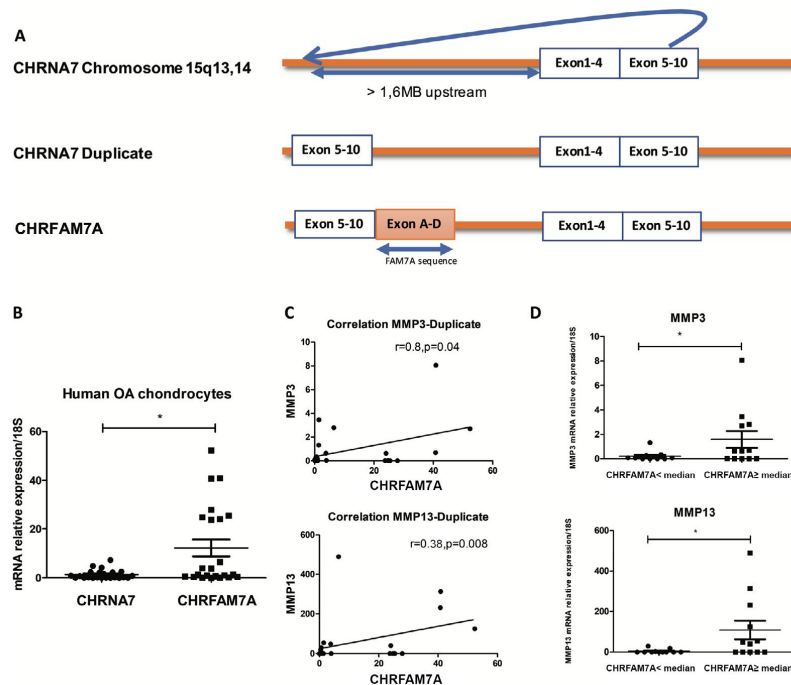


Figure 3. Expression of native CHRNA7 and the specific duplicate CHR FAM7A by human osteoarthritis (OA) chondrocytes. **A**, CHRNA7 is the human gene encoding the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ -nAChR); it is localized on chromosome 15q13,14 and contains 10 exons. It is assumed that during evolution, a partial duplication of exons 5–10 occurred ~1.6 Mb upstream on the same chromosome. Thereafter, 4 completely novel exons (A–D) were rearranged in place of the missing exons 1–4 of human $\alpha 7$ -nAChR, and the 4 new exons of this FAM7 sequence created a new open-reading frame to form a new hybrid gene called CHR FAM7A. Surprisingly, the “new” exons (A–D) were derived in part from an unrelated sequence, itself originating in part from human chromosome 3. Orange represents the sequence amplified by the 2 primers. **B**, Results of quantitative polymerase chain reaction analyses of CHRNA7 (native) and CHR FAM7A (duplicate) expression by human OA chondrocytes ($n = 23$ samples) are shown. **C**, Spearman's correlation between CHR FAM7A duplicate mRNA expression and basal matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) and MMP-13 mRNA expression ($n = 23$ samples) is shown. **D**, MMP-3 and MMP13 mRNA expression by human OA chondrocytes compared to CHR FAM7A mRNA expression by human OA chondrocytes ($n = 23$ samples) is shown. In **B** and **D**, symbols represent individual samples; bars show the mean \pm SEM. * = $P < 0.05$. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41429/abstract>.

Activation of nAChR exerts antiinflammatory and anticatabolic actions on murine and human chondrocytes.

We focused on the role of nicotine, which binds all of the so-called nicotinic receptors, in chondrocyte activation. We incubated WT murine chondrocytes with nicotine and stimulated them with IL-1 β . Nicotine decreased the expression of mRNA for IL-6, in a dose-dependent manner, by a mean \pm SEM 37.3 \pm 8%, 70.8 \pm 6%, and 46.8 \pm 10% in the presence of 1, 10, and 100 μ M nicotine, respectively ($n = 5$; each $P < 0.05$) (Figure 1B). Additionally, nicotine decreased the expression of mRNA for MMP-3, in a dose-dependent manner, by 46.5 \pm 8%, 68.3 \pm 10%, and 67.8 \pm 11% in the presence of 1, 10, and 100 μ M nicotine, respectively (each $P < 0.05$) (Figure 1B) (changes in mRNA for MMP-13 and MMP-9 are shown in Supplementary Figure 1, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41429/abstract>). The anti-inflammatory and anticatabolic effects reached a plateau between the 10 μ M and the 100 μ M nicotine doses. These results were confirmed by ELISA at the protein level, since nicotine decreased the levels of IL-1 β -induced IL-6 in a dose-dependent manner, with decreases of 38.9 \pm 16.9% (P not significant), 65.6 \pm 4% ($P < 0.05$), and 67.7 \pm 6.4% ($P < 0.05$) in the presence of 1, 10, and 100 μ M nicotine, respectively ($n = 5$) (Figure 1C). Nicotine also decreased the levels of MMP-3 secreted by murine chondrocytes after IL-1 β stimulation, with a decrease of 54 \pm 11% in the presence of 100 μ M nicotine ($n = 5$; $P < 0.05$) (Figure 1C).

Expression of several nicotinic receptor subunits, especially the functional $\alpha 7$ -nAChR, by murine and human chondrocytes.

Once we identified antiinflammatory and anticatabolic effects of nicotine on chondrocytes, we next investigated which nAChR subunits were expressed by human and murine chondrocytes. Using quantitative PCR, we found that murine chondrocytes expressed $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, and $\beta 4$ subunits (between 31 and 33 cycles), while human OA chondrocytes expressed $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, and $\beta 4$ subunits (between 30 and 35 cycles) (Figure 2A). As both chondrocytes expressed the CHRNA7 subunit, we evaluated whether murine and human chondrocytes express the functional homopentamer receptor $\alpha 7$ -nAChR as determined using cell staining with α -bungarotoxin, a specific antagonist of functional $\alpha 7$ -nAChR. Murine and human chondrocytes each bound α -bungarotoxin in 2 independent experiments (Figures 2B and C). Using semiquantitative scoring, we found that 27.8 \pm 4.8% of murine chondrocytes and 36.3 \pm 4.5% of human OA chondrocytes expressed functional homopentamer $\alpha 7$ -nAChR (Figures 2B and C).

Expression of both native CHRNA7 and duplicate CHRFA7A, and positive correlation of CHRFA7A with MMP-3 and MMP-13 expression, in human OA chondrocytes.

To better decipher $\alpha 7$ -nAChR expression in human cells, we evaluated the expression of both native CHRNA7 and the

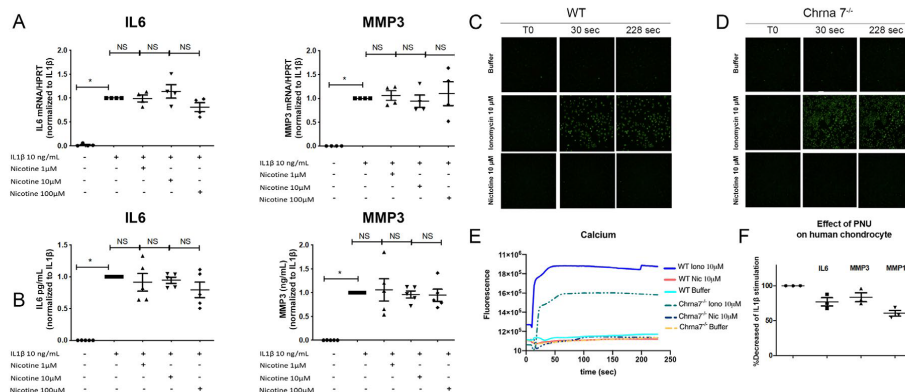


Figure 4. Mediation of the nicotine effect by the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ -nAChR). **A** and **B**, Quantitative expression of IL-6 and MMP-3 mRNA (**A**) and protein (**B**) in $Chrna7^{-/-}$ murine primary chondrocyte cultures pretreated with 1, 10, or 100 μ M nicotine for 15 minutes and stimulated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours ($n = 4$ samples for quantitative polymerase chain reaction [PCR] analysis and $n = 5$ samples for enzyme-linked immunosorbent assay). Results were normalized to those obtained with IL-1 β stimulation alone. * = $P < 0.05$ by nonparametric test. **C** and **D**, Calcium influx assay in primary WT and $Chrna7^{-/-}$ murine chondrocyte cultures. Calcium signaling was investigated using a fluorescent Ca^{2+} indicator in WT and $Chrna7^{-/-}$ murine chondrocytes ($n = 2$ samples per group) treated with buffer alone, 10 μ M ionomycin (Iono), or 10 μ M nicotine (Nic). Analyses were performed using an Olympus IX83 inverted microscope. Original magnification $\times 20$. **E**, Representative results showing mean fluorescence measured immediately after treatment with buffer alone, 10 μ M ionomycin, or 10 μ M nicotine in WT and $Chrna7^{-/-}$ murine chondrocytes. Nicotine did not elicit a transient increase in intracellular calcium. **F**, Quantitative PCR results showing IL-6, MMP-3, and MMP-13 expression by human OA chondrocytes stimulated with 10 ng/ml IL-1 β , with or without a specific $\alpha 7$ -nAChR agonist, PNU-282987, at 100 μ M ($n = 3$ samples). In **A**, **B**, and **F**, symbols represent individual samples; bars show the mean \pm SEM. NS = not significant (see Figure 1 for other definitions). Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41429/abstract>.

human-specific duplicate CHRFA7A subunit in human OA chondrocytes. The structural differences between native CHRNA7 and duplicate CHRFA7A are described in Figure 3A. We evaluated the expression of both forms in human OA chondrocytes

from 23 patients with knee OA undergoing arthroplasty (69% women, mean \pm SD age 69.6 ± 7.9 years). Human OA chondrocytes expressed both the duplicate CHRFA7A and the native CHRNA7 subunits, but the mRNA expression for CHRFA7A

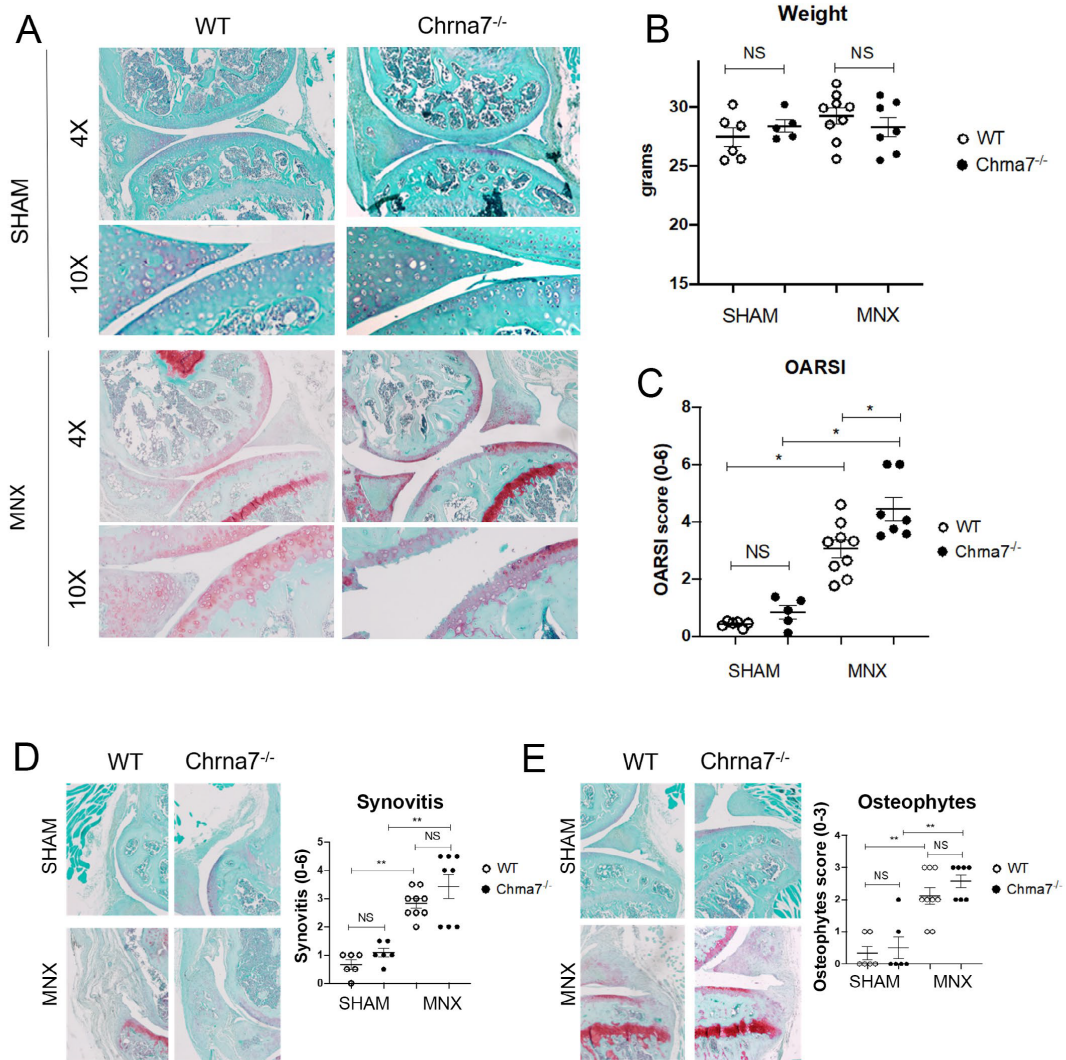


Figure 5. Absence of CHRNA7 is associated with more severe posttraumatic osteoarthritis cartilage damage. **A**, Representative Safranin O-fast green-stained sections of the right knee 8 weeks after sham surgery or meniscectomy (MNX) in wild-type (WT) and *Chrna7*^{-/-} mice. **B**, Weight of WT mice (*n* = 9) and *Chrna7*^{-/-} mice (*n* = 7) 8 weeks after sham surgery or meniscectomy (*P* not significant [NS] between groups). **C–E**, Osteoarthritis Research Society International (OARSIs) histologic scores of cartilage damage (range 0–6, 6 = worst) (**C**), synovitis scores (range 0–6, 6 = worst) (**D**), and osteophyte scores (range 0–3, 3 = worst) (**E**) between WT sham-operated mice (*n* = 6), *Chrna7*^{-/-} sham-operated mice (*n* = 5), WT meniscectomized mice (*n* = 9), and *Chrna7*^{-/-} meniscectomized mice (*n* = 7) 8 weeks postsurgery. In **D** and **E**, representative Safranin O-fast green-stained sections of the knee are shown. Original magnification \times 4. Symbols represent individual samples; bars show the mean \pm SEM. * = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.01.

was significantly higher than that for native CHRNA7 ($P = 0.046$) (Figure 3B). Interestingly, basal human OA chondrocyte CHRFA7A mRNA expression correlated with mRNA expression for MMP-3 ($n = 23$; $r = 0.38$, $P < 0.05$) and MMP-13 ($n = 23$; $r = 0.38$, $P < 0.05$) (Figure 3C). High-level expression of CHRFA7A was thus associated with a more pronounced catabolic profile, as the expression of MMP-3 and MMP-13 was significantly higher in chondrocytes expressing high levels of CHRFA7A (defined as CHRFA7A levels greater than or equal to the median [median 1.4]), compared to those expressing low levels of CHRFA7A (CHRFA7A levels less than the median) (Figure 3D).

Critical role of the $\alpha 7$ -nAChR pathway in anti-inflammatory and anticatabolic activity induced by cholinergic system activation. We hypothesized that the antiinflammatory effect of nAChR activation was due to $\alpha 7$ -nAChR. Therefore, we investigated the effect of nicotine on IL-1 β -stimulated Chrna7^{-/-} murine chondrocytes. In contrast to findings in WT murine chondrocytes, nicotine had no protective effect and thus did not decrease IL-6 and MMP-3 mRNA expression at any dose in Chrna7^{-/-} murine chondrocytes (Figure 4A). This phenomenon was also confirmed at the protein level (Figure 4B). Therefore, the antiinflammatory and anticatabolic effects of nicotine depend on $\alpha 7$ -nAChR. We excluded any compensation effect of other subunits in the Chrna7^{-/-} murine chondrocytes, because the expression level of the subunits of nAChR ($\alpha 1$ -7,9, and $\beta 1$ -4) did not differ between WT and Chrna7^{-/-} murine chondrocytes (data not shown).

To determine whether the effect of nicotine was calcium-dependent, we performed calcium entrance experiments in WT and Chrna7^{-/-} murine chondrocytes and found no intracellular entrance of calcium in either type of chondrocyte (Figures 4C-E), meaning that activation of $\alpha 7$ -nAChR involves other pathways. To confirm the antiinflammatory and anticatabolic effects of the $\alpha 7$ -nAChR pathway in human chondrocytes, we tested the effect of a specific $\alpha 7$ -nAChR agonist, PNU-282967 (100 μ M), on IL-1 β -stimulated chondrocytes. PNU-282967 decreased the expression of mRNA for IL-6 (-23.1 \pm 5.9%), MMP-3 (-16.5 \pm 6.5%), and MMP-13 (-39.4 \pm 4.1%) induced by IL-1 β alone (Figure 4F).

Aggravation of cartilage degradation following impairment of the ACh/CHRNA7 axis by deletion of CHRNA7 in murine OA. Finally, we investigated the involvement of $\alpha 7$ -nAChR in vivo using the meniscectomy model of OA in WT and Chrna7^{-/-} mice. We did not find any macroscopic phenotypic or behavioral differences between WT and Chrna7^{-/-} mice before euthanasia. The weight was similar between the groups (mean \pm SEM 27.4 \pm 0.7 gm for WT sham-operated mice, $n = 6$; 28.3 \pm 0.5 gm for Chrna7^{-/-} sham-operated mice, $n = 5$; 29.2 \pm 0.6 gm for WT meniscectomized mice, $n = 9$; and 28.3 \pm 0.8

gm for Chrna7^{-/-} meniscectomized mice, $n = 7$; P not significant) (Figure 5B). Meniscectomy induced significant lesions of OA in both WT and Chrna7^{-/-} mice compared to sham-operated knees, with more cartilage lesions, more osteophytes, and more synovitis ($P < 0.05$) (Figures 5A and C). In the sham experiments, there were no differences in the OARSI score between WT and Chrna7^{-/-} mice (mean \pm SEM 0.42 \pm 0.1 for WT sham-operated mice versus 0.84 \pm 0.51 for Chrna7^{-/-} sham-operated mice; $P = 0.11$), or in synovitis or osteophyte scores (Figures 5C-E).

Eight weeks after meniscectomy, Chrna7^{-/-} mice displayed more severe OA cartilage damage than WT mice, based on the OARSI score (mean \pm SEM 3.05 \pm 0.9 for WT meniscectomized mice versus 4.46 \pm 1.09 for Chrna7^{-/-} meniscectomized mice, using a 0-6 score range with 6 being the worst; $P < 0.05$) (Figures 5A and C). However, we did not find any differences in synovitis or osteophyte scores between WT and Chrna7^{-/-} mice following meniscectomy (Figures 5D and E).

DISCUSSION

Our understanding of the role of the non-neuronal cholinergic system as a critical regulator of inflammation and immunity is growing but remains controversial and poorly investigated in OA pathophysiology (21,22). Here, we showed that human and murine chondrocytes are part of the non-neuronal cholinergic system allowing local autocrine/paracrine action of ACh on joint cells. Stimulation of the functionally expressed homopentamer $\alpha 7$ -nAChR decreased the inflammatory and catabolic activation of human and murine chondrocytes induced by IL-1 β . Furthermore, $\alpha 7$ -nAChR has a protective role in OA since the absence of $\alpha 7$ -nAChR was associated with more severe cartilage degradation in the murine meniscectomy model.

The role of the non-neuronal cholinergic system has been previously investigated in other cell types. Likewise, non-neuronal production of ACh by T cells is essential to control viral infections (4). Additionally, the stimulation of ACh synthesis by T cells could counteract the chronic and systemic inflammation in RA and in sepsis (23-25). However, very little is known about the non-neuronal cholinergic system in joint tissues, especially in cartilage. The synovial membrane expresses ChAT, the main enzyme responsible for the production of ACh and carAT, another enzyme for ACh synthesis (26). In addition, the synovium expresses AChE and BChE, which are responsible for the degradation of ACh and several nicotinic ACh receptors, such as $\alpha 2$ -7 and $\alpha 9$ subunits (but not β -nicotinic subunits) and muscarinic receptors M1 and M3-M5 (26-28).

Murine osteoblasts also express the entire spectrum of biochemical enzymatic machinery and most nicotinic receptors (29). Here, we showed for the first time that human OA and murine chondrocytes express the entire cholinergic system relevant for ACh synthesis (carAT), transport (VAChT), and degradation (AChE). Chondrocytes express carAT and no ChAT,

which is consistent with a previous study that demonstrated that *carAT* is the main enzyme responsible for ACh synthesis in non-neuronal cells (30). We found that *CHT-1* is expressed by murine chondrocytes but not by human OA chondrocytes. However, Beckmann et al established that other choline transporters were expressed in cartilage (choline transporter-like CTL-1–5, the organic cation transporter [OCT] 1 and 3, and the OCT novel 3) (28). These transporters allow choline recapture by the cells after ACh degradation, which may constitute a rate-limiting step for ACh synthesis.

ACh acts on both muscarinic and nicotinic receptors, which are widely expressed by non-neuronal cells, making the cholinergic system complex. Since nicotinic receptors are also involved in inflammation and tissue remodeling in non-neuronal cells, we investigated their expression in chondrocytes. Nicotinic receptors are composed of 5 α - and/or β -subunits, which comprise a heterogeneous family of hetero- or homopentamers. Chondrocytes express several α - and β -nicotinic subunits, and most are preserved between mice and humans. Indeed, WT murine chondrocytes express $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, and $\beta 4$ subunits, and human OA chondrocytes express $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, and $\beta 4$ subunits. Based on previously published data on other cell types, different combinations of nAChR pentamers can be expressed by chondrocytes (31). But importantly, human and murine chondrocytes both express the $\alpha 7$ -nAChR homopentamer, as confirmed by α -bungarotoxin binding, which is widely used for this purpose (32).

Our study demonstrated a regulatory effect of $\alpha 7$ -nAChR in chondrocyte activation induced by IL-1 β . In vitro, activation of nicotinic receptors by nicotine limits the induction of inflammatory and catabolic factors by IL-1 β . These findings are in accordance with those reported by Liu et al, who showed that nicotine applied to IL-1 β -stimulated rat chondrocytes inhibited signaling pathways, MAPKs, and NF- κ B proinflammatory pathways. However, they did not investigate the downstream effect of nicotinic receptor activation on cytokines and MMPs or which nicotinic receptors are involved in these processes. In the present study, we demonstrated that the antiinflammatory and anticatabolic effects of nicotine are due to $\alpha 7$ -nAChR activation, since nicotine did not counteract IL-1 β stimulation in *Chrna7*^{-/-} murine chondrocytes. In contrast to the study from Liu et al, we used *Chrna7*^{-/-} murine cells, which are more robust and more specific than chemical antagonist compounds such as methyllycaconitine (MLA), an $\alpha 7$ -nAChR antagonist. We did not find any action of nicotine on the entry of calcium, contrary to what has been previously reported on human growth plate chondrocytes (33). The state of differentiation could explain this discrepancy. Despite calcium entry, $\alpha 7$ -nAChR could have a direct metabotropic effect by a direct interaction with some substrates of signaling pathways (NF- κ B and MAPKs), as previously reported in chondrocytes (11,34). Finally, we did not use ACh in vitro because of its short half-life and its lack of specificity, since

ACh activates both nicotinic and muscarinic receptors that might be expressed by chondrocytes.

We confirmed the antiinflammatory and anticatabolic effects of $\alpha 7$ -nAChR on human OA chondrocytes using a widely used and published specific $\alpha 7$ -nAChR agonist, PNU-282967 (20,35). This finding corroborates that of a previous study that showed the promotion of collagen synthesis by nicotine in human normal chondrocytes (36). However, the inflammatory and catabolic responses of human chondrocytes may depend on the expression level of the duplicate *CHRFAM7A*. We found that the expression level of the human-specific duplicate *CHRFAM7A*, which is responsible for a truncated protein of the $\alpha 7$ subunit, is associated with an enhanced catabolic profile (i.e., increased MMP expression). This duplicate contains exons 5–10 of the native gene of the $\alpha 7$ subunit *Chrna7*, which transcribed most of the protein structure. However, the ligand binding site of this truncated protein is missing, leading to a decreased response to specific ligands, such as ACh or nicotine (37). The local expression of *CHRFAM7A* is suspected to be associated with some disease and inflammatory states, as demonstrated by the colon expression of *CHRFAM7A* in inflammatory bowel diseases (38). Interestingly, meta-analysis of observational studies have reported that smoking could be associated with less incident OA (39). Our study could provide a rationale for these data. However, nicotine is just one of the compounds present in tobacco smoke and so the role of others cannot be ruled out. Overall, we still consider that even if nicotine could have some beneficial effects on cartilage, the multiple risks related to smoking far outweigh the conditional beneficial effect of nicotine.

Finally, we confirmed the involvement of $\alpha 7$ -nAChR in OA in vivo. We observed that *Chrna7*^{-/-} mice displayed more severe cartilage lesions than WT mice following meniscectomy. This finding confirms that mice lacking *Chrna7* are associated with increased chondrocyte activation and cartilage degradation compared to WT mice and that $\alpha 7$ -nAChR has a protective role in OA. This is the first study evaluating OA in *Chrna7*^{-/-} mice. These mice do not have behavioral and phenotypic differences compared to WT mice (40). However, we did not evaluate joint pain. Liu et al and Teng et al previously reported that systemic administration of nicotine reduced monoiodoacetate (MIA) OA lesions (10,11). They suggested that this effect was due to activation of $\alpha 7$ -nAChR as the protective effect of nicotine disappears after injection of MLA; however, the specificity of this chemical compound is questionable, and the administration of the combination of nicotine and MLA is somewhat artificial and potentially toxic to rats. In contrast to the more severe OA lesions caused by nicotine and MLA treatment in the MIA model, the exacerbated OA lesions in *Chrna7*^{-/-} meniscectomized mice could be due to a loss of effect of endogen ACh on $\alpha 7$ -nAChR in *Chrna7*^{-/-} chondrocytes. A weakness of our study is that since we used a model of full inactivation of the *Chrna7* gene and not a cartilage-specific one, we cannot definitively conclude whether cartilage genetic deletion is the only factor involved in the exacerbated OA lesions

in *Chrna7^{-/-}* mice. Of note, it is possible that deletion of *Chrna7* in bone also contributes to the observed meniscectomy phenotype.

Our study has several strengths. First, we confirmed $\alpha 7$ -nAChR expression using various robust methods (i.e., α -bungarotoxin). Antibody-based techniques for the assessment of $\alpha 7$ -nAChR protein expression were not possible, due to the unavailability of accurate and specific antibodies raised against the nicotinic subunit (41). We also evaluated, for the first time, the local expression of the specific human duplicate. Second, we used a mechanical model, which is much more representative of human OA than the MIA model, which entails a high degree of inflammation that is less representative of human disease. Third, we used genetically modified mice instead of applying a combination of chemical compounds to mimic $\alpha 7$ -nAChR inhibition.

In conclusion, human and murine chondrocytes belong to the non-neuronal cholinergic system. The $\alpha 7$ -nAChR is a crucial receptor able to limit the inflammatory and catabolic response of chondrocytes, and absence of this receptor can aggravate OA cartilage damage. In human chondrocytes, expression of the gene duplicate *CHRFAM7A* is associated with a more marked catabolic profile, while its role in OA remains to be investigated. Thus, the non-neuronal ACh/ $\alpha 7$ -nAChR axis is involved in the pathophysiology of OA and could be a therapeutic target.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Professor Alain Sautet, MD and Dr. Francois-Paul Ehkirch, MD for providing cartilage samples from human knee joints, Pradeep Sacitharan, PhD and Professor Pierre Aucouturier, MD, PhD for their advice and helpful discussions, Kristell Wanderhick for her help in histologic staining, Pierre Galichon and Dominique Prié for their advice on the calcium assay, and Tatiana Ledent for providing the animal facilities.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Courties had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Courties, Maskos, Berenbaum, Sellam.

Acquisition of data. Courties, Do, Leite, Legris, Sudre, Pignat, Petit, Nourissat, Cambon-Binder, Berenbaum, Sellam.

Analysis and interpretation of data. Courties, Do, Leite, Legris, Sudre, Pignat, Petit, Nourissat, Cambon-Binder, Berenbaum, Sellam.

REFERENCES

- Tracey KJ. Neurons are the inflammatory problem [letter]. *Cell* 2018; 173:1066–8.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458–62.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008; 154:1558–71.
- Cox MA, Duncan GS, Lin GH, Steinberg BE, Yu LX, Brenner D, et al. Choline acetyltransferase-expressing T cells are required to control chronic viral infection. *Science* 2019;363:639–44.
- Wang H, Yu M, Ochari M, Amella CA, Tanovic M, Susaria S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;421:384–8.
- Marrero MB, Bencherif M. Convergence of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-activated pathways for anti-apoptosis and anti-inflammation: central role for JAK2 activation of STAT3 and NF- κ B. *Brain Res* 2009;1256:1–7.
- Gault J, Robinson M, Berger R, Drebing C, Logel J, Hopkins J, et al. Genomic organization and partial duplication of the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (*CHRNA7*). *Genomics* 1998;52:173–85.
- Costantini TW, Dang X, Yurchyshyna MV, Coimbra R, Elieoiri BP, Baird A. A human-specific $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor gene in human leukocytes: identification, regulation and the consequences of *CHRFAM7A* expression. *Mol Med* 2015;21:323–36.
- Costantini TW, Chan TW, Cohen O, Langness S, Treadwell S, Williams E, et al. Uniquely human *CHRFAM7A* gene increases the hematopoietic stem cell reservoir in mice and amplifies their inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:7932–40.
- Teng P, Liu Y, Dai Y, Zhang H, Liu WT, Hu J. Nicotine attenuates osteoarthritis pain and matrix metalloproteinase-9 expression via the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Immunol* 2019;203:485–92.
- Liu Y, Wu D, Song F, Zhu C, Hui Y, Zhu Q, et al. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors prevents monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Cell Physiol Biochem* 2015;35: 627–36.
- Bock K, Plaass C, Coger V, Peck CT, Reimers K, Stukenborg-Colsman C, et al. What is the effect of nicotinic acetylcholine receptor stimulation on osteoarthritis in a rodent animal model? *SAGE Open Med* 2016;4:2050312116637529.
- Orr-Urtreger A, Gördner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, de Biasi M, et al. Mice deficient in the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack α -bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci* 1997;17:9165–71.
- Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:632–41.
- Kadri A, Ea HK, Bazille C, Hannouche D, Lioté F, Cohen-Solal ME. Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2379–86.
- Glasson SS, Chambers MG, van den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18 Suppl:S17–23.
- Jackson MT, Moradi B, Zaki S, Smith MM, McCracken S, Smith SM, et al. Depletion of protease-activated receptor 2 but not protease-activated receptor 1 may confer protection against osteoarthritis in mice through extracartilaginous mechanisms. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:3337–48.
- Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* 2008;3:1253–60.
- Trellu S, Courties A, Jaisson S, Gorisse L, Gillery P, Kerdine-Römer S, et al. Impairment of glyoxalase-1, an advanced glycation end-product detoxifying enzyme, induced by inflammation in age-related osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2019;21:18.

20. Granlien JH, Håkerud M, Ween H, Thorin-Hagene K, Briggs CA, Gopalakrishnan M, et al. Distinct profiles of $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol* 2007;72:715–24.
21. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci* 2017;134:1–21.
22. Courties A, Sellam J, Berenbaum F. Role of the autonomic nervous system in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017;31:661–75.
23. Rosas-Bailina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 2011;334:99–101.
24. Levine YA, Koopman FA, Faltys M, Caravaca A, Bendele A, Zitnik R, et al. Neurostimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates disease in rat collagen-induced arthritis. *PLoS One* 2014;9:e104530.
25. Koopman FA, Chavan SS, Mijko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR, et al. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:8284–9.
26. Schubert J, Beckmann J, Hartmann S, Morhenn HG, Szalay G, Heiss C, et al. Expression of the non-neuronal cholinergic system in human knee synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Life Sci* 2012;91:1048–52.
27. Grimsholm O, Rantapää-Dahlqvist S, Dalén T, Forsgren S. Unexpected finding of a marked non-neuronal cholinergic system in human knee joint synovial tissue. *Neurosci Lett* 2008;442:128–33.
28. Beckmann J, Schubert J, Morhenn HG, Grau V, Schnettler R, Lips KS. Expression of choline and acetylcholine transporters in synovial tissue and cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cell Tissue Res* 2015;359:465–77.
29. Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, et al. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts [letter]. *FEBS Lett* 2010;584:817–24.
30. Tucek S. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 1982;322:53–69.
31. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function [review]. *Physiol Rev* 2009;89:73–120.
32. Chen D, Patrick JW. The α -bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the $\alpha 7$ subunit. *J Biol Chem* 1997;272:24024–9.
33. Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, et al. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS One* 2008;3:e3945.
34. Shaw S, Bencherif M, Marrero MB. Janus kinase 2, an early target of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against A β (1–42) amyloid. *J Biol Chem* 2002;277:44920–4.
35. Hajós M, Hurst RS, Hoffmann WE, Krause M, Wall TM, Higdon NR, et al. The selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:1213–22.
36. Gullahorn L, Lippello L, Karpman R. Smoking and osteoarthritis: differential effect of nicotine on human chondrocyte glycosaminoglycan and collagen synthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:942–3.
37. Chan T, Williams E, Cohen O, Elceiri BP, Baird A, Costantini TW. CHRFAM7A alters binding to the neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neurosci Lett* 2019;690:126–31.
38. Baird A, Coimbra R, Dang X, Elceiri BP, Costantini TW. Up-regulation of the human-specific CHRFAM7A gene in inflammatory bowel disease. *BBA Clin* 2016;5:66–71.
39. Kong L, Wang L, Meng F, Cao J, Shen Y. Association between smoking and risk of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:809–16.
40. Yin J, Chen W, Yang H, Xue M, Schaaf CP. Chrna7 deficient mice manifest no consistent neuropsychiatric and behavioral phenotypes. *Sci Rep* 2017;7:39941.
41. Moser N, Mechawar N, Jonas I, Gochberg-Sarver A, Orr-Urtreger A, Piomann M, et al. Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *J Neurochem* 2007;102:479–92.

Annexe 7

Participation à l'article : réalisation aux manipulations histologiques

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC
REPORTS

nature research



OPEN Clearing method for 3-dimensional immunofluorescence of osteoarthritic subchondral human bone reveals peripheral cholinergic nerves

Alice Courties^{1,2,3}, Morgane Belle^{1,4}, Simge Senay^{1,2}, Adeline Cambon-Binder^{1,5}, Alain Sautet^{1,5}, Alain Chédotal^{1,4}, Francis Berenbaum^{1,2,3} & Jérémie Sellam^{1,2,3}

The cholinergic system plays a major anti-inflammatory role in many diseases through acetylcholine (ACh) release after vagus nerve stimulation. Osteoarthritis (OA) is associated with local low-grade inflammation, but the regulatory mechanisms are unclear. Local ACh release could have anti-inflammatory activity since articular cells express ACh receptors involved in inflammatory responses. Using the 3DISCO clearing protocol that allows whole-sample 3-dimensional (3D) analysis, we cleared human OA cartilage-subchondral bone samples to search for cholinergic nerve fibres able to produce ACh locally. We analysed 3 plugs of knee cartilage and subchondral bone from 3 OA patients undergoing arthroplasty. We found no nerves in the superficial and intermediate articular cartilage layers, as evidenced by the lack of Peripherin staining (a peripheral nerves marker). Conversely, peripheral nerves were found in the deepest layer of cartilage and in subchondral bone. Some nerves in the subchondral bone samples were cholinergic because they coexpressed peripherin and choline acetyltransferase (ChAT), a specific marker of cholinergic nerves. However, no cholinergic nerves were found in the cartilage layers. It is therefore feasible to clear human bone to perform 3D immunofluorescence. Human OA subchondral bone is innervated by cholinergic fibres, which may regulate local inflammation through local ACh release.

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease and is a considerable burden on quality of life due to joint pain, stiffness and loss of function¹. OA is mostly characterized by cartilage degradation but is now considered a whole-joint disease associated with subchondral bone remodelling and synovitis. Articular cartilage is composed of several layers, and the deepest layer, called calcified cartilage, is located on top of subchondral bone. Articular cartilage is a unique tissue that is not innervated or vascularized. Communication between subchondral bone and calcified cartilage is needed for cartilage homeostasis. Such communication is also involved in the OA process because of the circulation of soluble mediators from subchondral bone to cartilage undergoing alterations². Interplay between subchondral bone and deep cartilage may involve micro-cracks at the junction between the two tissues as well as neoangiogenesis of the calcified cartilage, which could be directly involved in OA pathophysiology³⁻⁵. Additionally, neurogenesis may play a role in OA pathophysiology. Walsh and colleagues previously showed that during OA, peripheral sensory and sympathetic nerves grow in calcified cartilage and may be involved in OA pain^{6,7}.

Beyond sensory mediators and sensory nerves, the parasympathetic system has been reported to have anti-inflammatory properties through the action of its mediator, acetylcholine (ACh), on nicotinic ACh receptors and, in particular, the alpha7 nicotinic receptor^{8,9}. ACh production is controlled by choline acetyltransferase (ChAT), which is mainly recognized as a marker of cholinergic nerves. Because ACh interacts locally with

¹Sorbonne Université, Paris, France. ²INSERM UMRS_938, CRSA, Paris, France. ³Department of Rheumatology, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Saint-Antoine Hospital, Paris, France. ⁴INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France. ⁵Department of Orthopedic Surgery, AP-HP, Saint-Antoine Hospital, Paris, France. [✉]e-mail: francis.berenbaum@aphp.fr

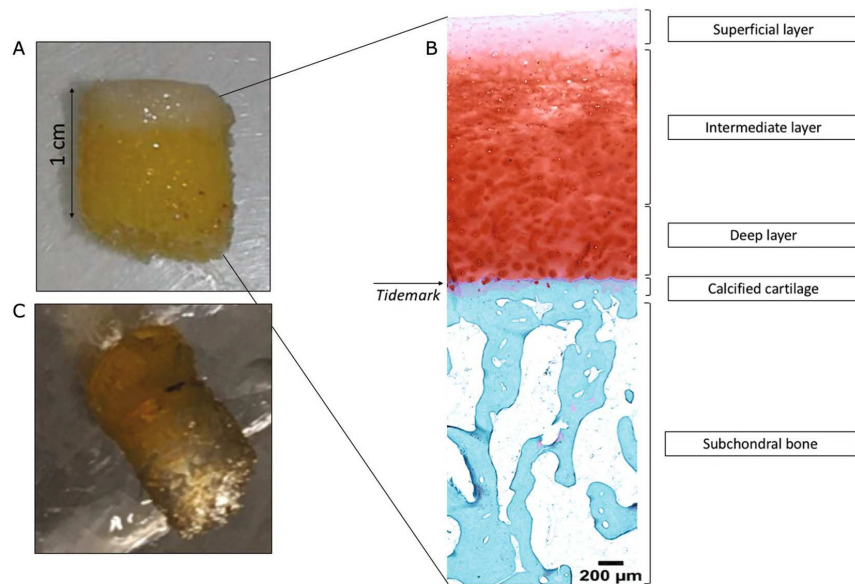


Figure 1. Human OA plug analysis. (A) Osteoarthritic human subchondral bone/cartilage plugs obtained from a macroscopically healthy zone of an osteoarthritic knee during arthroplasty for knee OA. (B) Histological analysis of a human subchondral bone/cartilage plug after paraformaldehyde fixation, decalcification, paraffin embedding and Safranin O/Fast Green staining for the analysis of all cartilage layers and subchondral bone. (C) Osteoarthritic human subchondral bone/cartilage plug after the 3DISCO clearing protocol.

nicotinic Ach and muscarinic receptors expressed by resident cells of the bone to exert anti-inflammatory effects, we wondered whether cholinergic nerves are locally expressed in subchondral bone^{10,11}. Because it is challenging to characterize nerve structures using two-dimensional (2D) techniques with confocal microscopy, we adapted a recently published protocol for the three-dimensional (3D) analysis of immunofluorescence^{12,13}. 3D immunolabelling allows the study of anatomical structures while preserving the whole structure of the tissue sample. This method was first developed in neuroscience for studying the mouse brain and spinal cord and then for studying embryonic development in humans¹⁵. Improvements in light sheet microscopy and the clearing protocol have made it possible to readily immunolabel a whole tissue sample in a straightforward manner. Therefore, this technique is of interest for the study of small structures, such as nerves. One challenging step is clearing bone because it is rich in adipose tissue and because decalcification techniques complicate the protocol and may limit its success. Several teams have managed to clear murine bone in different stages of differentiation, but until now, no one has managed to clear human adult bone^{14,15}. The objective of our study was to determine the presence of cholinergic nerves in cartilage and subchondral OA human samples using 3D immunolabelling.

Results

The 3DISCO clearing protocol enabled human OA subchondral bone immunofluorescence. We first used one sample to establish that plugs of a particular size could be analysed by microscopy, and we confirmed that all cartilage layers and sufficient subchondral bone were present for analysis (Fig. 1A,B). Then, we performed immunofluorescence on three independent samples from patients aged 68 to 79 years, 1 woman and two men, with a body mass index between 32 and 38 kg/m². We first confirmed that the clearing method of cartilage-subchondral bone samples worked using the 3DISCO protocol. We found that the 3DISCO protocol allowed us to macroscopically clear all subchondral bone (Fig. 1C) and to precisely analyse the anatomical structure of trabecular bone, allowing us to differentiate trabecular bone and bone marrow, as shown in Fig. 2. We confirmed that immunofluorescence was an efficient technique for localizing peripheral nerves in the 3 samples using peripherin labelling (Fig. 3, Supplementary video 1). The nerve density appeared to be similar in the 3 samples. All the nerves appeared to come from the epiphyseal region of the bone and cross all the subchondral bone to reach the cartilage. Indeed, as expected, no nerves were present in superficial and the intermediate cartilage, although some peripherin-positive nerve fibres had invaded deeper layers of cartilage in the 3 samples (Fig. 3, Supplementary video 1).

Cholinergic peripheral nerves are present in human OA subchondral bone. In the three independent human OA samples, some of the peripheral nerves coexpressed ChAT, meaning that some of the fibres may produce Ach and thus belong to the cholinergic nervous system (Fig. 4, Supplementary video 2). However, we

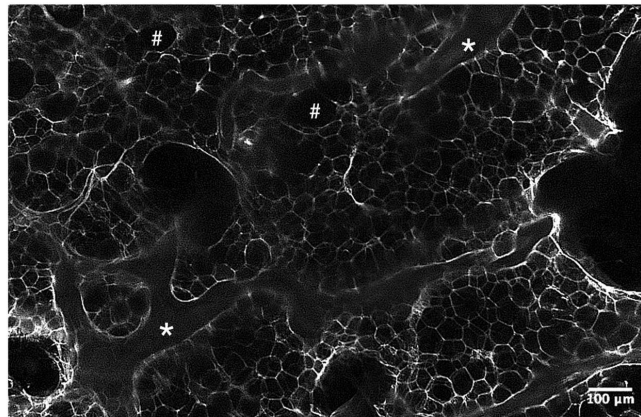


Figure 2. Light-sheet microscopy analysis of human OA subchondral bone after the clearing protocol. The samples analysed is a cleared subchondral plug, stained with peripherin. This is a zone without nerves in a higher magnification to precisely look to the structure: * for trabecular bone and # for bone marrow area.

did not find any cholinergic nerves in any of the cartilage layers. No nerves structures or cholinergic nerves was shown in the two negative controls that we performed (one without any antibody and one with the secondary antibody at the same concentration) as shown in the Supplementary Files 3.

Discussion

We report for the first time that cholinergic fibres are present in human OA subchondral bone. Furthermore, we show that a clearing protocol for cartilage-subchondral bone samples is feasible and enables 3D immunolabelling of these human tissues. This study opens new avenues of research in bone analysis and will allow the qualitative and quantitative analysis of anatomical structures in human diseases.

Parasympathetic innervation of joint tissues has been less studied than its sympathetic counterpart. Bajayo *et al.* successfully demonstrated parasympathetic innervation of rat bone by injecting a labelled neurogenic pseudorabies virus into the metaphyseal region of a rat femur to label parasympathetic sacral centres¹⁶. However, these researchers did not confirm their results in human samples. Others have reported the presence of cholinergic fibres in the periosteum of rats based on expression of vesicular Ach transporter (VAChT) or ChAT¹⁷. Cholinergic fibres have also been found in periarticular tissues (mostly skin and muscle) from mice with arthritis, which have decreased sympathetic fibre density. VAChT-positive fibres were also found in very few synovia of OA and rheumatoid arthritis patients¹⁸. The presence of cholinergic fibres does not necessarily indicate the presence of a complete parasympathetic system, as these fibres could arise from sympathetic fibres by modifying their phenotype. In the periosteum, cholinergic fibres are derived from catecholaminergic fibres in response to local neurotrophic cytokines, such as leukaemia inhibitory factor, which is produced locally by osteoclasts or osteoblasts^{17–20}. These apparent cholinergic fibres in subchondral bone could arise from sympathetic rather than parasympathetic centres. Despite the final anatomical provenance of the nerve, the presence of cholinergic nerves indicates the local production of Ach, which can be modulated and can act on nicotinic and/or muscarinic cholinergic receptors to exert anti-inflammatory and immunomodulatory activity or to modulate bone mass, which is of interest for future research in osteoporosis^{10,21,22}. However, this study did not allow to quantify these cholinergic nerves and to correlate such a quantification with OA severity and our results involve only healthy macroscopically zone of human OA subchondral bone. Furthermore, we cleared and immunolabelled 3D human subchondral bone for the first time. Clearing some tissues remains a challenge and constitutes a limiting step for 3D immunolabelling. The principle of clearing is to modify the refractive index of the tissue by changing its composition; this is accomplished by removing the lipids and then immersing the samples in a clearing medium to achieve a uniform refractive index. Several clearing protocols have been published in the last decade²³; the most commonly used protocols are the 3DISCO and iDISCO protocols, which both employ the same optical clearing approach and a dibenzyl ether-based technique^{24,25}. Not all antibodies are compatible with clearing protocol. However, we have used two antibodies already used with this method and published¹³. Thus, this antibody of ChAT stained motoneurons on human embryos (<https://transparent-human-embryo.com/?p=863>). However, although filtered, the immunostaining of ChAT was slightly altered with the presence of non-specific labelling. Since these artefacts were not found when the sample was incubated with the secondary antibody alone, it is likely that they were due to the primary antibody. Another explanation could have been the expression of a non-neuronal cholinergic system by non-neuronal cells in the bone but it would have led to much more staining in the entire sample.

We demonstrated that the 3DISCO protocol is feasible and can be used for future research on nerve and vessels in joint tissues as well as for cell marker labelling.

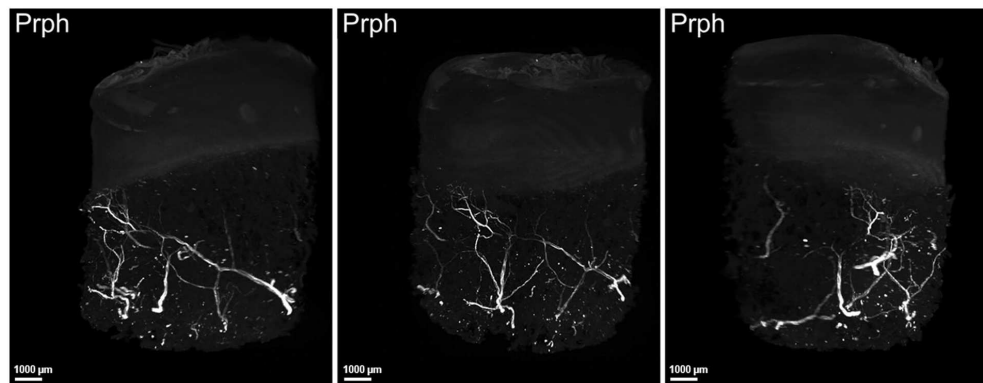


Figure 3. Human OA subchondral bone has peripheral nerves that invade deep layer of cartilage. 3-dimensional analysis of peripheral nerves in human OA subchondral bone using peripherin (Prph) labelling after the 3DISCO clearing protocol (see video 1). The three pictures show the same sample in 3 different views. Peripheral nerve in the deep cartilage layer coming from subchondral bone as shown by peripherin labelling (white), Prph: peripherin.

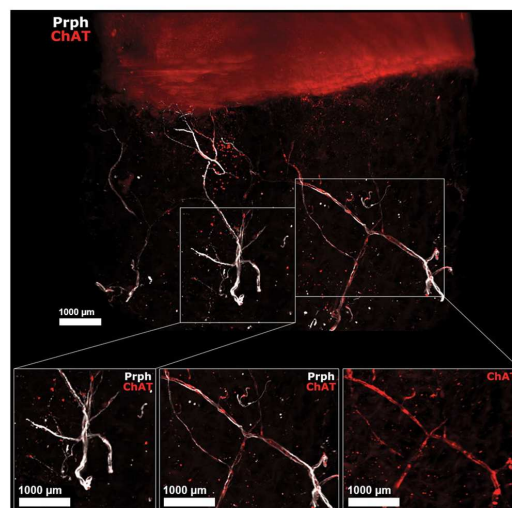


Figure 4. Human OA subchondral bone has peripheral and cholinergic nerves. Immunofluorescence of peripherin and ChAT in human OA subchondral bone (see video 2) after the 3DISCO clearing protocol and analysis with Imaris. The colocalization of both markers showed that some subchondral bone peripheral nerves marked by Prph (white) are also cholinergic, as they showed ChAT immunofluorescence (red) as shown on the right while some did not express ChAT (left). ChAT: choline acetyltransferase, Prph: peripherin.

In conclusion, cholinergic fibres are found in the macroscopically healthy area of the human OA subchondral bone as to deliver locally Ach. The 3D clearing protocol developed for human cartilage and bone allows the analysis of whole cartilage-bone samples of 10 mm² without sectioning.

Methods

Four independent human OA samples were isolated from the knees of patients undergoing joint arthroplasty for OA at AP-HP Saint-Antoine Hospital (Paris, France). Informed consent for the use of tissue was obtained from each patient before surgery. Experiments using human samples were approved by a French Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes, Paris Ile de France 5 and Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Just after

the surgery, small 10-mm² plugs of human OA cartilage and subchondral were obtained. Each plug was taken from a macroscopically healthy area of the joint and included the entire cartilage layer and a piece of subchondral bone just below the cartilage. Samples were fixed at 4 °C for 24 hours in 4% paraformaldehyde diluted in PBS and then decalcified in 500 mM EDTA (pH 7.4, VWR, Pennsylvania, USA) diluted in PBS for approximately 4 weeks at 4 °C in a rotating wheel. The EDTA solution was changed every 48 hours until the samples were considered decalcified (approximately 4 weeks). One sample was used for standard histological analysis and embedded in paraffin. Sagittal sections of 5 µm were obtained, and one slide was stained with Safranin O/Fast Green for the analysis of cartilage layers and subchondral bone structure. For 3D immunofluorescence, the three other samples were rinsed three times in PBS before being dehydrated in a series of methanol/PBS (50% methanol/PBS, 80% methanol/PBS and 100% methanol) at room temperature for 1.5 hours. The samples were incubated overnight at 4 °C in the dark in the bleaching solution (methanol and 6% H₂O₂) and then rehydrated in the opposite series of methanol/PBS. Then, the samples were blocked and permeabilized in 1X PBS-0.2% gelatin-0.5% Triton (PBSGT) for 48 hours. We next incubated the samples with primary antibodies against peripherin (1:500 dilution, #AB1530, Merck Millipore, Massachusetts, USA) and ChAT (1:100 dilution, #AB144P, Merck Millipore, Massachusetts, USA) diluted in PBSGT with 0.1% saponin for 14 days at 37 °C with mild agitation. After 14 days, the samples were rinsed 6 times over an entire day and incubated with anti-rabbit IgG Alexa Fluor[®] 647 (A-21443, Molecular Probes, Oregon, USA) and anti-goat IgG Alexa Fluor[®] 555 (A-21432, Molecular Probes, Oregon, USA). Secondary antibodies solution was filtered through a 0.22 µm syringe filter and incubated for 48 hours in PBSGT with 0.1% saponin at 37 °C with mild agitation. The samples were then rinsed 6 times with PBS over an entire day. Then, we performed the 3DISCO clearing protocol as previously described^{12,13}. Briefly, the samples were incubated in the dark at room temperature in different concentrations of tetrahydrofuran (THF) diluted in water for 1.5 hours each (50% of THF, 80% of THF and two incubation in 100% THF) and then in dichloromethane (DCM) for 30 minutes followed by dibenzyl ether (DBE) for at least three hours. Images were acquired with an UltraMicroscope I (LaVision BioTec-Miltenyi, Bielefeld, Germany) assisted by ImInspector Pro software (LaVision BioTec-Miltenyi Bielefeld, Germany). The light sheet created by two cylindrical lenses was generated by a laser with 2 specific wavelengths: 561 nm and 640 nm (Coherent Sapphire Laser, LaVision BioTec-Miltenyi). A protective dipping cap with a corrective lens was used for all acquisitions, and a binocular stereomicroscope (MXV10, Olympus) with a 2x objective (MVPLAPO, Olympus) was used. Samples were placed in a quartz tank (LaVision BioTec-Miltenyi) filled with DBE, and the illumination came from both sides. A Zyla sCMOS camera (2,048 × 2,048 pixels, Andor, Oxford Instruments) was used to acquire images. The step size between each image was fixed at 2 µm (NA = 0.5, 150 ms exposure). All images are generated as 16-bit.tiff files.

3D reconstructions are generated using the ImarisFileConverter (version 9.1.2, Bitplane) as Imaris Files (.ims). For 3D visualization on Imaris software (version 9.1.2, Bitplane), we used “volume”. We altered the normal shading view to obtain opaque visualizations. Optical slices are generated using the “orthoslicer” tool. 3D pictures and movies were generated using the “snapshot” and “animation” tools. Movie reconstructions with.tiff files were generated with ImageJ (1.50e, Java 1.8.0_60, 64-bit). We added titles and transitions with iMovie (version 10.1.1).

Received: 25 September 2019; Accepted: 5 May 2020;

Published online: 01 June 2020

References

- Hunter, D. J. & Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *Lancet* **393**, 1745–1759 (2019).
- Shibakawa, A. *et al.* The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthr. Cartil.* **13**, 679–687 (2005).
- Zarka, M. *et al.* Microcracks in subchondral bone plate is linked to less cartilage damage. *Bone* **123**, 1–7 (2019).
- Lories, R. J. & Luyten, F. P. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**, 43–49 (2011).
- Mahjoub, M., Berenbaum, F. & Houard, X. Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int* **23**(Suppl 8), S841–846 (2012).
- Suri, S. *et al.* Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 1423–1428 (2007).
- Mapp, P. I. & Walsh, D. A. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 390–398 (2012).
- Borovikova, L. V. *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **405**, 458–462 (2000).
- Rosas-Ballina, M. *et al.* Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* **334**, 98–101 (2011).
- Sato, T. *et al.* Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Lett.* **584**, 817–824 (2010).
- Courties, A., Sellam, J. & Berenbaum, F. Role of the autonomic nervous system in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **31**, 661–675 (2017).
- Belle, M. *et al.* A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep* **9**, 1191–1201 (2014).
- Belle, M. *et al.* Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell* **169**, 161–173.e12 (2017).
- Jing, D. *et al.* Tissue Clearing and Its Application to Bone and Dental Tissues. *J. Dent. Res.* **98**, 621–631 (2019).
- Jing, D. *et al.* Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *Cell Res.* **28**, 803–818 (2018).
- Bajayo, A. *et al.* Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 15455–15460 (2012).
- Asmus, S. E., Parsons, S. & Landis, S. C. Developmental changes in the transmitter properties of sympathetic neurons that innervate the periosteum. *J. Neurosci.* **20**, 1495–1504 (2000).
- Stangl, H., Springorum, H.-R., Muschter, D., Grassel, S. & Straub, R. H. Catecholaminergic-to-cholinergic transition of sympathetic nerve fibers is stimulated under healthy but not under inflammatory arthritic conditions. *Brain Behav. Immun.* **46**, 180–191 (2015).
- Asmus, S. E., Tian, H. & Landis, S. C. Induction of cholinergic function in cultured sympathetic neurons by periosteal cells: cellular mechanisms. *Dev. Biol.* **235**, 1–11 (2001).
- Landis, S. C. The development of cholinergic sympathetic neurons: a role for neurotrophic cytokines? *Perspect Dev Neurobiol* **4**, 53–63 (1996).

21. Lips, K. S. *et al.* Small changes in bone structure of female $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. *BMC Musculoskelet Disord* **16**, 5 (2015).
22. Lips, K. S. *et al.* Altered ultrastructure, density and cathepsin K expression in bone of female muscarinic acetylcholine receptor M3 knockout mice. *Int. Immunopharmacol.* **29**, 201–207 (2015).
23. Vigouroux, R. I., Belle, M. & Chédotal, A. Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. *Mol Brain* **10**, 33 (2017).
24. Ertürk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* **7**, 1983–1995 (2012).
25. Renier, N. *et al.* iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).

Acknowledgements

This work was supported by the French Society of Rheumatology (SFR) and the Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP).

Author contributions

All authors contributed substantially to the conception and design of the work; A.S. provided the human samples; A.C., M.B., A.C.B. and S.S. performed the experiments and the acquisition, analysis and interpretation of the data; A.C., M.B., J.S., F.B., A.S. and A.C. participated in drafting or substantively revising the manuscript. All authors approved the submitted version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65873-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Annexe 8

Cohorte DIGICOD – Conseil scientifique du dernier trimestre 2019

 DIGICOD	<i>Scientific and Technical Description</i>	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019



**SOUMISSION DE PROJET DE RECHERCHE
COHORTE DIGICOD**

**SUBMISSION OF RESEARCH PROJECT
DIGICOD COHORT**

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

TITLE OF THE PROJECT :

Carbamylation-derived products in the Digicod cohort: serum levels of homocitrullin as a potential biomarker of structural severity in hand osteoarthritis

**Produits dérivés de la CARbamylation dans la cohorte DIGICOD :
Taux sérique d'hOmocitrulline comme biomarqueur potentiel de la sévérité structurale
de l'arthrose digitale
CADO**

PRINCIPAL INVESTIGATOR OF THE PROJECT

First name/Family Name: Cambon-Binder

Birth date: 27/06/1982

Personal address: Orthopaedic and trauma surgery department, Saint-Antoine Hospital, 184 rue du faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris

Phone number: 0685573795 Fax: 01 49 28 24 94 Email: adeline_cambon@yahoo.fr

Position: Professor Staff doctor Associate professor Assistant professor
 Fellow
 Other (Please specify)

Administrative membership of the laboratory:

University INSERM CNRS Hospital Other

Clinical research unit (DRCI) contact: Unité de Recherche Clinique de l'Est Parisien (URC-Est)

Address: Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris

Name of the person in charge: Professeur Tabassome Simon

Phone number: 01 49 28 22 02

Email: tabassome.simon@aphp.fr

SHORT CV OF THE PRINCIPAL INVESTIGATOR OF THE TEAM:

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only
		File N° : DIGICOD-19- <div style="text-align: right;">Edition 2019</div>

(Please provide the medical and/or scientific degree course, current position, and awards or grants...)

Current position: Senior lecturer Sorbonne University and associated professor (MCU-PH) in Orthopaedic and hand surgery department, Saint-Antoine hospital, Paris, since October 2019

Education

- 2018: European Diploma in Hand Surgery (European board of hand surgery examination), Copenhagen
- 2016: Medical pedagogy diploma (Paris VI University)
- 2014: Board certified orthopaedic surgery (Paris VII, Denis Diderot University)
- 2013: French national board of Medical doctor
- 2012: Arthroscopic surgery diploma (Paris VII, Denis Diderot University)
- 2010: Hand surgery diploma (Paris VII, Denis Diderot University)
- 2009: Master degree (Master 2) in Surgical sciences, specialized in Repair, regeneration and replacement (Paris XII)
- 2009: Fonctionnal and surgical anatomy of the locomotor apparatus diploma (Paris V, Descartes University)
- 2008: Experimental surgery and microsurgery diploma (Paris VII, Denis Diderot University)
- 2006: Maîtrise de sciences biologiques et médicales
- 2006-2013: Orthopaedic and Upper Limb Surgery residency and surgery training

Abstract:

Hand osteoarthritis (OA) is a common joint disease, leading to pain and functional limitations with high social and economic costs. The most severe subtype is erosive hand OA characterized by more symptoms, more joint inflammation and more joint degradation than the non-erosive disease.

Carbamylation is a non-enzymatic post-translational modification of proteins characterized by the addition of isocyanic acid to amino groups, that is associated with ageing. Carbamylated proteins exert deleterious effects in vivo and are involved in the progression of several diseases, including atherosclerosis and chronic kidney disease. Therefore, there is a growing interest to evaluate the carbamylation rate of blood or tissue proteins, since carbamylation-derived products (CDPs) could be valuable biomarkers in these contexts. Homocitrulline (HCit), formed by isocyanic acid covalently attaches to the ε-NH₂ group of lysine residue side chain, is the most characteristic CDP. Carbamylation was shown to decrease the ability of type I collagen to polymerize into normal fibrils (Jaisson 2006). Preliminary data from our lab suggested a possible association between the Homocitrulline amount in cartilage and HOA. We observed in a human cadaver model that osteo-arthritic (OA) cartilage of the proximal inter-phalangeal joints and metacarpo-phalangeal joints of the hand seemed to have a carbamylation level higher than non OA cartilage.

Carboxymethylated lysines (CMLs) are another post-translational modification of proteins that tend to accumulate with ageing process. They belong to the advanced glycation products (AGEs). CMLs have been shown to accumulate with age in osteoarthritic knee cartilage, particularly in the case of diabetes, and have a negative impact on the mechanical properties of the cartilage and altered the inflammatory response of chondrocytes as recently reported in our lab.

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only
		File N° : DIGICOD-19- Edition 2019

We hypothesize that carbamylation and carboxymethylation of cartilage proteins could play a role in the cartilage degradation that is observed during hand OA or could be a reflect of diffuse OA. To address these questions, we aim to investigate an association between HCit and CML quantification in serum and the severity of structural damage of cartilage in a large patient sample with hand OA using the DIGICOD cohort.

Aim

The main objective of this study is to determine in a cohort of patients with symptomatic HOA according to the criteria of the American College of Rheumatology with a radiographic stage of Kellgren and Lawrence (KL) ≥ 2 on more than one joint, whether serum HCit and CML concentration are higher in patients with erosive OA than in patients with non-erosive OA since this more severe subtype may have a systemic component. We will search as well a correlation between the carbamylation and carboxymethylation processes and the radiographic severity of HOA at inclusion (including the global KL score, the number of erosive joints per patient, and the number of OA joints). Finally, we will investigate if carbamylation and carboxymethylation levels are higher in patients with multiple localizations of OA comparatively to patients with isolated hand involvement of OA.

Description of the project methodology

The patients included in our study will be the 420 patients included in the DIGICOD cohort with a serum sample available in the biological collection. 150 μ l of serum per patient from the biological collection to inclusion are required for the study.

Radiographic severity has been already assessed using the KL score and the Verbruggen score.

Serum HCit and CML concentrations will be measured by a liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method, in the CNRS laboratory (UMR 7369) MEDyC "Matrix ageing and vascular remodelling" unit in Reims in collaboration with Dr Stéphane JAISSON (Jaisson 2018).

Univariate and multivariate analysis (taking into account confounding factors modifying serum HCit and CML levels) will be performed to look for an association between this concentration and:

- erosive HOA defined by subchondral erosion or/and remodelling of subchondral plate on at least one PIPJ according to the Verbruggen–Veys (VV) anatomical phase score
- erosive HOA defined by subchondral erosion or/and remodelling of subchondral plate on at least two PIPJ according to the VV score
- markers of radiographic severity: global KL score, number of erosive joints per patient, and number of OA joints
- isolated hand OA versus diffuse OA

Expected results

The main objective is to determine the value of HCit and/or CML dosage as a marker associated with the radiographic severity of HOA. In addition, this study will determine whether carbamylation and/or carboxymethylation level of serum proteins are directly and independently associated with the structural severity of OA, since those post traductionnal

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only
		File N° : DIGICOD-19- Edition 2019

modifications level are known to be correlated with patient's age, creatinine clearance (for HCit) and associated presence of cardiovascular disease.

References (Optional)

Jaisson S, Lorimier S, Ricard-Blum S, Sockalingum GD, Delevallée-Forte C, Kegelaer G, Manfait M, Garnotel R, Gillery P. Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils. *Chem Biol.* 2006 Feb;13(2):149-59.

Jaisson S, Desmons A, Doué M, Gorisse L, Pietrement C, Gillery P. Measurement of Homocitrulline, A Carbamylation-derived Product, in Serum and Tissues by LC-MS/MS. *Curr Protoc Protein Sci.* 2018 Apr;92(1):e56.

* Ethic committee agreement:

5	Not justified
X	Obtained through DIGICOD cohort agreements
5	Need for a new agreement

Detailed scientific en technical description of the project :

Plan

- ▶ Title of the project
- ▶ Background
- ▶ Specific aims of the project
- ▶ Description of the research project (Patients, technical aspects, methodology)
- ▶ Expected results and potential impact
- ▶ Schedule

(To follow with 10 pages at most)

Title: Carbamylation-derived products in DIGICOD cohort: the serum level of homocitrullin as a potential biomarker of structural severity in hand osteoarthritis

1. Background

Hand osteoarthritis: from phenotypes to biomarkers

Osteoarthritis is the most common joint disease of the musculoskeletal system, leading to pain and functional limitations with high social and economic costs. Because its prevalence increases with age, the associated health-care costs for treating OA are expected to increase in the coming decades as the ageing population continues to grow. Hand OA is among one of the most prevalent OA phenotypes: after the age of fifty-five, two out of three women and one out of two men show signs of osteoarthritis on hand X-rays; among this population, 20% suffer from it. It is responsible for pain, digit stiffness and functional limitations leading to frustration in undertaking everyday activities. OA associates a degradation of articular cartilage, synovial inflammation, remodelling of the subchondral bone and the development of osteophytes. These structural alterations can be observed using radiography, ultrasonography or MRI. Radiographically, hand OA is characterized by joint space narrowing, osteophyte formation, subchondral sclerosis and subchondral cyst formation.

 DIGICOD	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

Physical signs of hand OA include 'nodes' of the affected IPJs (firm swellings over the superolateral and dorsal aspects of the distal interphalangeal joints (DIPJs) and proximal interphalangeal joints (PIPJs), known as Heberden and Bouchard nodes, respectively) and deformities such as squaring of the thumb base. Inflammation can produce redness, warmth, effusion and/or soft tissue swelling (1).

Individuals with hand OA can be divided into different subgroups depending on the joints in the hands that are affected; these subgroups consist of nodal OA, first carpometacarpal joint (CMCJ) OA and another presentation called erosive hand OA. First CMCJ OA is thought to occur most frequently, followed by nodal IPJ OA. However, apart from first CMCJ OA, which frequently occurs in isolation, there is considerable overlap in presentations among these subgroups, suggesting shared aetiologies (2). The main complaints of patients with digital nodal OA frequently are pain, joint swelling and deforming osteophytes leading to aesthetic discomfort.

Erosive hand OA defined radiographically by erosions or collapse of the subchondral bone plate results in local inflammatory flare-ups of the finger joints characterized by intense pain, inflammatory with nocturnal awakenings, evolving over several weeks. Increasing evidence suggest that this condition is a severe form of hand OA: patients have a higher clinical burden than non-erosive forms of hand OA, and the associated disability might be as severe as that associated with rheumatoid arthritis. Progression of synovitis, joint effusion and radiographic OA occurs more frequently in patients with erosive hand OA than in patients with non-erosive forms of hand OA. Moreover, patients with erosive hand OA have a higher level of inflammation (including a higher power Doppler activity, which is an indicator of the level of vascularization) than patients with non-erosive hand OA, suggesting that the inflammatory phenotype differs in erosive and non-erosive forms of hand OA (3).

Hand OA is a heterogeneous disorder and is considered to be multifactorial in aetiology (post-traumatic, metabolic, age-related). In the hand, and more specifically in the interphalangeal joints, the main risk factors are female gender, family history and heavy or repeated manual work (4, 5).

The main lines of current research focus on the biological mechanisms behind the degradation of cartilage with a view to proposing preventive or curative therapeutic solutions. There is currently no etiological treatment or biological therapeutic means of cartilage repair. The existing solutions are essentially symptomatic (analgesic or anti-inflammatory treatments, intra-articular injections of hyaluronic acid or corticoids) or palliative (replacement - by arthroplasty - or fusion of the joint - by arthrodesis). Thus, no surgical treatment can restore a painless joint, with physiological joint amplitudes and capable of undergoing physiological constraints over time.

Another target in research in the field of OA is identification of a biomarker that could help to make an overall assessment of the extent of OA and its potential severity. It could be used as a diagnosis or prognostic tool, and help to the medical decision making. Some biomarkers reflecting joint tissue metabolism and inflammation have been studied in hand OA (6). Some were identified as potential biomarkers of disease severity and progression (C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen, osteocalcin), others were shown to differentiate between erosive and non-erosive disease (Coll2-1, C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, hyaluronan, C-reactive protein, pentosidine, myeloperoxidase)(7-9). Thus, it seems possible to find serum biomarkers that could reflect at a systemic level (ie in the blood) the structural severity of hand OA.

Carbamylation: a post-translational molecular process involved in tissular alterations

The carbamylation (also called carbamoylation) of proteins is a post-translational modification that lead to alterations in their conformation and properties. It results from the irreversible and cumulative binding of isocyanic acid (of formula $\text{HN}=\text{C}=\text{O}$) to protein amino groups. This binding preferentially occurs on $\epsilon\text{-NH}_2$ groups of lysine residues, generating Homocitrulline (HCit), which is the most characteristic carbamylation-derived product (CDP). Their accumulation in the organism during the ageing process is a factor of senescence in tissues with a long half-life, as shown in patients with renal insufficiency in the kidneys (10). Thus it has been shown that the skin was the site of an accumulation of carbamylated type 1 collagen whose function and three-dimensional organization were altered (11). As the main proteic component of cartilage is type 2 collagen, we may hypothesize that similar alterations of biomechanical behaviour occur with age and CDPs accumulation. Arthropathy affecting the small joints of the hand has been increasingly recognized in the past few years as a complication of chronic renal failure treated by hemodialysis (12). As isocyanic acid mainly originates from the spontaneous dissociation of urea, systemic carbamylation rate is increased during renal failure. Moreover, plasma levels of homocitrulline were shown to be a coronary disease risk factor (13).

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

More studied, carboxymethylated lysines (CMLs) are another post-translational modification of proteins that tend to accumulate with ageing process. They belong to the advanced glycation products (AGEs). CMLs have been shown to accumulate with age in osteoarthritic knee cartilage, particularly in the case of diabetes, and have a negative impact on the mechanical properties of the cartilage and altered the inflammatory response of chondrocytes as recently reported in our lab (14). Moreover, from a systemic point of view, increased serum levels of AGEs were shown to be linked to several conditions such as non-alcoholic fatty liver disease (15), peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes (16) or insulin resistance in male nondiabetic patients with obstructive sleep apnea (17).

In light of those data, cartilage carbamylation could be associated with structural severity of OA, whether as an underlining mechanism of structural damage linked to the ageing progress, whether as a direct consequence of OA.

Preliminary data from the lab on carbamylation in OA tissues

In a current research project (PhD thesis of the applicant Dr A. Cambon-Binder, PhD supervisor: Pr J. Sellam) on a human cadaver model, we observed that the carbamylation level of the cartilage of proximal inter-phalangeal joints (PIPJ) and metacarpo-phalangeal joints (MCPJ) was higher in case of OA compared to non OA joints (unpublished data). Briefly, cartilage from the PIPJ and MCPJ of both hands was harvested from individuals (age: 60 to 90 years old) who had donated their bodies to the Ecole de Chirurgie de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (after ethical acceptance), and who had died less than 5 days ago. Cartilage was classified as healthy or osteoarthritic according to its macroscopic appearance as assessed using the Outerbridge (1961) classification, and according to the histologic Mankin grading system (Mankin 1971) on cartilage samples. Cartilages considered to be osteoarthritic were those classified as Outerbridge 3 or 4, and those classified as Outerbridge 1 or 2 with a Mankin score greater than 4. The cartilage was considered healthy if the Outerbridge grade was 1 or 2, and the Mankin grade between 0 and 4. Measurement of the levels of HCit relative to total lysine in cartilage samples from the same subjects by liquid chromatography coupled with mass spectrophotometry (LC-MS/MS) was performed in collaboration with Dr Stephane JAISSON (CNRS laboratory (UMR 7369) MEDyC "Matrix ageing and vascular remodelling" unit in Reims), who has extensive experience in this field, with numerous publications on the subject (18,19) and a previous collaboration with us on CML in OA (14). The results are expressed as a ratio between the amount of carbamylated lysines (HCit) and the amount of unaltered lysines (mmol/mol Lys). The mean rate of carbamylation seemed to be higher in osteoarthritic PIPJ cartilage (n=6) compared to non-arthritis samples (n=4), respectively 4.59 versus 3.39 mmol/mol Lysine (SEM=0.77 for both means). In osteoarthritic MCPJ (n=3) the mean rate of carbamylation was higher as well than in non-arthritis samples (n=7), respectively 6.11 versus 5.19 mmol/mol Lysine (SEM was respectively 1.73 and 1). We currently increase the number of samples to perform the statistical analyses.

We hypothesized that carbamylation and/or carboxymethylation of cartilage proteins could play a role in the cartilage degradation that is observed during hand OA and that such a process could be reflected at a systemic level by the HCit and CML quantified in the serum. To address this question, our first goal is to investigate an cross-sectional association between serum level of HCit and/or CML with the severity of structural radiographic damages in a large patient sample using the DIGICOD cohort. Moreover, since carbamylation is a systemic process that may be linked to OA, we may hypothesize that serum HCit and /or CML level is higher in case of diffuse OA compared to isolated hand OA (without any other peripheral OA localization (ie knee, hip)).

2. Specific aims of the project

The first objective of this study is to determine in a cohort of patients with symptomatic HOA whether serum HCit or CML concentration is higher in patients with erosive OA than in patients with non-erosive OA since this more severe subtype may have a systemic component.

Moreover, we will search a correlation between the carbamylation and carboxymethylation processes and the structural severity of hand OA estimated using X-rays at inclusion, whether or not independent of parameters that may alter serum concentrations of HCit (BMI, gender, kidney function, cardiovascular disorders).

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only
		File N° : DIGICOD-19- <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; padding-top: 5px;">Edition 2019</div>

Finally, we will investigate if carbamylation or carboxymethylation level is higher in patients with multiple localizations of OA comparatively to patients with isolated hand involvement of OA.

3. Description of the research project

❖ Patients

The study population includes the entire DIGICOD cohort at the inclusion (n=426) with a serum sample available in the biological collection (n=420). So this study will involve the 420 patients with serum available at the baseline visit.

Briefly, this cohort includes patients aged 35 years and older, with symptomatic digital osteoarthritis (pain or nodosity) in two joints among metacarpo-phalangeal joints and PIPJ or with thumb trapeziometacarpal joint, radiographic stage according to Kellgren-Lawrence (KL) ≥ 2 . Patients with destructive chronic inflammatory rheumatic disease, known chondrocalcinosis of the joints, gout, hand OA secondary to an infectious, traumatic or genetic cause were excluded.

❖ Technical aspects

The initial demographic, clinical and radiographic characteristics of the patients included in the study will be described.

Patients will be characterized according to the following criteria: age, sex, cardiovascular disease (hypertension or heart failure or myocardial infarction or stroke/transient ischemic attack or peripheral vascular pathology), kidney function according to the creatinine clearance, uricemia, number of symptomatic osteoarthritic sites (among knees, hips, cervical spine, lumbar spine, feet and shoulders).

A blood sample was performed at the time of the inclusion for serum storage. Serum HCit and CML concentrations will be measured by a liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method, in the CNRS laboratory (UMR 7369) MEDyC "Matrix ageing and vascular remodelling" unit in Reims in collaboration with Dr Stéphane JAISSE (20). For this study, 150 μ L of serum per patient from the biological collection at baseline visit are required. The results will be expressed as a ratio between the amount of carbamylated lysines (HCit) or CML and the amount of unaltered lysines (mmol/mol Lys).

All patients already underwent bilateral postero-anterior hand radiography at 100% at AP-HP Saint-Antoine Hospital.

Radiographic severity is assessed using

- (1) erosive HOA on at least one or two PIPJ according to the Verbruggen–Veys (VV) anatomical phase score, consisting of five phases with a numerical value representing the evolution of HOA (N, normal joint; S, stationary OA with osteophytes and joint-space narrowing; J, complete loss of joint space in the whole or part of the joint; E, subchondral erosion; R, remodelling of subchondral plate)
- (2) the global KL score (sum of the scores for all joints; range 0–128),
- (3) the number of OA joints (KL ≥ 2 ; range 1–32).

Such a comparison seems reliable since 46% of patients have an erosive hand OA (at least 1 erosive hand joint of IP) according to the Verbruggen score (phase E or R).

❖ Statistical analysis

Qualitative variables will be described by frequency and quantitative variables by mean and standard deviation (or median and range if applicable). The distribution of quantitative variables will be checked. A logarithmic transformation will be performed for variables that do not have a Gaussian distribution.

We will compare serum HCit and CML level and demographic and clinical parameters between the erosive and non-erosive OA groups. First univariate analysis will be done and serum HCit level will be compared between

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only
		File N° : DIGICOD-19- <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Edition 2019</div>

erosive and non-erosive HOA at baseline by a student t-test or a non-parametric test using univariate. The erosive definition of hand OA will be at least 1 interphalangeal joint being in phase E or R according to the Verbruggen score. Second multivariate analyses (ie multiple linear regression analyses) including variables that differed between the 2 groups (erosive versus non erosive hand OA) with $p < 0.15$. Since carbamylation level is correlated with patient's age, creatinine clearance and associated presence of cardiovascular disease, multiple linear regression analysis will include for adjustment all these parameters if such correlation or association are confirmed in the DIGICOD cohort.

Creatinine clearance will be calculated using the Modification of the Diet in Renal Disease study equation (MDRD): $GFR (mL/min/1.73 m^2) = 175 \times (SCr)^{-1.154} \times (Age)^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.212 \text{ if African American})$ (conventional units) where GFR is glomerular filtration rate, SCr is creatinine in mg/dl, and age is expressed in years (21). Cockcroft and Gault formula has a poorer reliability in patients above 70 years old.

Similar analysis will be done using the second definition of erosive hand OA that is more stringent (at least 2 interphalangeal joints in phase E or R according to the Verbruggen score).

Additional analyses will be done to search for a correlation or association between serum HCit and CML level and radiographic severity of HOA:

- correlation between serum HCit and CML level and the global KL score per patient (sum of the scores for all joints; range 0–128).
- correlation between serum HCit and CML level and number of digital OA joints (KL ≥ 2) per patient
- correlation between serum HCit and CML level and the number of erosive joint per patient (defined as phase E or R using the Verbruggen score)

Adjustment will be done on patient's age, creatinine clearance and presence of cardiovascular disease.

Exploratory analyses will involve comparison of serum HCit and CML level between isolated patients with HOA and patients with other OA localization: at least one among hip or knee, joints using a Student t-test or a nonparametric test, as appropriate.

Analysis will be adjusted with age, loss of kidney function ($GFR \leq 60 mL/min/1.73 m^2$ meaning mild to severe loss of function), cardiovascular disorder (coronary disease, stroke) and other parameters that will differ between the 2 groups with a p -value < 0.15 .

Anticipated number of individuals to be included in the research

Since our study is an exploratory analysis to be carried out on the whole population, no subject calculation is necessary. We will study all patients from the DIGICOD cohort with a serum sample available at inclusion.


Anticipated Statistical Significance

All tests will be carried out in a bilateral situation with a first species risk of 5%.

4. Expected results and potential impact

We expect to observe a link between the systemic level of carbamylation and carboxyméthylation and the severity of radiographic HOA. Moreover, we expect that patients with erosive HOA will show higher levels of carbamylation than the non-erosive HOA counterpart. It could lead to the identification of a potential biomarker of structural damage in HOA. Such a biomarker of hand OA could help to diagnose the disease earlier, to distinguish patients with erosive and non-erosive forms, to assess disease severity or to predict its future progression. Moreover, such results would indicate a role of carbamylation in the joint degradation process occurring in HOA.


Finally this study would also allow an enrichment of the DIGICOD database with the possibility of correlating these assays with other markers assayed in the same biological collection such as serum biomarkers of cartilage

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

degradation. A study concerning the predictive role of serum carbamylation or carboxymethylation level could be proposed in a second stage using longitudinal data corresponding to the follow-up of patients and their evolution.

5. References

1. Marshall M, Watt FE, Vincent TL, Dziedzic K. Hand osteoarthritis: clinical phenotypes, molecular mechanisms and disease management. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Nov;14(11):641-656.
2. Marshall M, Peat G, Nicholls E, van der Windt D, Myers H, Dziedzic K. Subsets of symptomatic hand osteoarthritis in community-dwelling older adults in the United Kingdom: prevalence, inter-relationships, risk factor profiles and clinical characteristics at baseline and 3-years. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Nov;21(11):1674-84.
3. Haugen IK, Mathiessen A, Slatkowsky-Christensen B, Magnusson K, Bøyesen P, Sesseng S, van der Heijde D, Kvien TK, Hammer HB. Synovitis and radiographic progression in non-erosive and erosive hand osteoarthritis: is erosive hand osteoarthritis a separate inflammatory phenotype? *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Apr;24(4):647-54.
4. Kalichman L, Hernández-Molina G. Hand osteoarthritis: an epidemiological perspective. *Semin Arthritis Rheum*. 2010;39(6):465-476.
5. Bijsterbosch J, Meulenbelt I, Watt I, Rosendaal FR, Huizinga TW, Kloppenburg M. Clustering of hand osteoarthritis progression and its relationship to progression of osteoarthritis at the knee. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):567-572.
6. Ramonda R, Lorenzin M, Modesti V, Campana C, Ortolan A, Frallonardo P, Punzi L. Serological markers of erosive hand osteoarthritis. *Eur J Intern Med*. 2013 Jan;24(1):11-5.
7. Punzi L, Ramonda R, Deberg M, Frallonardo P, Campana C, Musacchio E, Henrotin Y. Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Jun;20(6):557-61.
8. Punzi L, Ramonda R, Oliviero F, Sfriso P, Mussap M, Plebani M, Podswiadek M, Todesco S. Value of C reactive protein in the assessment of erosive osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis*. 2005 Jun;64(6):955-7.
9. Lennerová T, Pavelka K, Šenolt L. Biomarkers of Hand Osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2018, 38 (5), 725-735.
10. Kraus LM, Gaber L, Handorf CR, Marti HP, Kraus AP. Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage. *2001 Swiss Med. Wkly*. 131, 139–144.
11. Jaisson S, Lorimier S, Ricard-Blum S, Sockalingum GD, Delevallée-Forte C, Kegelaer G, Manfait M, Gamotel R, Gillery P. Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils. *Chem Biol*. 2006 Feb;13(2):149-59.
12. Cotten A, Flipo RM, Boutry N, Cortet B, Chastanet P, Foissac-Gegoux P, Delcambre B. Natural course of erosive arthropathy of the hand in patients undergoing hemodialysis. *Skeletal Radiol*. 1997 Jan;26(1):20-6.

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

13. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, Reynolds WF, Topol EJ, DiDonato JA, Hazen SL. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 2007;13: 1176–84.
14. Trellu S, Courties A, Jaisson S, Gorisse L, Gillery P, Kerdine-Römer S, Vaamonde-Garcia C, Houard X, Ekhirch FP, Sautet A, Friguet B, Jacques C, Berenbaum F, Sellam J. Impairment of glyoxalase-1, an advanced glycation end-product detoxifying enzyme, induced by inflammation in age-related osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2019 Jan 11;21(1):18.
15. Palma-Duran SA, Kontogianni MD, Vlassopoulos A, Zhao S, Marganti A, Georgoulis M, Papatheodoridis G, Combet E. Serum Levels of Advanced Glycation End-Products (AGEs) and the Decoy Soluble Receptor for AGEs (sRAGE) Can Identify Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Age-, Sex- And BMI-matched Normo-Glycemic Adults. *Metabolism* 2018 (83):120-127.
16. Aubert CE, Michel PL, Gillery P, Jaisson J, Fonfrede M, Morel F, Hartemann A, Bourron O. Association of Peripheral Neuropathy With Circulating Advanced Glycation End Products, Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products and Other Risk Factors in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2014; 30 (8), 679-85.
17. Xu JX, Cai W, Sun JF, Liao WJ, Liu Y, Xiao JR, Zhu LY, Liu JY, Zhang W. Serum Advanced Glycation End Products Are Associated With Insulin Resistance in Male Nondiabetic Patients With Obstructive Sleep Apnea. *Sleep Breath* 2015;19 (3), 827-33.
18. Jaisson S, Pietrement C, Gillery P. Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers. *Adv Clin Chem*. 2018;84:1-38.
19. Jaisson S, Kazes I, Desmons A, Fadel F, Oudart JB, Santos-Weiss IC, Millart H, Touré F, Rieu P, Gillery P. Homocitrulline as marker of protein carbamylation in hemodialyzed patients. *Clin Chim Acta*. 2016 Sep 1;460:5-10.
20. Jaisson S, Desmons A, Doué M, Gonisse L, Pietrement C, Gillery P. Measurement of Homocitrulline, A Carbamylation-derived Product, in Serum and Tissues by LC-MS/MS. *Curr Protoc Protein Sci*. 2018 Apr;92(1):e56.
21. Levey AS, Bosch JP, Breyer Lewis J, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine : A new prediction equation. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70.

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only
		File N° : DIGICOD-19- Edition 2019

TASK OF THE PRINCIPAL INVESTIGATOR AND CONTRIBUTION OF EACH PARTNER:

(Task of each partner)

► Principal investigator:

Organization of the project, working meetings
 Writing the synopsis and statistical analysis plan
 Interpretation of results
 Discussion
 Writing the article

► Partners (optional):

The co-investigators:

Jérémie Sellam

design of the project and help in the interpretation of the results, proofreading of the analysis plan and the final manuscript

Stéphane Jaisson

LC-MS/MS expert, reflection on the project and help in the interpretation of the results, proofreading of the analysis plan and the final manuscript

PUBLICATIONS OF THE PRINCIPAL INVESTIGATOR:
► 5 Main publications:


- Non invasive bioluminescent quantification of viable stem cells in engineered constructs. Oudina K, Cambon-Binder A, Logeart-Avramoglou D. *Methods Mol Biol.* 2011;740:165-78.
- Ischemia is the prime but not the only cause of hMSC death in tissue engineered constructs in vivo. Cambon-Binder A, Becquart P, Monfoulet LE, Bourguignon M, Vandamme K, Bensidhoum M, Petite H, Logeart-Avramoglou D. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(19-20):2084-94.
- Anatomical study of the musculocutaneous nerve branching pattern: application for selective neurectomy in the treatment of elbow flexors spasticity. Cambon-Binder A, Lecleq C. *Surgical and Radiological Anatomy.* 2015 May;37(4):341-348.
- Pulse less supracondylar humeral fractures in children: vascular complications in a 10-year series. Cambon-Binder A, Jehanno P, Tribout L, Valenti P, Simon AL, Ilharberorde B, Mazda K. *International Orthopaedics.* 2018 Apr;42(4):891-899.
- Bipolar transfer of the pectoralis major muscle for restoration of elbow flexion in 29 cases. Cambon-Binder A, Walch A, Marcheix PS, Belkheyar Z. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery.* 2018 Nov;27(11):e330-e336.

► Publications linked to the theme of the project:

None yet

ESTIMATED BUDGET FOR THE RESEARCH PROJECT:

The URC-Est de Saint-Antoine, involved in the implementation and monitoring of the DIGICOD cohort, will be in charge of statistical analyses (budget included in the funding of the DIGICOD cohort).

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

1. Total budget: 5100 euros **Estimated duration of the project: 4 months.....**

No new radiographic analysis is required for this study.
 The statistical analysis of the data will be performed in collaboration with the URC-Est.

► **Equipment costs:**

Reagents cost for LC-MS/MS is 10 euros HT per sample
 For 430 patients the serum measurements will cost 4300 euros
 Shipping of the samples in dry ice to CNRS Laboratory of Reims: 300 euros
 Identification and obtention of serum from the Centre des Ressources Biologiques: 500 euros

► **Operating costs:**

Technicians for HCit measurement: included in the collaboration with Jaissou's team (zero euros)

► **Salary / grants:**

.....

2. Budget obtained with other Institutions:

3. Budget requested through other institutions:

.....

DATA WHICH ARE NECESSARY FOR THE COMPLETION OF THE RESEARCH PROJECT:

Which data do you need?

NUMBER OF PATIENTS: 430.....

BIOLOGIC DATA (stored serum, DNA)

No new dosage will be necessary for this study, we will use the dosages carried out in routine care (CRP in particular).

IMPORTANT: A wrong justification of the requested quantities/volumes could compromise the acceptance of the scientific project

X Serum

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

Visit	M0	M36	M72
Volume requested :	150µl		

Justification :

Homocitrulline and CML concentration will be measured in serum of patients of the cohort. The DIGICOD cohort is a representative sample of subjects with symptomatic digital osteoarthritis and the largest cohort in France of patients with digital OA. It is therefore considered relevant to answer the research question posed. An additional interest of this cohort is to collect numerous clinical, radiographic and biological characteristics that will make it possible to study the impact of Homocitrulline concentration on both the functional and structural levels.

.....

DNA

Quantity requested:

Justification :

.....

RADIOLOGIC DATA (stored images)

No further radiographic analysis will be required for this study since the radiographs taken at the first visit are already analyzed. We will use the data already available in the database.

IMPORTANT: A wrong estimation of the requested number of patients with radiological data could compromise the acceptance of the scientific project

IMPORTANT: Checking one of the following boxes will mean that you require the original CDs of the films in order to perform yourself the reading

Radiological data (X-rays)

Visit	M0	M36	M72
	X		

Justification : ...For decades, radiography has been used to determine the presence and severity of hand OA and to examine disease progression in both clinical and research settings: In the current project, assessment of the severity of HOA from a structural point of view is fundamental.....

.....

MRI (50 patients)

	Scientific and Technical Description	For scientific committee only File N° : DIGICOD-19-
		Edition 2019

Visit	M0

Justification :

Ultrasound (50 patients)

Visit	M0

Justification :

JUSTIFICATIONS FOR USING DATA FROM THE DIGICOD COHORT

Please provide the reasons why your research needs to be performed specifically on the DIGICOD cohort.

The DIGICOD cohort is a French monocentric routine care cohort, a representative sample of subjects with symptomatic digital osteoarthritis well phenotyped. Its objectives include determining the clinical, biological or radiographic factors predictive of the clinical evolution and radiographic progression of digital osteoarthritis. This cohort, which is the largest cohort in France of patients with digital osteoarthritis, is therefore considered relevant to answer the research question posed.

STATING ON HONOUR :

I, the undersignedAdeline Cambon-Binder....., will hereby fulfil the following commitments:

- I will mention the name « DIGICOD » in the title or subtitle of all publications relating on DIGICOD cohort
- I will address related publications to DIGICOD board 3 weeks before submission.

Name of the principal investigator:

Adeline Cambon-Binder

Signature:

