



HAL
open science

Rôle des chondrocytes hypertrophiques dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose : implication du SDF-1 dans l'angiogenèse

Indira Toillon

► To cite this version:

Indira Toillon. Rôle des chondrocytes hypertrophiques dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose : implication du SDF-1 dans l'angiogenèse. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS490 . tel-03719532

HAL Id: tel-03719532

<https://theses.hal.science/tel-03719532>

Submitted on 11 Jul 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 de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique – ED 394

Centre de Recherche Saint-Antoine – INSERM UMR_S 938 / Equipe du Pr F. Berenbaum

« Pathologies articulaires associées aux maladies métaboliques et à l'âge »

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

Implication du SDF-1 dans l'angiogenèse

Par Indira TOILLON

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par le Professeur Xavier HOUARD

Présentée et soutenue publiquement le 11 octobre 2021

Devant un jury composé de :

Dr Nicolas VENTECLEF, DR

Pr Rik LORIES, PU-PH

Dr Frédéric MALLEIN-GERIN, DR

Pr Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, PU-PH

Dr Sarah BECK-CORMIER, CR

Pr Francis BERENBAUM, PU-PH

Pr Xavier HOUARD, PU

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Invité

Directeur de thèse

Rôle des chondrocytes hypertrophiques dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose : implication du SDF-1 dans l'angiogenèse

Résumé

L'arthrose est la pathologie musculosquelettique la plus fréquente et touche l'ensemble des tissus de l'articulation. Au cours de cette pathologie, une dégradation progressive du cartilage articulaire est observée suite à la protéolyse de sa matrice extracellulaire mais également suite à la réactivation du processus d'ossification endochondrale. En effet, l'articulation arthrosique est le siège d'une différenciation hypertrophique des chondrocytes, d'une minéralisation du cartilage articulaire, d'une angiogenèse à la jonction os/cartilage et d'un remodelage pathologique de l'os sous-chondral. L'angiogenèse ostéochondrale pourrait jouer un rôle central dans la progression de la pathologie mais les acteurs moléculaires responsables de la vascularisation du cartilage sont encore méconnus. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'angiogenèse par l'Aflibercept, qui cible le VEGF, ne limitait que partiellement la progression de l'arthrose dans un modèle d'arthrose post-traumatique chez le rat. Nous pensons que la différenciation des chondrocytes de la couche profonde du cartilage, les chondrocytes pré-hypertrophiques, en chondrocytes hypertrophiques pourrait contribuer au remodelage de la jonction ostéochondrale.

Grâce à un nouveau modèle de différenciation progressive de chondrocytes murins en culture primaire qui permet l'obtention de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, nous avons évalué le potentiel angiogénique et ostéoclastogénique des différents phénotypes chondrocytaires. L'expression de facteurs pro-angiogéniques et ostéoclastogéniques augmentent avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes tandis que celle de facteurs anti-angiogéniques diminue. Nous avons examiné le rôle biologique des chondrocytes dans le remodelage de la jonction ostéochondrale en comparant les capacités angiogéniques et ostéoclastogéniques des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Nous avons montré que les chondrocytes hypertrophiques stimulaient davantage la différenciation de monocytes RAW264.7 en ostéoclastes que les chondrocytes pré-hypertrophiques. A l'aide de différents tests fonctionnels modélisant *in vitro* les différentes étapes du processus d'angiogenèse, nous avons évalué la capacité angiogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Par un test d'adhérence de cellules endothéliales fluorescentes aux chondrocytes en culture, nous avons montré que les cellules HUVEC adhèrent davantage aux matrices extracellulaires de chondrocytes hypertrophiques qu'aux matrices de chondrocyte pré-hypertrophiques. Nos résultats montrent également que les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques stimulent la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules HUVEC tandis que les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques ne présentent que peu d'effets sur l'angiogenèse. Nous avons identifié le facteur SDF-1, présent dans le cartilage arthrosique et notamment au niveau des clusters de chondrocytes hypertrophiques, comme étant à l'origine des effets pro-angiogéniques des chondrocytes hypertrophiques et démontré son implication dans l'angiogenèse en inhibant l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100.

Ainsi, la différenciation hypertrophique des chondrocytes pourrait participer aux mécanismes de remodelage de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose.

Mots clés

Arthrose – Différenciation hypertrophique – Chondrocyte – Angiogenèse – Ostéoclastogenèse

Role of hypertrophic chondrocytes in the pathological remodeling of the osteochondral junction during osteoarthritis: involvement of SDF-1 in angiogenesis

Abstract

Osteoarthritis is the most common musculoskeletal disease and affects all tissues of the joint. During the pathology, a progressive degradation of the articular cartilage is observed following the proteolysis of its extracellular matrix but also following the reactivation of endochondral ossification process. Indeed, the osteoarthritic joint is the site of hypertrophic differentiation of chondrocytes, mineralization of articular cartilage, angiogenesis at the bone/cartilage junction and pathological remodeling of the subchondral bone. Osteochondral angiogenesis could play a pivotal role in the progression of the pathology but the molecular actors responsible for cartilage vascularization are still unknown. We have shown that inhibition of angiogenesis by Aflibercept, which targets VEGF, only partially limited the progression of osteoarthritis in a rat model of post-traumatic osteoarthritis. We believe that differentiation of pre-hypertrophic chondrocytes, present in the deep layer of cartilage, into hypertrophic chondrocytes may contribute to the remodeling of the osteochondral junction.

Using a new model of progressive differentiation of murine chondrocytes in primary culture, which allows the production of pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes, we evaluated the angiogenic and osteoclastogenic potential of the different phenotypes of chondrocyte. The expression of pro-angiogenic and osteoclastogenic factors increase with hypertrophic differentiation of chondrocyte while that of anti-angiogenic factors decrease. We examined the biological role of chondrocytes in the remodeling of the osteochondral junction by comparing the angiogenic and osteoclastogenic capacities of pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes. We showed that hypertrophic chondrocytes stimulated more the differentiation of RAW264.7 monocytes into osteoclast than pre-hypertrophic chondrocytes. Using different functional assays modelling the different steps of the angiogenic process *in vitro*, we evaluated the angiogenic capacity of pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes. With an adherence assay of fluorescent endothelial cells to chondrocytes in culture, we showed that HUVEC cells adhere more to hypertrophic chondrocyte extracellular matrices than to pre-hypertrophic chondrocytes matrices. Our results also show that hypertrophic chondrocyte-conditioned media stimulate HUVEC cell proliferation, migration and tube formation, whereas pre-hypertrophic chondrocyte-conditioned media show little effect on angiogenesis. We identified the SDF-1 factor, present in osteoarthritic cartilage and particularly in hypertrophic chondrocyte clusters, as the source of the pro-angiogenic effects of hypertrophic chondrocytes and demonstrated its involvement in angiogenesis by inhibiting the SDF-1/CXCR4 axis by AMD3100.

Thus, hypertrophic differentiation of chondrocytes could participate in the remodeling mechanisms of the osteochondral junction during osteoarthritis.

Keywords

Osteoarthritis – Hypertrophic differentiation – Chondrocyte – Angiogenesis – Osteoclastogenesis

A tous ceux qui m'ont vu grandir...

« La vie est une pièce de théâtre : ce qui compte, ce n'est pas qu'elle dure longtemps, mais
qu'elle soit bien jouée »
— Sénèque (Les Lettres à Lucilius)

« Observer, c'est perturber »
— Hubert Reeves (Patience dans l'azur)

« Chaque fois que nous récoltons un renseignement, les choses se compliquent un peu plus »
— Agatha Christie (Mrs McGinty est morte)

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr Bruno Fève, directeur du Centre de Recherche Saint-Antoine, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité UMR_S938, pour ma thèse, mais également pour mon premier stage de recherche, dans son équipe.

Je remercie le Dr Nicolas Venteclef d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que président du jury, après avoir suivi l'avancée de mes travaux de recherche durant ces 4 années, en tant que tuteur représentant de l'école doctorale.

Je remercie grandement le Pr Rik Lories et le Dr Frédéric Mallein-Gérin d'avoir accepté avec entrain d'être les rapporteurs de ma thèse et pour avoir évalué ce manuscrit. Merci pour le temps et l'énergie que vous m'avez consacrés.

Je remercie également chaleureusement le Pr Marie-Hélène Lafage-Proust d'avoir accepté d'examiner ma thèse et d'apporter toute son expertise sur mes travaux de recherche, ainsi que le Dr Sarah Beck-Cormier d'avoir participé à mes 3 comités de suivi de thèse, pour nos différents échanges lors des congrès et d'avoir répondu favorablement à mon invitation pour être examinatrice de mon travail de thèse.

J'exprime toute ma gratitude envers le Pr Francis Berenbaum, directeur de notre équipe de recherche, pour l'enthousiasme dont il fait preuve à chaque nouvelle arrivée dans l'équipe, pour son dynamisme et son entrain communicatif. Merci pour vos encouragements à persévérer, explorer de nouvelles voies, collaborer pour enrichir nos travaux ainsi que pour votre vision de la science et de la recherche.

Je témoigne toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse, le Pr Xavier Houard, pour m'avoir soutenue et accompagnée au cours de ces 4 années de thèse. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour ton aide, ta pédagogie et tes conseils qui n'ont jamais manqué. Je te remercie pour l'autonomie que tu m'as donnée, qui m'a permis de gagner en assurance, de m'affirmer et donc de grandir. Tu as été un véritable encadrant et je suis fière d'avoir fait partie de tes doctorants.

J'adresse un très grand merci à l'ensemble des membres du labo, la fameuse « *team FB* ». Petite équipe grandissante qui a constitué une seconde famille, par les liens forts qui nous unissent. Merci à Jérémie Sellam, pour ses conseils et son intérêt aux différents projets lors de nos réunions d'équipe. Claire Attali, je te remercie pour les délicates attentions que tu as eues à mon égard, pour ton soutien et tes mots, toujours très justes. Aux piliers de cette équipe, celles qui nous apprennent les bases de la paillasse, le fonctionnement d'un laboratoire, celles que l'on nomme simplement les ITA mais qui contribuent grandement à la cohésion d'une équipe. Kristell Wanherdrick, on est arrivée à peu près en même temps au 5^{ème} étage de Kourilsky, en 2017, et tu seras d'accord pour dire qu'on est bien tombé. Beaucoup seront du même avis que moi, on apprécie tous ton humour, ton franc-parler et toute l'énergie que tu mets au profit de notre équipe. Laure Sudre, ma voisine montrougiennne, merci pour ta douceur et ton sourire communicatif, je suis ravie d'avoir croisé ton chemin. Le monde de la recherche ne te quittera

jamais et j'espère que tu trouveras la place que tu mérites. Audrey Pigenet, la mémoire du laboratoire, celle qui connaît tout l'historique du labo et qui a toujours des anecdotes à raconter, je te remercie pour le temps que tu m'as accordé alors que je découvrais le monde de l'arthrose. Peut-être qu'après avoir scoré des dizaines et des dizaines de lames ensemble, on pogotera toutes les deux devant un groupe de death métal chevelu-néo-indus-grunge-symphonic-glam-punk que personne ne comprendra à part nous ! Votre bureau restera toujours le QG et *the place to be* pour rigoler et manger !

Aux anciennes et actuelles doctorantes de l'équipe, merci d'avoir partagé le bureau des étudiantes et tant de bons moments ensemble. Adeline Cambon-Binder, celle qui opère plus vite que son ombre mais avec un respect et une minutie sans égal, merci pour tes explications en pièce de chirurgie, je n'ai même pas tourné de l'œil tellement j'ai été absorbée par tes gestes précis. Alice Courties, je te souhaite beaucoup de courage pour la longue et belle carrière que tu as entrepris, je ne doute pas de ta réussite. Marie Binvignat, la reine de la Big data, merci d'avoir contribué à l'exploitation de mes données, je te souhaite une belle aventure américaine ! Coralie Meurot, bientôt aussi parisienne que lilloise, bon courage pour cette dernière année de thèse. Marion Millerand, tu étais la doctorante par excellence, qui se souciait aussi bien du bien-être et de la place des doctorants que de ses cellules en culture, des chondrocytes, des macrophages, des synoviocytes, tu les as tous orchestré à la perfection. J'espère que la nouvelle voie que tu as prise te remplira de bonheur et de poney. Ilhem Lilia Jaabar, tu es arrivée chimiste, tu repartiras biologiste ! Un immense merci pour ta joie et ta bonne humeur qui ont littéralement irradié le 5^{ème} étage. Maintenant, c'est toi « la plus vieille » du labo ! Je te souhaite de vivre de belles aventures, l'année 2022 sera riche en émotions et je suis heureuse de pouvoir partager ces beaux moments à tes côtés.

Les post-docs anciennes et actuelles du labo, merci pour votre aide et pour m'avoir enseigné tout ce qu'il faut savoir pour travailler en laboratoire. Maria-Luís Pérez-Lozano et Natalia Zapata-Linares, merci pour les petits-déjeuners à l'espagnole, les paellas sans chorizo et la bonne humeur ibérique/sud-américaine. Natalia, tu m'as appris les bons gestes, mais tu as été plus qu'une collègue de travail. Merci pour tous les moments passés ensemble, au labo, au bureau, en congrès, je suis sincèrement heureuse d'avoir croisé ton chemin. Je te souhaite une belle carrière dans la recherche. Tu es maintenant parfaitement bilingue en français, peut-être qu'un jour, je me remettrais à l'espagnol, jajaja. Pauline Cornette, 2^{ème} chimiste qui est tombée dans la biologie, merci pour ton esprit affuté, pour tes précieux conseils et pour ton écoute.

Un grand merci à toutes celles et ceux qui sont passés par le labo, en stage, qui ont égayé les longues journées de travail, Ana, Sinthuya, Sandya, Bhumika, Sarah, Manon, Paul, Alexis(s), Juliette, Inès et Jaouhara. Merci à Morgane et Marie-Laure avec qui j'ai partagé un bout de paillasse et qui m'ont aidé avec les chondrocytes récalcitrants.

A toute l'équipe Le Bouc/Netchine, avec qui nous partageons l'étage et les bureaux. Et plus particulièrement à Charlène Delmas, merci pour ton énorme soutien, pour tous les déjeuners à papoter. Tu as fait partie de ces personnes qui ont compté au cours de ces années et qui compteront encore à l'issue de la thèse. Tu me suis de quelques semaines alors je te souhaite beaucoup de courage, notamment pour la suite, je suis certaine que tu trouveras la voie qui te correspondra. Merci à Céline Selenou d'être toujours aussi enjouée et pleine d'entrain, tu

illumines partout où tu passes. Merci également à Yves Le Bouc, pour ses encouragements et sa sympathie. Je remercie les membres de l'équipe Prunier du 4^{ème} étage, avec qui nous partageons la salle de culture, et principalement Nawel Kaabi pour son sourire et sa bonne humeur qui égaye les longues journées passées à s'occuper des cellules.

Je n'oublie pas le Dr Véronique Béréziat et Martine Auclair, qui ne m'ont pas connu en thèse, mais lors de mon 1^{er} stage en laboratoire au CRSA, et qui m'ont fait découvrir le monde de la recherche. C'est grâce à vous que mon envie de travailler dans la recherche s'est concrétisée et j'éprouve une profonde gratitude envers vous, pour m'avoir laissé ma chance.

Je remercie celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse. Le Dr Eric Hay de l'hôpital Lariboisière, pour notre collaboration chondrocytes/ostéoclastes. Romain Morichon, de la plateforme de microscopie, grâce à toi j'ai pu mettre en place tout ce que j'avais à l'esprit. J'ai découvert le monde de la microscopie, où se mêlent platine, objectif, condenseur, soft, stack, macro, channel, et tant d'autres termes dont je ne connais pas le sens. Merci pour ton œil d'expert et tes conseils. Merci également à toute l'équipe de la PHEA, l'animalerie, menée avec brio par Tatiana Ledent. Merci aux zootechniciens qui m'ont assisté lors des expérimentations sur les rats, Alizée Guyomard et Timothé Coulais, des mains de velours dans des gants de latex. Je remercie le Dr Annette K. Larsen pour m'avoir fourni des flacons d'Aflibercept, ainsi que Sandrine Thouroude, maintenant docteure, qui m'a aidé à mettre au point le test d'angiogenèse en 2 dimensions, qui me donnait du fil à retordre. Merci également à Haquima El Mourabit pour m'avoir donné des petits conseils dans la manipulation des rats et pour m'avoir laissé suturer ses propres rats, j'ai ainsi pu me découvrir ce nouveau modèle d'étude avec (presque) aucune appréhension.

Je remercie mes acolytes du CRSA, maintenant tous docteurs, avec qui j'ai formé une joyeuse petite équipe, plus connue sous le nom de « Poudlargenne » puis « PhD Planner », Marion Millerand, Pauline Bardin, Jennifer Gorwood, Camille Bourgneuf, Emilie Capel et Grégoire Stym-Popper. Merci pour tous les déjeuners, les réunions prévues pour l'organisation du séminaire annuel du CRSA qui se sont transformées en grand n'importe-quoi ! Merci pour les gommettes, les paillettes, les devinettes, les cachettes, les chansonnettes, les pauses cafè', les petites fêtes... On a formé une belle brochette !

A mes copines de PAES, Irina et Tipi, nos chemins se sont un peu écartés depuis 10 ans (et oui déjà !) mais vous restez dans mon cœur.

Enfin, je pense fort à ma famille, mes parents Vijai et Patrice, mes petits frères Sanjay et Rajiv, qui je l'espère seront fiers de moi et qui découvriront peut-être une facette qu'ils n'imaginaient pas. A celles et ceux qui sont un peu plus loin et que je n'oublie pas, ma grand-mère *vovó* Xindú, mes tantes, *tia* Rita, Vanita, Sandra, Rupa et Nikita, mes oncles, *tio* Babush, Dilip et Paulo, et mes cousines et cousins, *prima* Divia, Sheila, Neha et Anjali, *primo* Rohan et Raúl. *Obrigado por todo*. Une pensée très émue pour mes grands-parents *vovô* Subraya, pépé Aimé et mémé Rolande ♡. Julien, je termine par toi, puisqu'après tant d'années, je considère que l'on forme une famille. Merci pour ton soutien, sans toi je serais encore en train de réviser les partiels de L3. On a vécu l'aventure de la thèse ensemble, chacun à sa manière, et j'espère l'on vivra encore pleins d'autres aventures, plus belles les unes que les autres.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	7
TABLE DES FIGURES	13
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	17
PARTIE I - L'ARTICULATION SYNOVIALE	18
1. LES DIFFERENTS TYPES D'ARTICULATION	18
2. STRUCTURE ET FONCTION DE L'ARTICULATION SYNOVIALE DU GENOU	19
3. DEVELOPPEMENT DE L'ARTICULATION	21
3.1. <i>Embryologie du système squelettique</i>	21
3.1.1. Formation et évolution des somites	21
3.1.2. Formation du squelette axial	22
3.1.3. Développement des membres supérieurs et inférieurs.....	23
3.1.4. Formation des articulations synoviales.....	23
3.2. <i>Les processus d'ossification</i>	24
3.2.1. Ossification intramembraneuse	25
3.2.2. Ossification endochondrale	26
a. Elaboration de la maquette cartilagineuse intermédiaire	26
b. La plaque de croissance.....	27
4. LES DIFFERENTS TISSUS DE L'ARTICULATION SYNOVIALE.....	32
4.1. <i>Le cartilage articulaire</i>	32
4.1.1. Composition et structure du cartilage articulaire.....	33
a. Les chondrocytes.....	33
b. La matrice extracellulaire.....	34
c. Architecture du cartilage articulaire	38
4.1.2. Homéostasie du cartilage	40
a. Maintien du phénotype des chondrocytes	41
b. Charge mécanique.....	42
c. Propriétés avasculaires du cartilage articulaire et hypoxie	43
4.2. <i>Le tissu osseux</i>	49
4.2.1. Structure et fonctions de l'os.....	49
4.2.2. Les cellules de l'os	51
a. Les cellules d'origine mésenchymateuse	51
b. Les cellules d'origine hématopoïétique.....	54
4.2.3. La matrice extracellulaire de l'os	56
a. La phase organique	57
b. La phase minérale	57
4.2.4. Cycle de remodelage osseux	58
4.3. <i>La membrane synoviale</i>	60
4.3.1. Structure et fonction.....	60

4.3.2.	Composition de la membrane synoviale.....	61
4.4.	<i>Les autres tissus de l'articulation</i>	62
4.4.1.	La moelle osseuse	62
4.4.2.	Les tissus adipeux intra-articulaires	63
4.4.3.	Les ménisques	64
4.4.4.	Les ligaments et tendons	65
PARTIE II - L'ARTHROSE.....		66
1.	ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES DE L'ARTHROSE.....	66
1.1.	<i>Epidémiologie et définition</i>	66
1.2.	<i>Prévalence</i>	67
1.3.	<i>Diagnostic</i>	68
1.4.	<i>Traitements</i>	69
1.5.	<i>Facteurs de risque</i>	70
1.5.1.	Les facteurs de risques non modifiables.....	70
a.	Le vieillissement	70
b.	Le genre	71
c.	Les facteurs génétiques, épigénétiques et ethniques.....	72
1.5.2.	Les facteurs de risques modifiables.....	73
a.	Surpoids, obésité et syndrome métabolique	73
b.	Les traumatismes articulaires	74
2.	PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ARTHROSE.....	74
2.1.	<i>Modifications du cartilage articulaire</i>	74
2.1.1.	Modifications histologiques	74
2.1.2.	Modifications cellulaires et matricielles.....	76
2.1.3.	Mise en évidence de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le cartilage arthrosique	78
a.	Calcification du cartilage articulaire	78
b.	Marqueurs de l'hypertrophie dans le cartilage arthrosique humain.....	79
c.	Marqueurs de l'hypertrophie dans des modèles animaux d'arthrose.....	80
d.	Régulation de l'hypertrophie des chondrocytes dans l'arthrose	81
2.2.	<i>Modifications de l'os sous-chondral</i>	82
2.2.1.	Modifications histologiques	83
a.	Anomalies du remodelage de l'os sous-chondral	83
b.	Anomalie de la vascularisation osseuse.....	87
c.	Ostéophytes.....	88
d.	Œdèmes médullaires et kystes sous-chondraux.....	89
2.2.2.	Modifications cellulaires et matricielles.....	90
a.	Activité ostéoblastique	90
b.	Activité ostéoclastique	91
2.3.	<i>Remodelage de la membrane synoviale</i>	91
2.3.1.	Modifications histologiques	91
2.3.2.	Modifications cellulaires	92
2.4.	<i>Modifications des autres tissus de l'articulation</i>	93

2.4.1.	Tissu adipeux de Hoffa	93
2.4.2.	Tissu adipeux intra-médullaire.....	94
2.4.3.	Ménisques et ligaments	95
PARTIE III - L'UNITÉ FONCTIONNELLE CARTILAGE / OS SOUS-CHONDRAL.....		97
1.	INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE LE CARTILAGE ARTICULAIRE ET L'OS SOUS-CHONDRAL .	97
1.1.	<i>Les différents types d'interactions fonctionnelles entre le cartilage et l'os.....</i>	<i>97</i>
1.1.1.	Interactions mécaniques	97
1.1.2.	Interactions biochimiques	98
1.2.	<i>Les vecteurs des interactions biochimiques entre le cartilage et l'os.....</i>	<i>100</i>
1.2.1.	Les contacts directs	100
1.2.2.	Les microfissures	101
1.2.3.	Les chenaux vasculaires ou <i>resorption pits</i>	101
2.	REACTIVATION PATHOLOGIQUE DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE AU COURS DE L'ARTHROSE	103
2.1.	<i>L'angiogenèse ostéochondrale au cours de l'arthrose.....</i>	<i>103</i>
2.1.1.	Implication de l'angiogenèse ostéochondrale dans l'arthrose humaine.....	103
2.1.2.	Implication de l'angiogenèse ostéochondrale dans des modèles animaux d'arthrose.....	106
2.1.3.	Stratégies thérapeutiques ciblant l'angiogenèse dans des modèles animaux d'arthrose.....	107
a.	Inhibiteurs du VEGF	107
b.	Facteurs anti-angiogéniques.....	108
c.	Inhibition du TGF- β	109
2.2.	<i>L'ostéoclastogenèse au cours de l'arthrose.....</i>	<i>109</i>
2.2.1.	Communication entre chondrocytes et ostéoclastes au cours de l'arthrose	110
a.	Régulation des chondrocytes par les ostéoclastes.....	110
b.	Régulation des ostéoclastes par les chondrocytes.....	111
HYPOTHESE DE TRAVAIL.....		113
OBJECTIFS		115
MATERIELS ET METHODES		116
MATERIELS D'ETUDE.....		117
1.	COLLECTION ET PREPARATION DES PRELEVEMENTS DE TISSUS HUMAINS ARTHROSQUES.....	117
1.1.	<i>Inclusion des patients</i>	<i>117</i>
1.2.	<i>Dissection des tissus et préparation des échantillons.....</i>	<i>117</i>
2.	INDUCTION DE L'ARTHROSE CHEZ LE RAT ET INJECTION D'UNE MOLECULE ANTI-ANGIOGENIQUE	119
2.1.	<i>Conditions d'hébergement des animaux.....</i>	<i>119</i>
2.2.	<i>Modèle d'arthrose post-traumatique</i>	<i>119</i>
2.3.	<i>Injection systémique d'une molécule anti-angiogénique</i>	<i>121</i>
2.4.	<i>Injection de tétracycline, sacrifice des animaux et prélèvement des tissus.....</i>	<i>122</i>
3.	CULTURES ET DIFFERENCIATIONS CELLULAIRES	123
3.1.	<i>Culture et différenciation de chondrocytes murins.....</i>	<i>123</i>
3.1.1.	Culture primaire de chondrocytes articulaires immatures murins	123

3.1.2. Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes.....	124
3.2. <i>Culture et différenciation de monocytes murins</i>	125
3.3. <i>Culture de cellules endothéliales humaines</i>	125
METHODES D'ANALYSE	127
1. TESTS FONCTIONNELS D'ANGIOGENESE	127
1.1. <i>Adhérence de cellules endothéliales aux matrices extracellulaires de chondrocytes</i>	127
1.2. <i>Prolifération de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes</i>	127
1.3. <i>Migration de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes</i>	128
1.4. <i>Formation de tubules sur Matrigel en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes</i>	128
2. ANALYSES MOLECULAIRES, BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES.....	129
2.1. <i>Analyses moléculaires</i>	129
2.1.1. Extraction des ARN totaux et rétro-transcription (RT)	129
2.1.2. PCR quantitative en temps réel (qPCR)	130
2.2. <i>Analyses biochimiques</i>	132
2.2.1. Dosage protéique.....	132
2.2.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	132
2.2.3. Angiogenesis array.....	132
2.3. <i>Analyses histologiques</i>	133
2.3.1. Coloration Safranine-O/Fast Green et score OARSI.....	133
2.3.2. Marquage TRAP	134
2.3.3. Marquage TUNEL	135
2.3.4. Immunohistochimie.....	135
3. ANALYSES STATISTIQUES.....	137
RESULTATS.....	139
1. EVALUATION DE L'IMPACT DE L'INHIBITION DE L'ANGIOGENESE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ARTHROSE POST-TRAUMATIQUE	140
1.1. <i>Evaluation histologique de la sévérité de l'arthrose</i>	140
1.2. <i>Implication des chondrocytes hypertrophiques dans l'inhibition de l'angiogenèse</i>	143
2. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES CHONDROCYTES HYPERTROPHIQUES ISSUS D'UN NOUVEAU MODELE DE DIFFERENCIATION PROGRESSIVE	146
2.1. <i>Modèles in vitro de différenciation hypertrophique de chondrocytes : données bibliographiques</i>	146
2.2. <i>Etude du profil d'expression génique des chondrocytes issus d'un nouveau modèle de différenciation progressive</i>	149
2.2.1. Validation de l'utilisation d'un nouveau modèle de différenciation de chondrocytes.....	149
2.2.2. Expression génique de facteurs impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale.....	152

3. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA CONSEQUENCE DE LA DIFFERENCIATION HYPERTROPHIQUE DES CHONDROCYTES PRE-HYPERTROPHIQUES	155
3.1. <i>Stimulation de l'ostéoclastogenèse par les chondrocytes hypertrophiques</i>	155
3.2. <i>Régulation de l'angiogenèse par les chondrocytes hypertrophiques</i>	157
3.2.1. Mécanismes de l'angiogenèse : données bibliographiques	157
a. Mécanismes de l'angiogenèse par bourgeonnement	158
b. L'angiogenèse de l'os.....	161
3.2.2. Rôles des facteurs stockés dans la matrice extracellulaire des chondrocytes	163
a. Mise au point de la technique d'adhérence	164
b. Evaluation de l'adhérence de cellules endothéliales aux matrices de chondrocytes	166
3.2.3. Rôles des facteurs sécrétés par les chondrocytes.....	167
a. Prolifération de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes	167
b. Migration de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par les milieux conditionnés de chondrocytes	171
c. Formation de tubules sur Matrigel des cellules endothéliales en réponse à une stimulation par les milieux conditionnés de chondrocytes	175
4. IDENTIFICATION DES FACTEURS IMPLIQUES DANS LES EFFETS OBSERVES DANS L'OSTEOCLASTOGENESE ET L'ANGIOGENESE.....	180
4.1. <i>Etude du sécrétome des chondrocytes issus d'un modèle de différenciation progressive de chondrocytes murins</i>	180
4.2. <i>Mise en évidence du rôle de SDF-1 dans le remodelage de la jonction ostéochondrale</i> ...	185
4.2.1. L'axe SDF-1/CXCR4 dans l'arthrose : données bibliographiques	185
a. SDF-1 et ossification endochondrale.....	186
b. SDF-1 et métabolisme des chondrocytes.....	187
c. SDF1 et ostéoclastogenèse	188
d. SDF-1 et arthrose	189
e. Stratégies thérapeutiques ciblant SDF-1 dans l'arthrose	189
4.2.2. Mise en évidence de la présence de SDF-1 dans des tissus humains arthrosiques	191
4.3. <i>Evaluation de l'impact de l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 sur l'angiogenèse</i>	193
4.3.1. Effets de l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 dans l'activité angiogénique des chondrocytes....	193
a. Inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 et migration cellulaire.....	193
b. Inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 et formation de tubules sur Matrigel	195
CONCLUSIONS ET DISCUSSION.....	198
CONCLUSION GENERALE	199
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	216
ANNEXE	256

LISTE DES ABBREVIATIONS

18S : 18S ribosomal RNA

Acan : Agrécane

ACLT : Anterior cruciate ligament transection

ADAMTS : A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats

ADN : Acide désoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ANGPTL-4 : Angiopoïétine like 4

ARNm : Acide ribonucléique messenger

bFGF : Basic fibroblast growth factor

BMAT : Bone marrow adipose tissue

BML : Bone marrow lesion

BMP : Bone morphogenetic protein

BMU : Basal multicellular unit

BSA : Bovine serum albumin

BSP : Bone sialoprotein

CCL : C-C motif chemokine ligand

ChM-I : Chondromoduline I

Col1 : Collagène de type I

Col10a1 : Collagène de type X a1

Col2a1 : Collagène de type II a1

COMP : Cartilage oligomeric matrix protein

Ct : Cycle threshold

CT : Computed tomography

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

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

DAMP : Danger associated molecular pattern

DMEM : Dulbecco's modified eagle's medium

DMM : Déstabilisation du ménisque médial

DMP : Dental mineral protein
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate
DO : Densité optique
DPP : Dipeptidyl peptidase
ECM : Matrice extracellulaire
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF : Epidermal growth factor
EGF : Epidermal growth factor
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
Emcn : Endomucine
EPAS1 : Endothelial PAS domain-containing protein 1
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAK : Focal adhesion kinase
FasL : Fas ligand
FGFR : FGF receptor
GAG : Glycosaminoglycane
GDF : Growth differentiation factor
Glu : L-glutamine
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HGF : Hepatocyte growth factor
HIF : Hypoxia-inducible factor
HMGB-1 : High-mobility group box 1 protein
Hprt : Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells
Hyp : Chondrocyte hypertrophique
IGF : Insulin growth factor
Ihh : Indian hedgehog
IL : Interleukine

iMAC : Chondrocyte articulaire immature
IMC : Indice de masse corporelle
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITS : Insuline-transferrine-sélénium
IgG : Immunoglobuline
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KO : Knock out
MAPK : M-activated protein kinase
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF-1 : Macrophage colony stimulating factor 1
MEPE : Matrix extracellular phosphoglycoprotein
MGP : Matrix gla protein
MMP : Métalloprotéase matricielle
Ncad : N-cadhérine
Ncam1 : N-cam
NGF : Nerve growth factor
NO : Nitric oxide
OA : Arthrose
OARSI : Osteoarthritis Research Society International
OC : Ostéocalcine
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPG : Ostéoprotégérine
Osx : Ostérix
PAL : Phosphatase alcaline
PBS : Phosphate buffered saline
PDGF : Platelet-derived growth factor
PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor
PEDF : Pigment epithelium-derived factor
PFA: Paraformaldéhyde
PGE₂ : Prostaglandine E₂

PHEA : Plateforme d'hébergement et d'expérimentation animale

PIGF : Placental growth factor

Prehyp : Chondrocyte pré-hypertrophique

PS : Pénicilline-streptomycine

PTG : Pose de prothèse totale de genou

PTHrP : Parathyroid hormone related protein

RAGE : Receptor for advanced glycation end products

RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RIPA : Radioimmunoprecipitation assay

ROS : Reactive oxygen species

RT-PCR : Reverse transcription – Polymerase chain reaction

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

SASP : Senescence-associated secretory phenotype

SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1

sFlt-1 : Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1

shRNA : Small hairpin RNA

SIBLINGS : Small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins

SLPI : Secretory leukocyte proteinase inhibitor

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

Sphk1 : Sphingosine kinase 1

SVF : Sérum de veau fœtal

T3 : Hormone tri-iodothyronine

TGF- β : Transforming growth factor β

TGF β R : Transforming growth factor beta receptor

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinases

TLR : Toll-like receptor

TNAP : Tissue non-specific alkaline phosphatase

Tnc : Ténascine C

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

TNF- α : Tumor necrosis facteur alpha

TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase

TSP : Thrombospondine

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGFR : VEGF receptor

WT : Wild type

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Les différents types d'articulations	18
Figure 2. Les différentes catégories d'articulations synoviales	19
Figure 3. Schéma de l'articulation synoviale du genou en vues parasagittale et frontale	20
Figure 4. Etapes du développement embryonnaire	21
Figure 5. Formation des vertèbres	22
Figure 6. Evolution des bourgeons des membres supérieurs	23
Figure 7. Morphogenèse d'une articulation synoviale	24
Figure 8. Etapes principales du processus de croissance des os longs par ossification endochondrale chez l'Homme.....	26
Figure 9. Organisation et développement de la plaque de croissance	28
Figure 10. Organisation de la plaque de croissance	28
Figure 11. Aspects macroscopique et histologique du cartilage articulaire humain	33
Figure 12. Structure d'un chondrocyte en microscopie à transmission électronique	34
Figure 13. Illustration des constituants de la matrice du cartilage	37
Figure 14. Organisation histologique du cartilage	40
Figure 15. Voie de signalisation HIF	48
Figure 16. Structure et organisation d'un os long	50
Figure 17. Différents types cellulaires de la lignée ostéoblastique	54
Figure 18. Différents types cellulaires de la lignée ostéoclastique	56
Figure 19. Illustration de la relation entre les vaisseaux sanguins et le remodelage osseux	59
Figure 20. Illustration du remodelage de l'os trabéculaire et de l'os cortical	60
Figure 21. Coupe histologique de membrane synoviale	62
Figure 22. Radiographie d'une articulation du genou arthrosique	67
Figure 23. Classification de Kellgren-Lawrence	68
Figure 24. Atteintes des différents tissus de l'articulation arthrosique	75
Figure 25. Coupes histologiques d'un cartilage sain et arthrosique après coloration à la Safranine-O	76
Figure 26. Evolution de la jonction ostéocondrale au cours de l'arthrose	86
Figure 27. Organisation des vaisseaux sanguins de la moelle osseuse et microenvironnement osseux	88
Figure 28. Coupes histologiques de la membrane synoviale saine et arthrosique	92
Figure 29. Rôle de la membrane synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose	93

Figure 30. Représentation de la jonction ostéocondrale avec des zones de contacts entre le cartilage et l'os sous-chondral	100
Figure 31. Microfissures à la jonction ostéocondrale	101
Figure 32. Chenaux vasculaires à la jonction ostéocondrale	103
Figure 33. Mise en évidence du rôle des chenaux vasculaires dans la dégradation du cartilage ...	104
Figure 34. Communication entre les chondrocytes et les ostéoclastes dans un contexte d'arthrose	112
Figure 35. Prélèvements d'un genou humain arthrosique issu d'un patient opéré pour une pose de prothèse totale du genou (PTG)	118
Figure 36. Etapes schématiques de réalisation d'une déstabilisation du ménisque médial chez le rat	121
Figure 37. Schéma du protocole expérimental	124
Figure 38. Analyse de la formation de tubules sur Matrigel	129
Figure 39. Protocole d'amplification par qPCR	130
Figure 40. Séquences des amorces murines (sens et anti-sens) utilisées en qPCR	131
Figure 41. Séquences des amorces humaines (sens et anti-sens) utilisées en qPCR	132
Figure 42. Méthode d'analyse du score histologique OARSI adapté au rat	134
Figure 43. Conditions expérimentales des immunohistochimies sur coupes murines	136
Figure 44. Conditions expérimentales des immunohistochimies sur coupes humaines	136
Figure 45. Evaluation du degré d'arthrose chez les rats traités à l'Aflibercept	140
Figure 46. Expression de VEGF et de VEGFR3 à la jonction ostéocondrale des pattes de rats ..	144
Figure 47. Caractérisation du profil d'expression génique de marqueurs chondrocytaires et de différenciation hypertrophique des chondrocytes issus du modèle de différenciation progressive.....	150
Figure 48. Caractérisation transcriptomique du génome entier des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques issus du modèle de différenciation progressive	151
Figure 49. Expression génique de facteurs liés au remodelage de la jonction ostéocondrale	152
Figure 50. Différenciation de monocytes RAW 264.7 en ostéoclastes, suite à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes	155
Figure 51. Comparaison des différents modes d'angiogenèse	157
Figure 52. Schéma des principales étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement	160
Figure 53. L'angiogenèse du tissu osseux	161
Figure 54. Mise au point de la technique d'adhérence de cellules endothéliales	164
Figure 55. Adhérence de cellules endothéliales sur des matrices extracellulaires de chondrocytes.	165
Figure 56. Prolifération et mortalité de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes	169
Figure 57. Migration de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes	173

Figure 58. Formation de tubules sur Matrigel ou angiogenèse en 2 dimensions de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes	177
Figure 59. Criblage de protéines liées à l'angiogenèse sécrétées par les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques	181
Figure 60. Expression protéique de facteurs liés au remodelage de la jonction ostéocondrale par les chondrocytes issus du modèle de différenciation	183
Figure 61. Schéma des différentes voies de signalisation impliquant l'axe SDF-1/CXCR4	185
Figure 62. Schéma de la différenciation et de l'activation ostéoclastogénique de précurseurs monocytaires	187
Figure 63. Schéma des différents évènements pathologiques régulés par SDF-1 dans l'arthrose ..	190
Figure 64. Expression protéique de SDF-1 dans des tissus humains arthrosiques	191
Figure 65. Expression de SDF-1 dans des tissus humains arthrosiques	191
Figure 66. Migration de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques, après inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4	193
Figure 67. Formation de tubules sur Matrigel ou angiogenèse en 2 dimensions de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes, après inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4	196

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE I - L'ARTICULATION SYNOVIALE

1. Les différents types d'articulation

Une articulation est une zone de jonction entre deux extrémités osseuses. Il existe trois principaux types d'articulation, qui se distinguent par leur structure et leur degré de mobilité (**Figure 1**). Les articulations fibreuses (synarthroses) sont des articulations fixes dont les surfaces osseuses sont unies par du tissu conjonctif. Les articulations cartilagineuses (amphiarthroses) sont des articulations semi-mobiles grâce à la présence d'une couche de cartilage et de ligaments périphériques. Les articulations synoviales (diarthroses) se différencient des deux autres types d'articulation par une grande mobilité et par la présence d'une cavité articulaire délimitée par un tissu conjonctif, la capsule articulaire, dont la face interne est la membrane synoviale. Les surfaces articulaires des articulations synoviales sont recouvertes de cartilage, comme pour les articulations cartilagineuses. Les articulations synoviales constituent la majorité des articulations des membres.

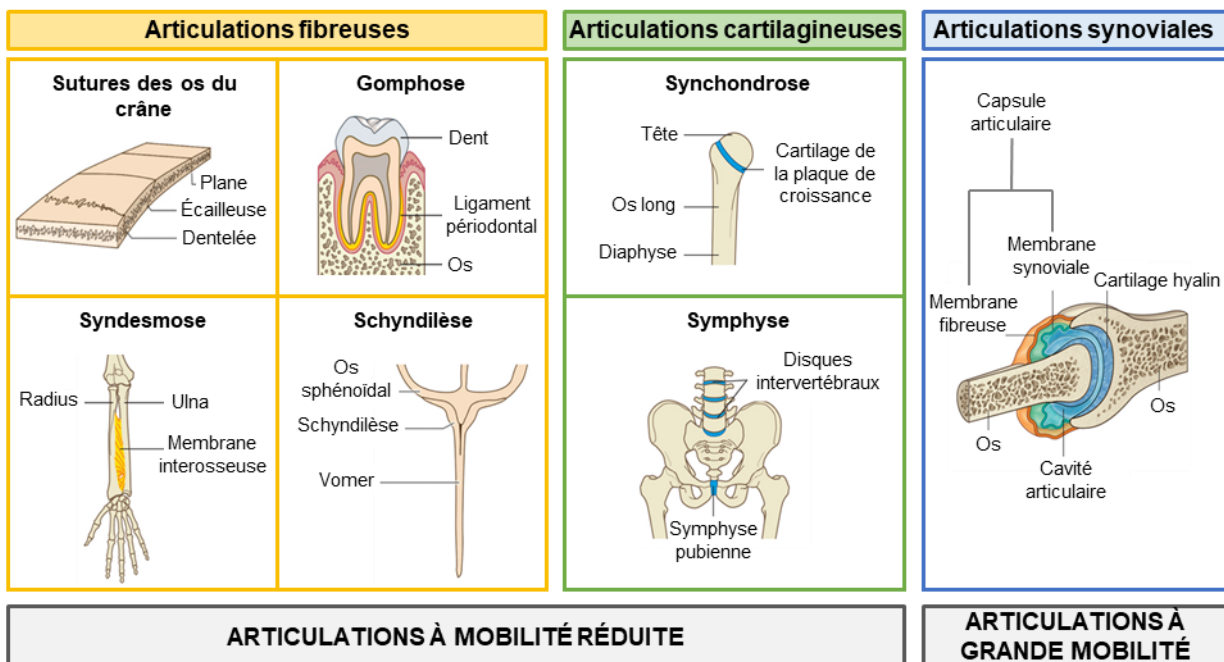


Figure 1. Les différents types d'articulations. Les articulations fibreuses et cartilagineuses sont des articulations à mobilité réduite. Les articulations synoviales permettent des mouvements de grande amplitude grâce à la présence d'une cavité articulaire. D'après : <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/etudes-de-medecine/paces-ue-5-organisation-des-appareils-et-des-systemes>

Les articulations synoviales peuvent être classées en 6 catégories différentes selon la morphologie des surfaces articulaires et leurs possibilités de mouvements : articulation sphéroïde (énarthrose), articulation ellipsoïde (condylienne), articulation en selle (par emboîtement réciproque), articulation trochléenne (ginglyme), articulation trochoïde (à pivot) et articulation plane (arthrodie) (**Figure 2**).

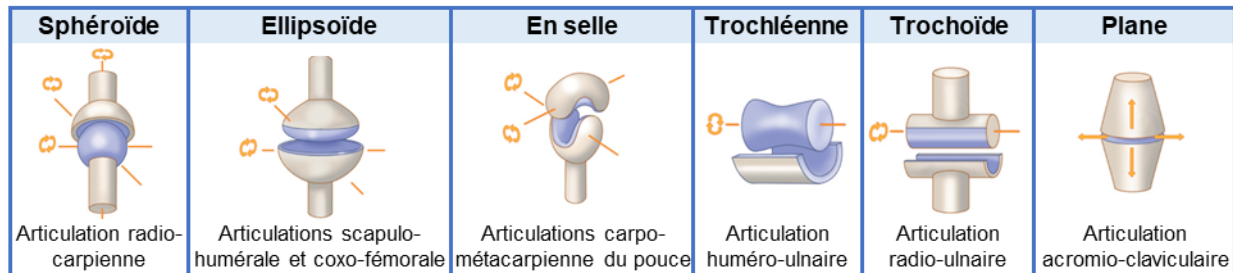


Figure 2. Les différentes catégories d'articulations synoviales. Ces articulations permettent de grands mouvements, à l'exception de l'articulation plane qui n'assure que des glissements limités. D'après : <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/etudes-de-medecine/paces-ue-5-organisation-des-appareils-et-des-systeme>

2. Structure et fonction de l'articulation synoviale du genou

Notre attention se focalisera sur l'articulation du genou qui est l'articulation synoviale la plus grande du corps humain et préférentiellement atteinte au cours de l'arthrose. Avec la hanche et la cheville, elle fait partie des grandes articulations portantes et est par conséquent sujette à de nombreuses contraintes mécaniques. Cette articulation permet la flexion et l'extension des membres inférieurs ainsi qu'une légère rotation, indispensable à la marche.

Le genou a une organisation complexe qui met en relation trois os, le fémur, le tibia et la rotule (patella), dans deux articulations au sein de la même cavité articulaire : une articulation ellipsoïde bi-condylienne et une articulation trochléenne. Le fémur et la rotule forment l'articulation trochléenne fémoro-patellaire. Le fémur et le tibia forment l'articulation bi-condylienne fémoro-tibiale, qui se divise en deux compartiments : le compartiment fémoro-tibial médial (interne) et le compartiment fémoro-tibial latéral (externe). Pour chaque compartiment, la partie fémorale est appelée condyle fémoral et la partie tibiale se nomme plateau tibial.

Les condyles fémoraux, les plateaux tibiaux et la face postérieure de la rotule sont recouverts de cartilage hyalin. Le cartilage repose sur de l'os avec lequel il forme une unité

fonctionnelle dont l'interface est la jonction ostéocondrale. Entre chaque condyle fémoral et plateau tibial se trouvent les ménisques médial et latéral, structures fibrocartilagineuses en forme de croissant dont les fonctions principales sont d'amortir les chocs et de stabiliser l'articulation. L'articulation est maintenue par des ligaments intra-articulaires, comme les ligaments croisés qui unissent le fémur et le tibia en se croisant au sein de la capsule articulaire, mais également par des ligaments extra-articulaires, des muscles et des tendons. La capsule articulaire qui délimite la cavité synoviale forme une enveloppe et assure également la stabilité de l'articulation. Elle comprend deux couches de tissus. La capsule fibreuse correspond à sa partie externe ; il s'agit d'un tissu résistant et flexible qui est fixé aux épiphyses tibiale et fémorale. La partie interne est formée par la membrane synoviale qui tapisse l'intérieur de la capsule fibreuse et les surfaces articulaires non recouvertes de cartilage. Entre ces deux couches se trouvent les tissus adipeux intra-articulaires : les tissus adipeux infra-patellaire ou de Hoffa, supra-patellaire et postérieur. La cavité articulaire renferme du liquide synovial (synovie), un liquide clair qui assure la lubrification et la nutrition des surfaces articulaires (Schünke, Schulte, et Schumacher 2016) (**Figure 3**).

Les principaux tissus de l'articulation synoviale sont donc le cartilage, l'os sous-chondral et la membrane synoviale, dont les caractéristiques seront détaillées dans ce manuscrit.

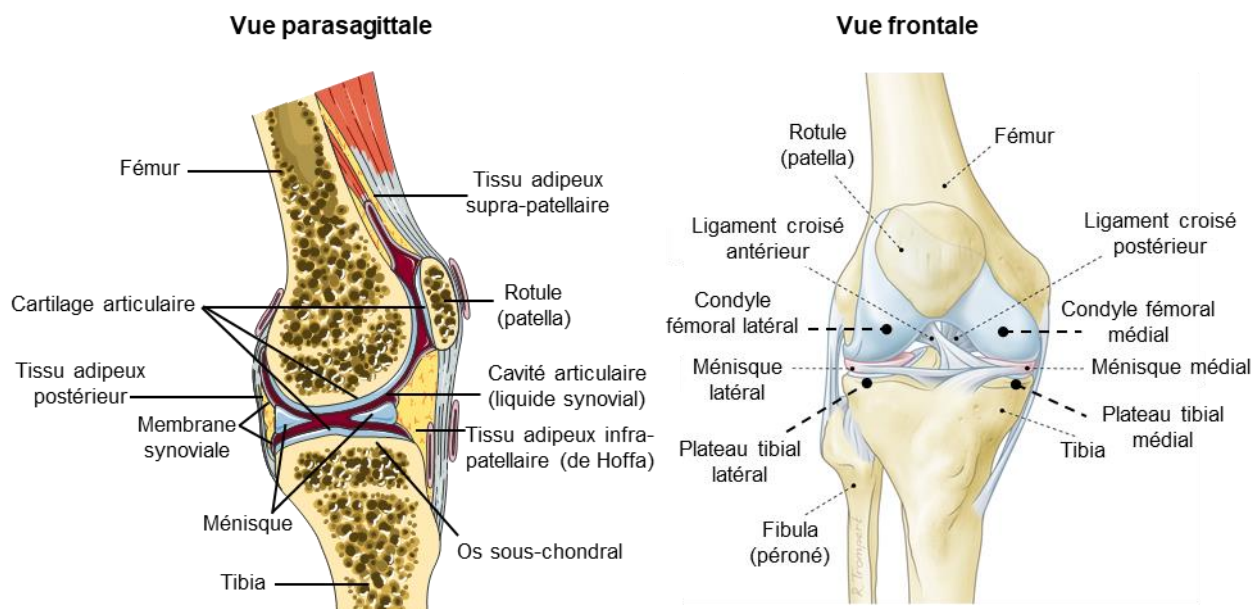


Figure 3. Schéma de l'articulation synoviale du genou en vues parasagittale et frontale. Le genou est une articulation complexe, composée de différents tissus : cartilage, os, membrane synoviale, liquide synovial, tissus adipeux, ligaments, muscles et tendons. D'après : Servier Medical Art ; <https://atromedical.com/total-meniscus-replacement> (modifiés)

3. Développement de l'articulation

3.1. Embryologie du système squelettique

3.1.1. Formation et évolution des somites

Chez l'homme, lors de la 2^{ème} semaine du développement embryonnaire, le disque embryonnaire est constitué de deux feuillettes, l'épiblaste et l'hypoblaste, et devient tridermique pendant la 3^{ème} semaine de développement, avec la mise en place du mésoblaste intra-embryonnaire qui sera à l'origine de l'ensemble des éléments constitutifs du squelette. Le mésoblaste intra-embryonnaire se différencie au 18^{ème} jour de développement en trois structures, le long de l'axe longitudinal de l'embryon : le mésoblaste para-axial, intermédiaire et latéral. Les cellules du mésoblaste para-axial vont se condenser et se segmenter pour former des somites, à l'origine de l'organisation segmentaire de l'embryon. Ces organes embryonnaires transitoires sont des amas de cellules mésoblastiques qui se répartissent de façon symétrique de chaque côté de la corde dorsale. Ce phénomène de métamérisation se poursuit au cours de la 4^{ème} semaine de développement. Chaque somite va ensuite s'individualiser et se différencier pour former 3 régions : le dermatome, à l'origine du derme et de l'hypoderme ; le myotome, à l'origine des muscles ; et le sclérotome, à l'origine du squelette axial (**Figure 4**).

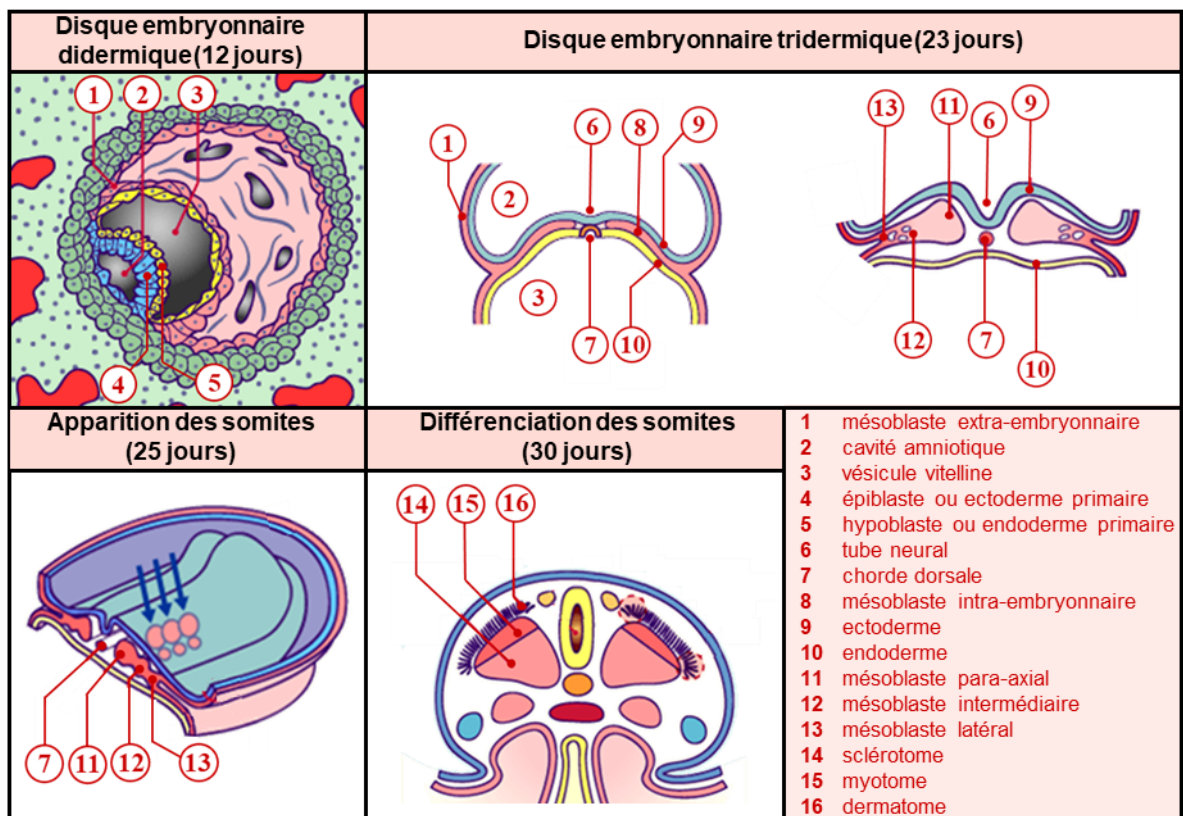


Figure 4. Etapes du développement embryonnaire. D'après www.embryology.ch (modifié)

3.1.2. Formation du squelette axial

Le squelette axial se forme au cours de la 4^{ème} semaine de développement après migration des cellules du sclérotome vers la région axiale de l'embryon, autour de la corde dorsale et l'ébauche du tube neural, formant des blocs de sclérotome séparés par du mésenchyme intra-embryonnaire. A partir de la 5^{ème} semaine, il apparaît au niveau de chacun de ces blocs de sclérotome deux zones plus denses, crâniale et caudale, séparées par une zone moins dense et peu active. La partie caudale de chaque bloc va proliférer et s'accoler à la partie crâniale du bloc sous-jacent. Cette migration aboutit à la formation d'un amas cellulaire dense constituant un corps vertébral précartilagineux. Les cellules de la zone moins dense, rempliront l'espace situé entre deux corps vertébraux et formeront l'ébauche du disque intervertébral (**Figure 5**).

A partir de la fin du 2^{ème} mois de développement embryonnaire, le corps vertébral se transforme en cartilage et la corde régresse (sauf au niveau du disque intervertébral). La différenciation cartilagineuse s'étend progressivement aux cellules sclérotomiales ayant entouré le tube neural qui formeront les processus costaux, à l'origine des futures côtes. L'ossification des vertèbres se fera ensuite par un processus lent d'ossification endochondrale, au niveau des corps vertébraux cartilagineux au cours du 3^{ème} mois de développement avant de s'étendre aux autres régions (**Figure 5**).

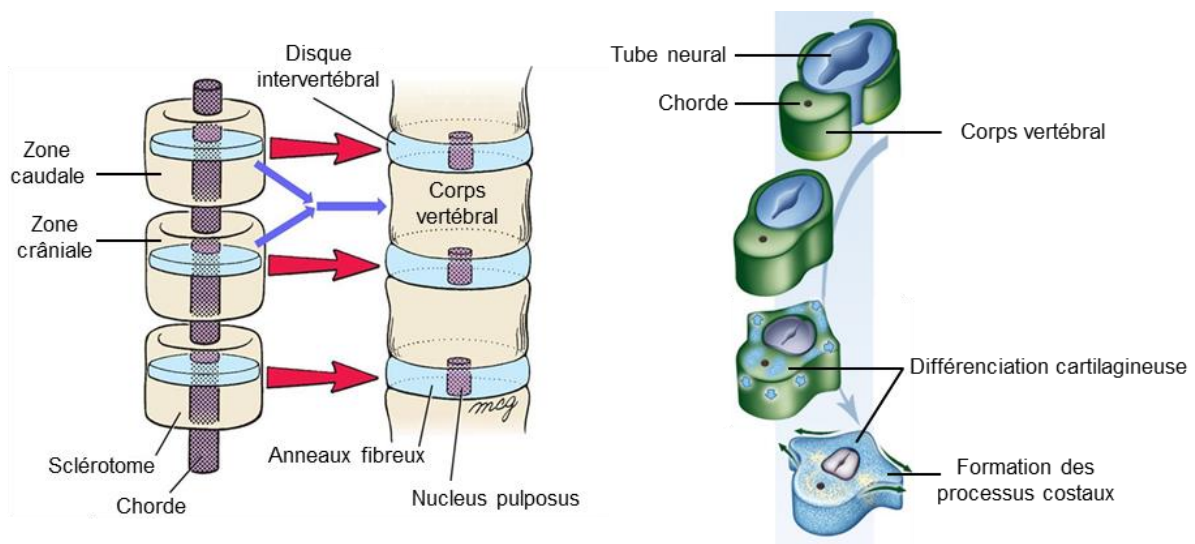


Figure 5. Formation des vertèbres. D'après www.orthobullets.com/basic-science/9078/embryology ; <https://embryologie.medecine.parisdescartes.fr/Embryologie/Accueil/Accueil.htm> (modifiés)

3.1.3. Développement des membres supérieurs et inférieurs

Le développement des membres s'effectue de la 4^{ème} semaine jusqu'à la 8^{ème} semaine de développement. Les membres apparaissent sous forme de bourgeons, dans la région cervico-dorsale pour les membres supérieurs et dans la région lombo-sacrée pour les membres inférieurs. Chaque bourgeon est constitué d'un massif cellulaire provenant du mésoblaste latéral recouvert d'une crête ectodermique apicale. A la fin de la 5^{ème} semaine, la partie proximale du bourgeon se développe, s'aplatit et forme la palette (la future main ou le futur pied). Certaines cellules mésoblastiques se différencient en myoblastes pour former les futurs muscles extenseurs et fléchisseurs, alors qu'au centre des membres se condensent des éléments mésenchymateux qui se différencient en chondroblastes à l'origine des ébauches cartilagineuses des os. Par un mécanisme d'apoptose, des sillons se creusent au niveau de la palette pour individualiser les doigts et les orteils. Vers la 7^{ème} semaine de développement, des zones mésenchymateuses se mettent en place, à l'origine des futures cavités articulaires.

Au cours de la 8^{ème} semaine de développement, les membres présentent 3 segments (proximal, moyen et distal) qui en fléchissant entraînent la formation des coudes et des genoux, accompagné par une rotation de 90° vers l'extérieur pour les membres supérieurs et vers l'intérieur pour les membres inférieurs. L'ossification primaire se terminera à la 12^{ème} semaine de développement (**Figure 6**).

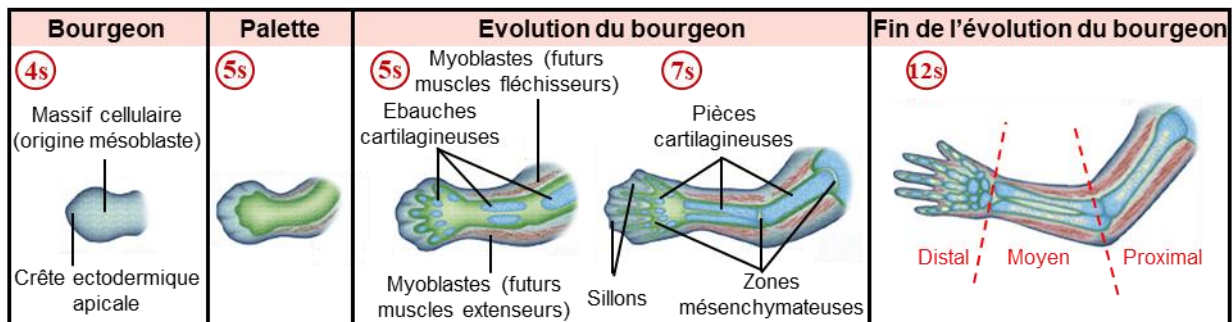


Figure 6. Evolution des bourgeons des membres supérieurs. D'après <https://embryologie.medicine.parisdescartes.fr/Embryologie/Accueil/Accueil.htm> (modifié)

3.1.4. Formation des articulations synoviales

La formation des articulations synoviales débute entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de développement, avec l'apparition d'une interzone au sein des ébauches cartilagineuses, qui assurera la segmentation des éléments squelettiques des membres. L'interzone se met en place suite à l'aplatissement et la condensation de certaines cellules de l'ébauche cartilagineuse, qui

vont acquérir un profil chondrogénique transitoire et surtout exprimer des marqueurs spécifiques de l'interzone, comme le facteur Growth Differentiation Factor 5 (GDF-5) (Chijimatsu et Saito 2019). Cette zone articulaire intermédiaire se partage en trois couches : deux couches cartilagineuses au contact des ébauches adjacentes et une couche centrale de tissu conjonctif dense.

Autour de la 8^{ème} semaine de développement, différents phénomènes (dégradation enzymatique, contrainte mécanique, apoptose) conduisent à la formation au niveau de la couche centrale de la cavité articulaire. Certaines cellules se condensent sur les versants proximal et distal pour donner naissance au tissu synovial qui bordera la future articulation. D'autres cellules participeront à la formation des ligaments intra-articulaires et des ménisques pour le genou. La capsule articulaire se développe en périphérie à partir de l'enveloppe mésenchymateuse qui entoure toute l'interzone. Après l'apparition de l'interligne articulaire, le cartilage hyalin se forme au niveau des ébauches cartilagineuses. Le développement de l'articulation se termine à la 12^{ème} semaine de développement. La forme définitive de l'articulation sera déterminée par l'influence des contraintes fonctionnelles, comme les forces musculaires (**Figure 7**).

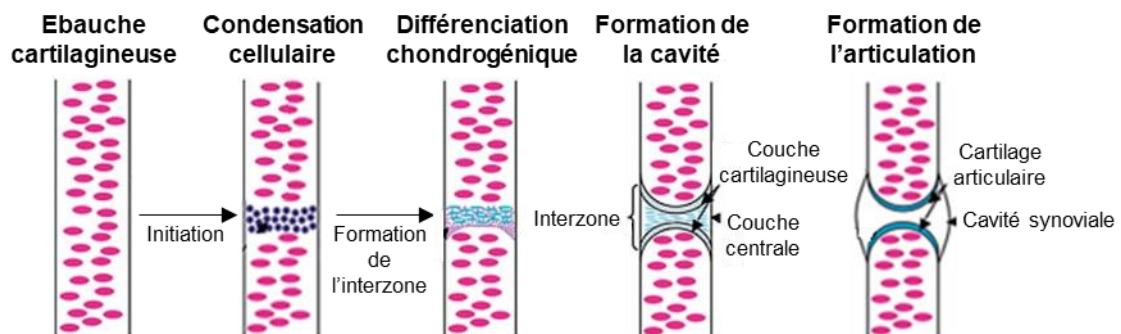


Figure 7. Morphogenèse d'une articulation synoviale. D'après (Khan et al. 2007) (modifié)

3.2. Les processus d'ossification

L'ossification ou ostéogenèse désigne l'ensemble des processus permettant la formation, le développement et la réparation des os du squelette. Deux mécanismes distincts permettent le développement osseux, l'ossification intramembraneuse qui assure le remplacement direct du mésenchyme par de l'os et l'ossification endochondrale qui se fait à partir d'une matrice cartilagineuse.

Ces deux mécanismes débutent par l'élaboration d'une maquette mésenchymateuse, issue de la condensation de cellules mésenchymateuses, à l'emplacement des futures structures osseuses.

Chez la souris, la condensation des cellules souches mésenchymateuses s'observe dès E10.5, au niveau des bourgeons des membres, et se caractérise par des amas cellulaires très denses qui constituent des ébauches mésenchymateuses (Hata et al. 2017; Karsenty, Kronenberg, et Settembre 2009). Durant la condensation, les cellules souches mésenchymateuses se différencieront soit en ostéoblastes pour former directement de l'os (ossification intramembranaire) soit en chondrocytes pour former une matrice cartilagineuse (ossification endochondrale).

3.2.1. Ossification intramembraneuse

Ce processus est à l'origine de la formation des os plats, des os de la face, du crâne et de la clavicule. Le tissu osseux se forme par métaplasie, c'est-à-dire par différenciation directe du tissu mésenchymateux en tissu osseux.

Une fois les cellules souches mésenchymateuses engagées dans la lignée ostéogénique, elles activent des facteurs de transcription comme Runt-related transcription factor 2 (Runx2/Cbfa1) et Osterix (Osx/Sp7) qui régulent l'expression de protéines, notamment le collagène de type I (Col1) et l'ostéocalcine (OC), qui contribuent à la différenciation en ostéoblastes actifs (K. Nakashima et al. 2002a; Takarada et al. 2016). Ces cellules constituent un centre d'ossification et sont responsables de la synthèse d'une matrice ostéoïde, le composant organique de la matrice osseuse. L'ostéoïde est principalement composée de collagène de type I qui, lors de son dépôt, se minéralise rapidement grâce à des vésicules matricielles riches en phosphate de calcium (L. Cui et al. 2016). Un sous-ensemble de cellules mésenchymateuses indifférenciées reste à la périphérie de l'os et forme le périoste, une fine membrane qui sera source de progéniteurs squelettiques, impliqués dans la croissance osseuse et la réparation tissulaire (Roberts et al. 2015).

A la naissance, le crâne et les clavicules ne sont pas complètement ossifiés. Les derniers os à s'ossifier sont les os plats de la face, qui atteignent leur taille adulte à la fin de l'adolescence.

3.2.2. Ossification endochondrale

Ce processus est quant à lui à l'origine des autres os du squelette axial (os de la base du crâne, vertèbre et côtes) et du squelette appendiculaire (membres supérieurs et inférieurs). Contrairement à l'ossification intramembraneuse, le tissu mésenchymateux est d'abord remplacé par une maquette cartilagineuse intermédiaire, qui sera ensuite substituée par du tissu osseux pour terminer la croissance osseuse (**Figure 8**).

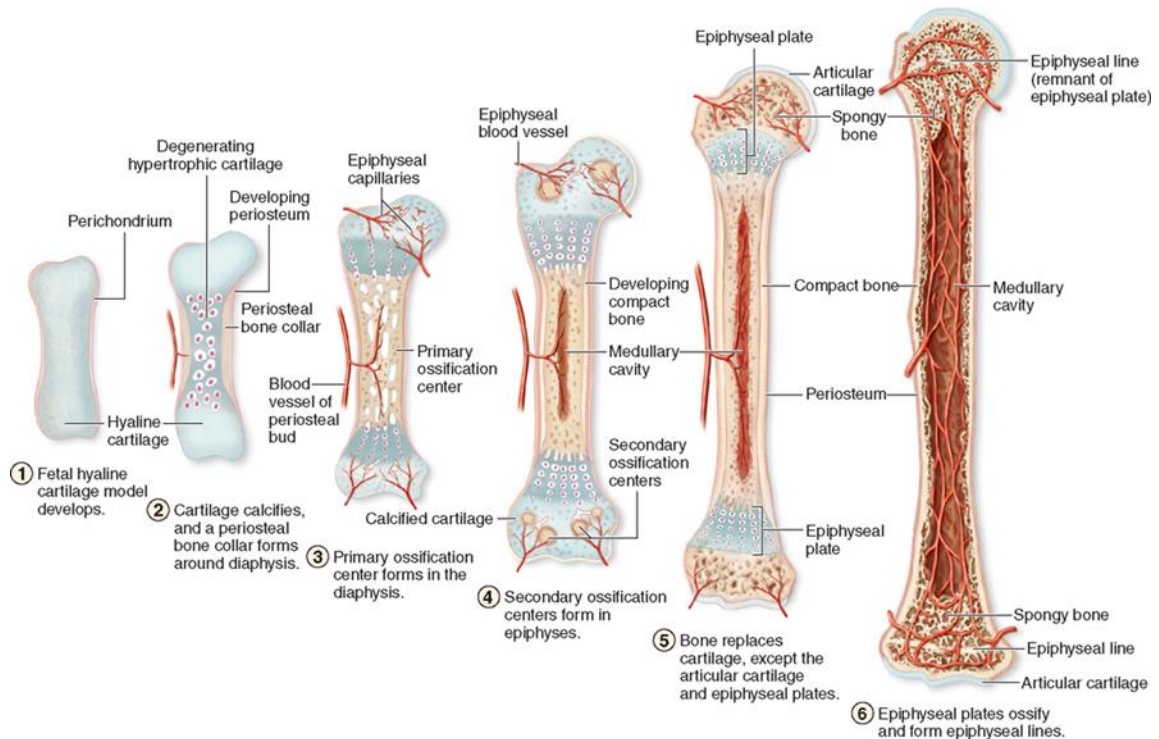


Figure 8. Etapes principales du processus de croissance des os longs par ossification endochondrale chez l'Homme. (1) Elaboration de la maquette cartilagineuse intermédiaire par condensation et différenciation chondrogénique de cellules souche mésenchymateuses. (2) Croissance de la maquette cartilagineuse par prolifération des chondrocytes, initiation de la différenciation hypertrophique et minéralisation au centre de la diaphyse. (3) Formation du centre d'ossification primaire, avec invasion vasculaire du cartilage (4) Création d'une cavité médullaire, croissance en longueur de l'os et formation des centres d'ossification secondaire aux épiphyses avec la mise en place d'une plaque de croissance (5) Remplacement du cartilage minéralisé par du tissu osseux et formation du cartilage articulaire épiphysaire. (6) Ossification totale de l'os.

a. Elaboration de la maquette cartilagineuse intermédiaire

La maquette cartilagineuse intermédiaire est élaborée à partir de cellules souches mésenchymateuses qui se différencient en chondrocytes, par un processus appelé chondrogenèse. La chondrogenèse est principalement régulée par un facteur clé, Sox9, un facteur de transcription de la famille des facteurs SOX (Sry-related HMG bOX). L'importance

de ce facteur a été démontrée par Bi *et al.* avec l'utilisation de souris chimériques, engendrées suite à l'injection de cellules souches embryonnaires Sox9^{-/-} dans les blastocytes de souris wild-type. Les cellules invalidées pour le gène Sox9 ne participent pas à la différenciation chondrogénique et restent sous forme de tissu mésenchymateux indifférencié (Bi et al. 1999). Sox9 agit en tant qu'activateur de gènes spécifiques de la condensation pré-cartilagineuse (Fal101a, Myh14, Sema3c et Sema3d) (Liu et al. 2018) et de gènes codant les protéines spécifiques de la matrice des chondrocytes, le collagène de type II (Col2a1) et l'agrécane (Acan) (Bell et al. 1997; de Crombrughe, Lefebvre, et Nakashima 2001). L'expression et l'activité de Sox9 sont finement régulées au cours de la chondrogenèse par de nombreuses voies de signalisation (Kozhemyakina, Lassar, et Zelzer 2015). Cette régulation se fait en liaison avec deux co-facteurs, Sox5 et Sox6, qui en formant un complexe avec Sox9 ciblent le promoteur du gène Col2a1, responsable de la synthèse du collagène, et régulent également les gènes Fgfr3 (récepteur 3 du Fibroblast Growth Factor) et Runx2, impliqués dans la synthèse des protéoglycanes (Hata et al. 2017; Lefebvre, Li, et de Crombrughe 1998; Smits et al. 2001). De plus, Sox9 réprime la transcription du gène Col10a1, codant le collagène de type X, présent dans le cartilage calcifié. Les cellules souches mésenchymateuses de la périphérie de la maquette ne se différencieront pas en chondrocytes mais formeront le périchondre, ébauche du futur périoste osseux.

b. La plaque de croissance

La plaque de croissance (cartilage de croissance ou cartilage de conjugaison) est la structure comprise entre les centres primaire et secondaire d'ossification (**Figure 9, 10**). Elle se compose de trois zones principales : une zone de réserve, une zone proliférative et une zone hypertrophique au contact du front d'ossification. Cette structure spécialisée et stratifiée permet de générer des chondrocytes à forte activité mitotique qui vont synthétiser une structure cartilagineuse, de constituer ainsi l'ébauche du futur os en se différenciant progressivement en chondrocytes plus volumineux, de consolider cette ébauche osseuse en minéralisant la matrice, puis de la remplacer par du tissu osseux et ainsi assurer la croissance longitudinale de l'os, de la période post-natale jusqu'à la fin de la puberté (Zuscik et al. 2008).

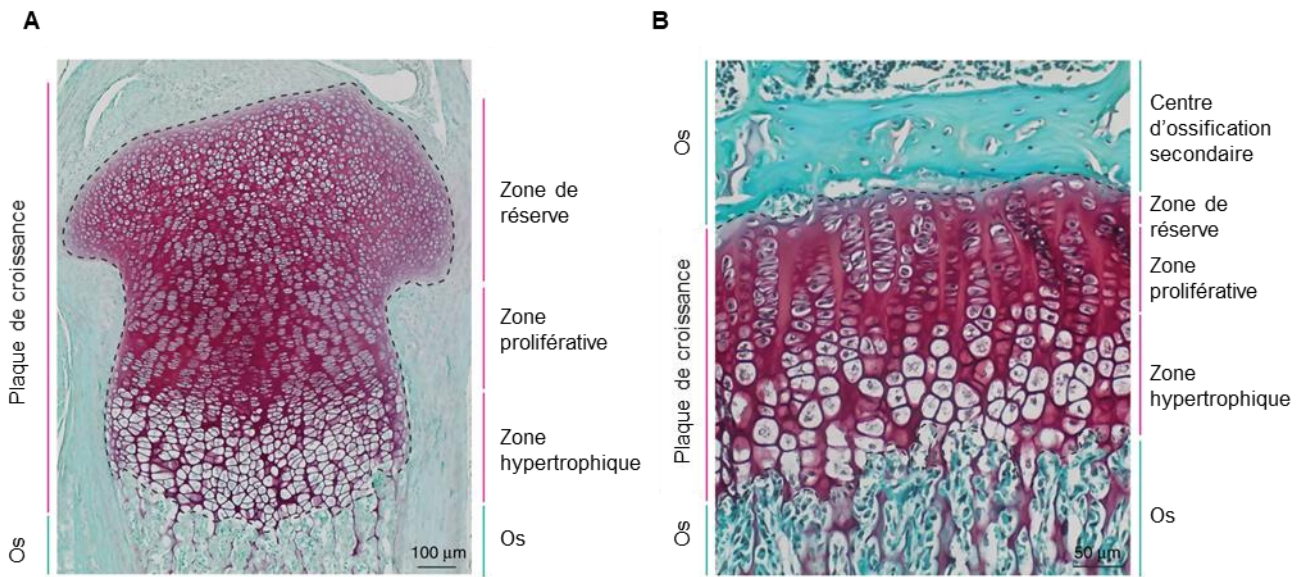


Figure 9. Organisation et développement de la plaque de croissance. Images histologiques de la plaque de croissance de souris avant (A) et après (B) que la plaque de croissance soit définie par la formation du centre d'ossification secondaire. Coupes histologiques colorées à la Safranine-O/Fast Green de tissus de tibia de souris âgés de 3 jours (A) et de 30 jours (B). D'après (Chagin et Newton 2020)

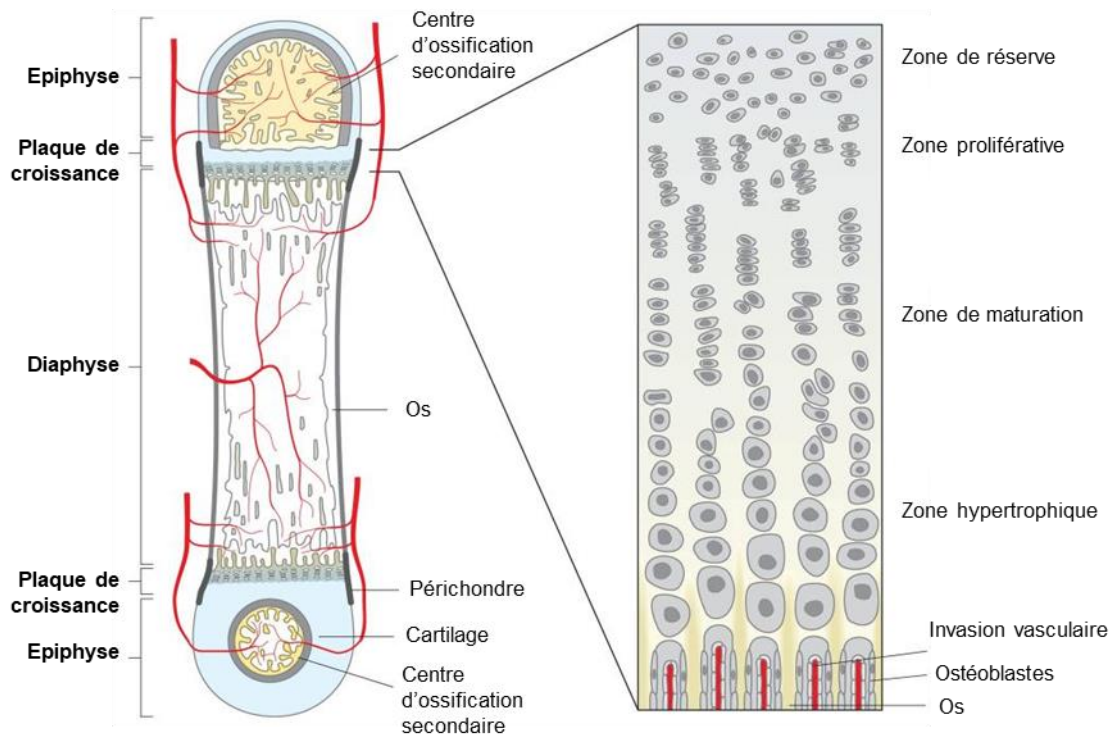


Figure 10. Organisation de la plaque de croissance. Illustration représentant les différentes zones de la plaque de croissance, décrites ci-dessous. D'après (Wolpert 2010)

La zone de réserve ou de repos

Les cellules souches mésenchymateuses de la zone de réserve sont sphériques et dispersées aléatoirement dans la matrice extracellulaire. Elles expriment des protéines matricielles comme le collagène de type II (Col2a1(IIa)), des facteurs de transcription comme Sox9, des molécules d'adhérence comme N-cadhérine (Ncad), N-cam (Ncam1) et Tenascin (Tnc) qui permettent l'initialisation de la chondrogenèse (Zuscik et al. 2008).

Cette zone assure plusieurs fonctions dans la plaque de croissance et contribue de manière importante à l'ossification endochondrale : tout d'abord elle sert de lieu de stockage pour les cellules souches mésenchymateuses capables de générer des nouveaux clones de chondrocytes de la zone proliférative. De plus, elle oriente et dirige l'alignement des chondrocytes prolifératifs le long de l'axe de l'os, en favorisant la production de Indian hedgehog (Ihh), un morphogène. Enfin, elle régulerait négativement la différenciation terminale des chondrocytes en produisant des facteurs inhibant l'hypertrophie des chondrocytes, comme la Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) et contribuerait de cette manière à l'organisation stratifiée de la plaque de croissance (Abad et al. 2002).

La zone proliférative

Après différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes, ces derniers synthétisent une matrice extracellulaire riche en collagène de type II (Col2a1(IIb)) et en agrécane. Ces chondrocytes présentent une forte activité mitotique et au fur et à mesure qu'ils prolifèrent et initient leur différenciation chondrocytaire, les chondrocytes s'aplatissent et s'alignent en colonne, le long de l'axe longitudinal de l'os. Ils expriment alors faiblement Runx2, Osterix et le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et fortement Fgfr3 (Zuscik et al. 2008).

La zone hypertrophique

On distingue deux couches dans cette zone : la partie haute composée de chondrocytes en phase de maturation, les chondrocytes pré-hypertrophiques, et la partie profonde composée de chondrocytes hypertrophiques. Les chondrocytes de cette zone cessent de se diviser et sont organisés en colonne, le long de l'axe de l'os.

Les chondrocytes pré-hypertrophiques ne prolifèrent plus, ils s'agrandissent légèrement et initient leur différenciation grâce à l'expression de Ihh et du récepteur de la PTHrP (Jianmei

Li et Dong 2016). Ils expriment également FGFR3 et commencent à exprimer les facteurs de transcription Runx2-3, Osx ainsi que Col10a1, qui contribuent à la différenciation hypertrophique des chondrocytes et qui sont nécessaires à la minéralisation du cartilage (K. Nakashima et al. 2002b; Yoshida et al. 2004). En revanche ils expriment faiblement le Vegfa, Col2a1, Acan et Sox9 (Zuscik et al. 2008).

Les chondrocytes continuent d'augmenter en volume avec la différenciation hypertrophique. La différenciation hypertrophique des chondrocytes est principalement assurée par les facteurs de transcription de la famille Runx (Runx2 et 3). Ces facteurs induisent et contrôlent la différenciation hypertrophique par l'interaction avec les protéines SMAD de la voie des Bone Morphogenetic Protein (BMP) et activent directement la voie IHH (Yoshida et al. 2004). La délétion de Runx2 induit un retard de l'hypertrophie des chondrocytes chez la souris et l'absence totale de zone hypertrophique et de tissu osseux en cas de double délétion avec Runx3, démontrant le rôle clé de ces facteurs dans l'hypertrophie (Takarada et al. 2013). A ce stade, les chondrocytes n'expriment plus Col2a1, ni Sox9, qui favorise le stade prolifératif et inhibe la maturation des chondrocytes en bloquant l'activité de Runx2 (Kozhemyakina, Lassar, et Zelzer 2015), mais fortement Col10a1 et Runx2-3. Ils se caractérisent également par une expression accrue de Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) et 13 (MMP-13), de la phosphatase alcaline, de l'ostéopontine et l'ostéocalcine. Les chondrocytes hypertrophiques synthétisent une matrice extracellulaire riche en collagène de type X, grâce au facteur de transcription Mef2c qui se lie au promoteur de Col10a1 et qui l'active. La phosphatase alcaline favorise la minéralisation des fibres de collagène de type X en augmentant la concentration en phosphate inorganique et en diminuant la concentration extracellulaire en pyrophosphate qui inhibe la minéralisation (Addison et al. 2007; Golub et Boesze-Battaglia 2007). Les chondrocytes hypertrophiques expriment également fortement le gène codant le VEGF, qui est un facteur clé de la morphogenèse de la plaque de croissance. Le VEGF-A joue un rôle de coordinateur de l'apoptose des chondrocytes, du remodelage de la matrice extracellulaire, de la vascularisation du cartilage et de la formation osseuse dans la plaque de croissance (Gerber et al. 1999). Les chondrocytes arrivent à leur stade terminal de différenciation, ils expriment alors principalement la MMP-13, A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 4 (ADAMTS-4) et VEGFA (Zuscik et al. 2008). MMP-13 et ADAMTS-4 contrôlent la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage, étape précédant la minéralisation assurée par les ostéoblastes et nécessaire à la création d'une cavité qui sera occupée par la moelle osseuse.

Le front d'ossification

Le devenir des chondrocytes hypertrophiques terminaux n'est pas encore totalement compris. Il semblerait que la majorité de ces cellules disparaissent par apoptose (Gibson, Lin, et Roque 1997). En dégénéralant, les chondrocytes hypertrophiques libéreraient de grandes quantités d'ions phosphate, ce qui favoriserait la minéralisation de la matrice extracellulaire (Magne et al. 2003). Néanmoins, certains chondrocytes n'entreraient pas dans les voies de l'apoptose et deviendraient des ostéoblastes par un phénomène de transdifférenciation (Aghajanian et Mohan 2018).

L'invasion de la maquette cartilagineuse par des vaisseaux sanguins provenant du périchondre, est principalement assurée par le VEGFA. Ce facteur angiogénique indispensable à la vascularisation de la plaque de croissance est synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques (Gerber et al. 1999). La délétion du gène codant le VEGFA entraîne un retard de la vascularisation des centres d'ossification (Haigh et al. 2000; Zelzer et al. 2002), tandis que sa surexpression conduit à une augmentation de la masse osseuse (Maes, Goossens, et al. 2010). L'invasion vasculaire de la zone hypertrophique est primordiale au processus de formation osseuse. En effet, celle-ci va permettre la transition du tissu cartilagineux vers un tissu osseux, en apportant des nutriments, des précurseurs de la moelle osseuse ainsi que des cellules ostéoprogénitrices comme des ostéoblastes et des ostéoclastes. Ainsi, lorsque les vaisseaux sanguins pénètrent la couche profonde de la plaque de croissance, on observe une dissolution de la matrice cartilagineuse face au front d'avancement du canal vasculaire. Les ostéoclastes résorbent la matrice extracellulaire puis phagocytent les débris de matrice créant ainsi des lacunes. Des ostéoblastes immatures déposent par la suite du tissu osseux riche en collagène de type I et libèrent des protéines osseuses telle que l'ostéopontine, l'ostéonectine et des sialoprotéines. Ce tissu osseux primaire sera par la suite remplacé par du tissu osseux définitif synthétisé par des ostéoblastes matures (Maes, Kobayashi, et al. 2010; Walzer et al. 2014).

4. Les différents tissus de l'articulation synoviale

4.1. Le cartilage articulaire

On distingue trois types de cartilage : hyalin, fibreux et élastique. Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin, un tissu conjonctif hautement spécialisé d'aspect blanc, translucide, lisse et brillant. Ce tissu recouvre les extrémités osseuses des articulations et permet, par ses propriétés de résistance aux forces de compression et d'élasticité, le glissement des surfaces osseuses entre elles, en limitant les frictions et en distribuant les contraintes mécaniques qui s'exercent sur l'articulation. Dans l'articulation du genou, on retrouve également du cartilage fibreux au niveau des ménisques.

L'épaisseur du cartilage varie en fonction des articulations, mais également selon l'intensité des contraintes mécaniques exercées sur les différentes zones de l'articulation (Shepherd et Seedhom 1999). Les lois de Sappey (pression) et de Rouvière (surface) indiquent que « l'épaisseur du cartilage articulaire est proportionnelle à la pression subie par unité de surface et elle est, pour une même pression, en raison inverse de l'étendue des surfaces qui la supporte ». Le cartilage le plus épais est celui de l'articulation fémoro-patellaire (avec une épaisseur de l'ordre de 6-7 mm) puis celui de l'articulation fémoro-tibiale (de l'ordre de 5-6 mm) tandis que l'articulation coxo-fémorale a un cartilage plus fin (de l'ordre de 2-4 mm) (Chevalier 1998).

Le cartilage est un tissu atypique puisqu'il n'est ni vascularisé, ni innervé et qu'il n'est composé que d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, et d'une matrice extracellulaire riche en eau et en macromolécules. Cette matrice représente 95% du volume du cartilage et est synthétisée par les chondrocytes (**Figure 11**) (Aigner et al. 2006).

Sa nutrition est assurée par le liquide synovial qui fournit les nutriments par imbibition et diffusion mais également par la moelle et les vaisseaux de l'os sous-chondral, notamment pour les zones les plus éloignées de la cavité articulaire et du liquide synovial (Bashir et al. 1997; Malinin et Ouellette 2000; Yuze Wang et al. 2013).

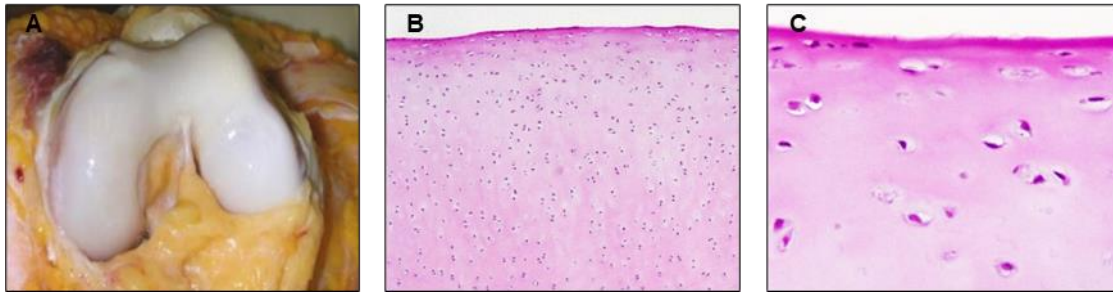


Figure 11. Aspects macroscopique et histologique du cartilage articulaire humain. (A) Aspect macroscopique de condyles fémoraux d'un genou sain. D'après (Aigner et al. 2006) (B) Coupe histologique du cartilage articulaire après coloration des protéoglycanes à la Safranine-O. (C) Zoom sur les chondrocytes articulaires entourés de matrice extracellulaire, suite à une coloration des noyaux à l'hématoxyline. D'après Hill, M.A. Embryology Cartilage histology 001.jpg and 002.jpg (modifiés).

4.1.1. Composition et structure du cartilage articulaire

a. Les chondrocytes

Le chondrocyte représente l'unique type cellulaire présent dans le cartilage articulaire. C'est une cellule de forme sphérique, d'un diamètre de 30 à 40 μm (Corvol 2000), contenue dans une petite loge appelée chondroplaste et qui ne représente que 5% du volume total du cartilage (Aigner et al. 2006). Il existe peu de contact intercellulaire direct au sein du cartilage et les chondrocytes se caractérisent par un faible renouvellement cellulaire et par un métabolisme quiescent (Chevalier et Richette 2005). Le chondrocyte est enchâssé dans une matrice extracellulaire dont il régule l'homéostasie à l'aide d'enzymes spécialisées dans la synthèse ou la destruction de la matrice (**Figure 11, 12**).

Le cartilage étant un tissu avasculaire, les chondrocytes vivent en hypoxie et privilégient un métabolisme anaérobie. En effet, il existe un gradient de teneur en oxygène décroissant de la surface du cartilage vers sa profondeur (10% en surface et 1% en profondeur). Les chondrocytes utilisent majoritairement le glucose comme substrat énergétique, afin de synthétiser les constituants de la matrice extracellulaire (Mobasher et al. 2002).

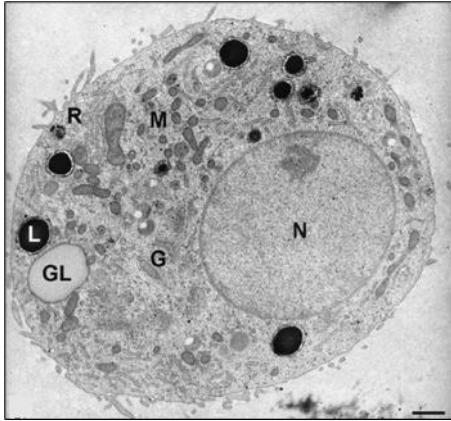


Figure 12. Structure d'un chondrocyte en microscopie à transmission électronique. Les chondrocytes ont une forme ronde, avec un noyau sphérique excentré (N), un réticulum endoplasmique (R), des mitochondries (M), un appareil de Golgi développé (G), des lipides (L) et des vacuoles de glycogène (GL). (Grossissement x4200) (Echelle 1,7 μm). D'après (Marlovits et al. 2003)

b. La matrice extracellulaire

Constituants de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du cartilage est composée à 80% d'eau et environ 20% de macromolécules qui forment un réseau tridimensionnel complexe conférant au cartilage des propriétés de résistance aux contraintes mécaniques exercées sur l'articulation.

Parmi ces macromolécules, les plus abondantes sont le collagène et les protéoglycanes. D'autres classes de molécules sont également présentes en plus petite quantité comme les glycoprotéines, les protéines non collagéniques, les lipides et les phospholipides.

L'**eau** est le composant majoritaire du cartilage articulaire : on en retrouve au niveau des fibres de collagène et dans les pores de la matrice extracellulaire (Sophia Fox, Bedi, et Rodeo 2009). La teneur en eau du cartilage décroît de la superficie (80%) vers la profondeur du cartilage (65%) (Buckwalter et Mankin 1998).

Le **collagène** est la macromolécule la plus abondante des matrices extracellulaires. Dans le cartilage, le collagène de type II représente la forme majoritaire (90 à 95%) mais les types III, V, VI et XI sont également présents (Wachsmuth et al. 2006) ainsi que le type IX en plus faible quantité. Ces collagènes minoritaires ont pour fonction principale de stabiliser les fibres de collagène de type II (Diab, Wu, et Eyre 1996; Han, Grodzinsky, et Ortiz 2011).

Chaque molécule de collagène est composée de trois chaînes α polypeptidiques dont l'assemblage forme une triple hélice. Chaque chaîne est formée d'un ou plusieurs domaines collagéniques de taille variable (répétition d'un triplet d'acides aminés composé de glycine, proline et hydroxyproline) et de domaines non collagéniques, situés aux extrémités de la molécule ou entre deux domaines collagéniques. Les collagènes sont sécrétés par les

chondrocytes sous forme de procollagènes. Le clivage des extrémités C- et N- terminales permet la formation de fibrilles, suite à l'assemblage de plusieurs molécules collagéniques, comme c'est le cas pour les collagènes de type I, II, III, V et XI (Chevalier et Richette 2005). Le collagène de type II existe sous deux formes dues à un épissage alternatif : la forme IIA, la plus longue, exprimée par les chondrocytes dans le cartilage de croissance et la forme IIB exprimée principalement dans le cartilage articulaire adulte. Le réseau fibrillaire tridimensionnel de collagène de type II fournit au cartilage ses propriétés de résistance aux forces de cisaillement, qui aident à stabiliser la matrice (Maroudas et al. 1992; Sophia Fox, Bedi, et Rodeo 2009). Le collagène de type II n'est pas spécifique du cartilage articulaire mais il constitue un marqueur majeur du chondrocyte. Cependant, le collagène de type II est remplacé par du collagène de type X, un collagène non fibrillaire à courtes chaînes polypeptidiques, dans le cartilage calcifié au contact de l'os sous-chondral.

La plus forte teneur en collagène se situe dans la couche superficielle du cartilage, puis elle diminue progressivement avec la profondeur, jusqu'à la zone intermédiaire du cartilage. La concentration en collagène est ensuite stable dans la couche profonde du cartilage (Yin, Xia, et Lu 2012). L'orientation des fibres de collagène dans le réseau tridimensionnel varie en fonction de la profondeur et définit, avec le phénotype des chondrocytes, les différentes couches du cartilage articulaire (Buckwalter et Mankin 1998).

Les **protéoglycanes** représentent la 2^{ème} classe de molécules la plus abondante du cartilage. Ces molécules de haut poids moléculaire sont composées d'un tronc protéique central appelé « *core protein* », sur lequel sont liées de manière covalente 40 à 100 chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Ces deux éléments présentent une très grande variabilité structurale d'un protéoglycane à l'autre. Le cœur protéique est constitué de différents motifs juxtaposés, déterminant le profil de glycosylation, la localisation cellulaire et certaines capacités interactives du protéoglycane final. Les GAG sont des chaînes linéaires sulfatées composées de la répétition d'un glucide aminé (glucosamine ou galactosamine, acétylés) et un autre ose (acide glucuronique ou acide iduronique). On distingue les polymères simples, ne présentant que des résidus d'acide glucuronique le long de leur chaîne (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate), des copolymères possédant à la fois des résidus glucuroniques et iduroniques (héparine, héparane sulfate et dermatane sulfate). Le kératane sulfate est un GAG composé de galactose dans son motif de base (Praillet, Grimaud, et Lortat-Jacob 1998). Ces GAG, fortement chargés négativement, permettent la rétention d'eau et sont responsables des propriétés de compression caractérisant le cartilage (Venkatesan et al. 2005).

La plupart des protéoglycanes existent sous forme d'agrégats associés à de l'acide hyaluronique (GAG non sulfaté). C'est le cas des agrécanes, composés de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate, que l'on retrouve en abondance dans le cartilage sous forme d'agrégats d'agrécanes. Les agrécanes sont liés par leur cœur protéique à un filament central d'acide hyaluronique, via une protéine de liaison et forment ainsi de grands complexes qui viennent s'insérer dans le réseau de fibres de collagène et le stabilise (Kiani et al. 2002; Roughley et Mort 2014).

Le cartilage contient également d'autres protéoglycanes de petit poids moléculaire, comme le biglycane, la décorine et la fibromoduline, dont la protéine centrale possède des séquences riches en leucine (Praillet, Grimaud, et Lortat-Jacob 1998). Ces petits protéoglycanes sont impliqués dans la régulation de la fibrillogenèse du collagène et interviennent donc dans l'assemblage de la matrice (Schönherr et al. 1995). Ils peuvent également lier des facteurs de croissance de type Transforming Growth factor β (TGF- β), dont ils régulent la stabilité, la biodisponibilité et l'activité biologique (Yamaguchi, Mann, et Ruoslahti 1990).

Contrairement au collagène, les protéoglycanes sont faiblement représentés dans la couche superficielle du cartilage et leur concentration augmente fortement dans la couche intermédiaire (Yin, Xia, et Lu 2012).

On retrouve également dans le cartilage des **protéines non collagéniques** comme les glycoprotéines parmi lesquelles la fibronectine, les thrombospondines et les laminines. Ces glycoprotéines peuvent se fixer au collagène de type II et aux protéoglycanes, augmentant ainsi la résistance de la matrice et stabilisant son architecture.

Organisation de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est organisée en 3 régions distinctes, du chondrocyte vers sa périphérie : matrice péricellulaire (PCM), matrice territoriale (TM) et matrice extracellulaire (ECM) (**Figure 13**) (Benninghoff 1925; Clarke 1974; Poole, Flint, et Beaumont 1984). Chaque chondrocyte est entouré par une étroite matrice péricellulaire, formant un chondron. Cette matrice est principalement constituée de collagène de type VI et de protéoglycanes de type perlécane mais contient également des glycoprotéines de type laminine et des protéines non collagéniques. Sa teneur en collagène de type II est relativement faible. La matrice péricellulaire serait impliquée dans de nombreux processus au cours du développement, du maintien et de la dégradation du cartilage articulaire, notamment dans l'organisation de la plaque de croissance,

la modulation de l'activité de certains facteurs de croissance et enzymes et la transduction de signaux biophysiques (Wilusz, Sanchez-Adams, et Guilak 2014). La matrice territoriale entoure la matrice péricellulaire et est composée d'un réseau de fines fibres de collagène de type II. Cette matrice est plus épaisse que la précédente et protégerait les chondrocytes du stress mécanique et contribuerait à la résilience du cartilage articulaire ainsi qu'à sa capacité à résister à des charges importantes. La matrice extracellulaire ou interterritoriale est la matrice la plus étendue et celle qui contribue le plus aux propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. Cette région est caractérisée par la présence de protéoglycanes et de larges fibres de collagène de type II, IX et XI (**Figure 13**) (Sophia Fox, Bedi, et Rodeo 2009).

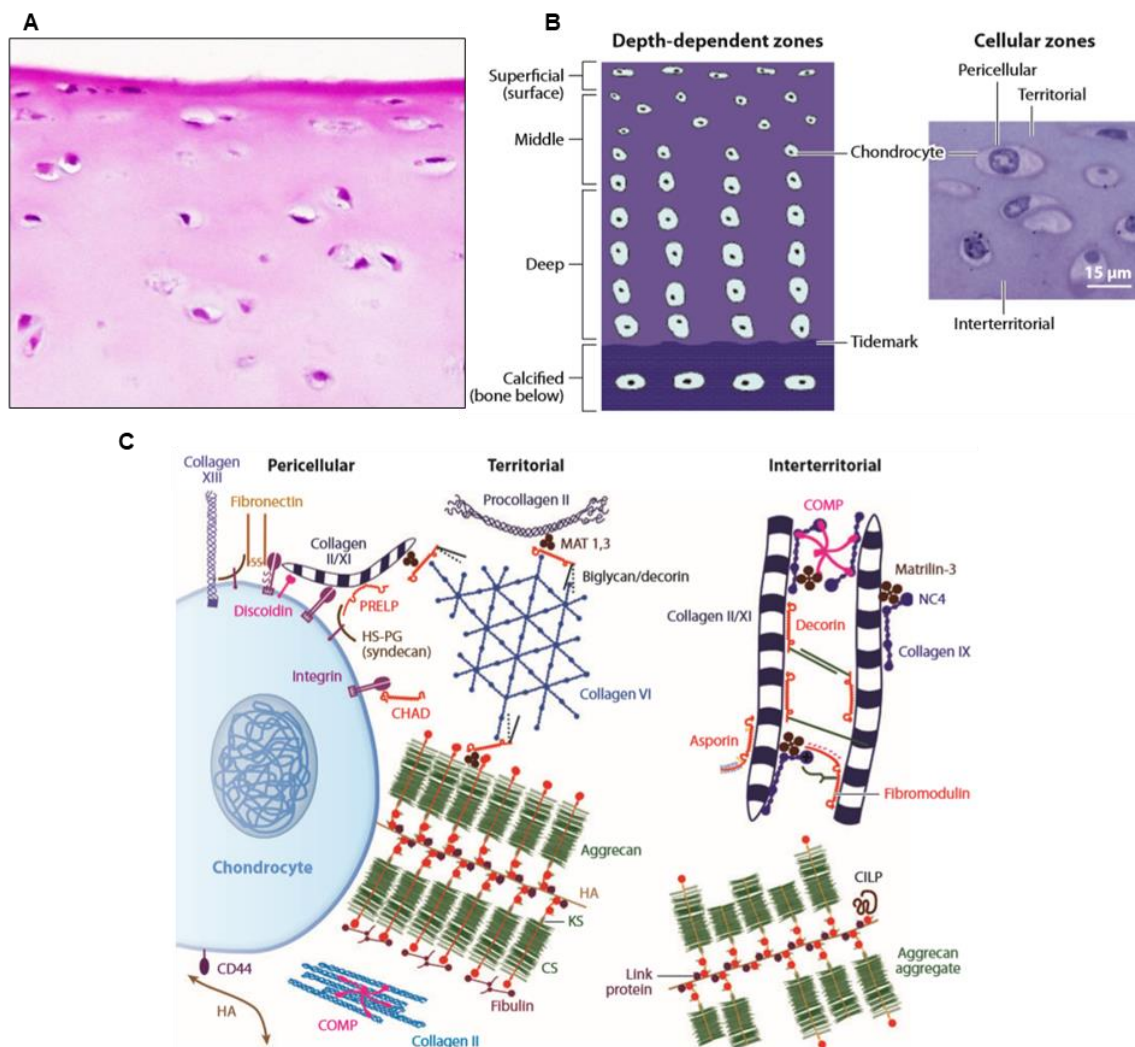


Figure 13. Illustration des constituants de la matrice du cartilage. Organisation de la matrice péricellulaire, territoriale et interterritoriale des chondrocytes. D'après (L. Han, Grodzinsky, et Ortiz 2011)

c. Architecture du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu hétérogène, organisé en différentes couches qui diffèrent entre elles par la composition biochimique et l'organisation de la matrice extracellulaire mais également par le phénotype et le profil d'expression génique des chondrocytes qui les composent. Ainsi, la densité, la forme et la taille des chondrocytes varient en fonction de leur localisation dans le cartilage articulaire. C'est l'architecture du cartilage qui contribue aux propriétés mécaniques de ce tissu (**Figure 14**).

La **lamina splendens** est une zone très fine acellulaire à la surface du cartilage. Cette zone permet l'accrochage de macromolécules présentes dans le liquide synovial et constitue une couche protectrice pour le cartilage (Chevalier et Richette 2005). Elle contient des éléments lubrifiants, comme la lubricine ou l'acide hyaluronique produits par les chondrocytes et les cellules de la membrane synoviale qui permettent des mouvements de glissement avec très peu de friction (Greene et al. 2011; Jay et Waller 2014; Richard F. Loeser et al. 2012a).

La **couche superficielle** est la couche cellulaire la plus proche de la cavité articulaire. Cette couche représente 10 à 20% de l'épaisseur du cartilage articulaire et est composée de nombreux chondrocytes aplatis et de petite taille. Les fibres de collagène sont principalement de type II et IX et sont organisées parallèlement à la surface articulaire. De plus, la matrice extracellulaire est riche en fibronectine et en protéoglycanes de faible poids moléculaire (décorine et biglycane) et pauvre en agrécane. Cette organisation permet notamment de résister face aux forces de cisaillement ou d'étirement qui s'exercent sur le cartilage.

La **couche intermédiaire** ou moyenne représente 40 à 60% de l'épaisseur du cartilage. Les chondrocytes sont gros et sphériques, présents en faible densité dans une matrice riche en fibres épaisses de collagène et en protéoglycanes. Ces fibres ont une orientation oblique et s'entrecroisent. Cette disposition permet au cartilage de résister aux forces de compression (Sophia Fox, Bedi, et Rodeo 2009).

Les chondrocytes des couches superficielle et intermédiaire expriment fortement des marqueurs de différenciation chondrocytaire, comme le facteur de transcription Sox-9 et les composants majoritaires de la matrice extracellulaire, le collagène de type II et l'agrécane (Zuscik et al. 2008). Ces chondrocytes seront qualifiés de chondrocytes articulaires dans la suite de ce manuscrit.

Dans la **couche profonde** ou radiale, qui constitue 30% de l'épaisseur du cartilage, les fibres de collagènes sont épaisses et orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes sont disposés en colonnes ou en clusters, le long des travées des fibres de collagène. Cette couche est la plus riche en protéoglycanes et contient une faible teneur en eau (Sophia Fox, Bedi, et Rodeo 2009) et contribue majoritairement à la résistance aux forces de compression qui s'exercent sur le cartilage.

Les chondrocytes de la couche profonde expriment les marqueurs de différenciation chondrocytaire mais également des marqueurs d'hypertrophie comme Runx2, le collagène de type X, la phosphatase alcaline. Ces chondrocytes ont un phénotype pré-hypertrophique.

La dernière couche du cartilage est la **couche calcifiée**. Cette couche, qui représente 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage, est en contact avec l'os sous-chondral. Le cartilage calcifié est pauvre en protéoglycanes et en collagène qui restent orientés perpendiculairement à la surface. Cette couche est très différente des autres puisqu'elle est minéralisée, son contenu en cristaux d'hydroxyapatite [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] atteint 65% du poids du cartilage calcifié (Y. Zhang et al. 2012) et elle contient des vaisseaux sanguins et des nerfs qui proviennent de l'os sous-chondral. Elle est séparée de la couche profonde du cartilage par une ligne de démarcation basophile et ondulée, la « *tidemark* », de 10 μm visible par une coloration à l'hématoxyline (Fawns et Landells 1953; Gannon et Sokoloff 1999). Cette ligne délimite ainsi le front de minéralisation de la matrice du cartilage.

Certaines fibres de collagène traversent la tidemark, suggérant un lien étroit entre cartilage calcifié et non-calcifié (Madry, van Dijk, et Mueller-Gerbl 2010). En profondeur, la couche calcifiée est séparée de l'os sous-chondral par la ligne cimentante (D. B. Burr, Schaffler, et Frederickson 1988). Contrairement à la tidemark, les fibres de collagène ne traversent pas la ligne cimentante et n'ont pas de continuité avec les fibres de collagène de l'os sous-chondral.

Le cartilage calcifié contient des chondrocytes en faible nombre, arrondis et de grande taille, qui possèdent un phénotype hypertrophique. En effet, ces chondrocytes n'expriment plus les marqueurs de différenciation chondrocytaire Sox-9, collagène de type II et agrécane mais fortement des marqueurs d'hypertrophie comme le collagène de type X et la phosphatase alcaline (Zuscik et al. 2008). Ces chondrocytes synthétisent une matrice extracellulaire minéralisée et contenant une forte proportion en collagène de type X et une faible proportion de collagène de type II. Le cartilage calcifié représente une zone de transition entre le cartilage articulaire non calcifié et l'os sous-chondral minéralisé.

On appelle jonction ostéochondrale la zone comprenant la couche profonde du cartilage articulaire, la couche de cartilage calcifié et l'os sous-chondral sous-jacent.

Ainsi, de la surface vers les zones profondes du cartilage, la densité de chondrocytes décroît progressivement, tandis que leur volume et la proportion de protéoglycanes par rapport au collagène augmentent (M. B. Goldring et Marcu 2009).

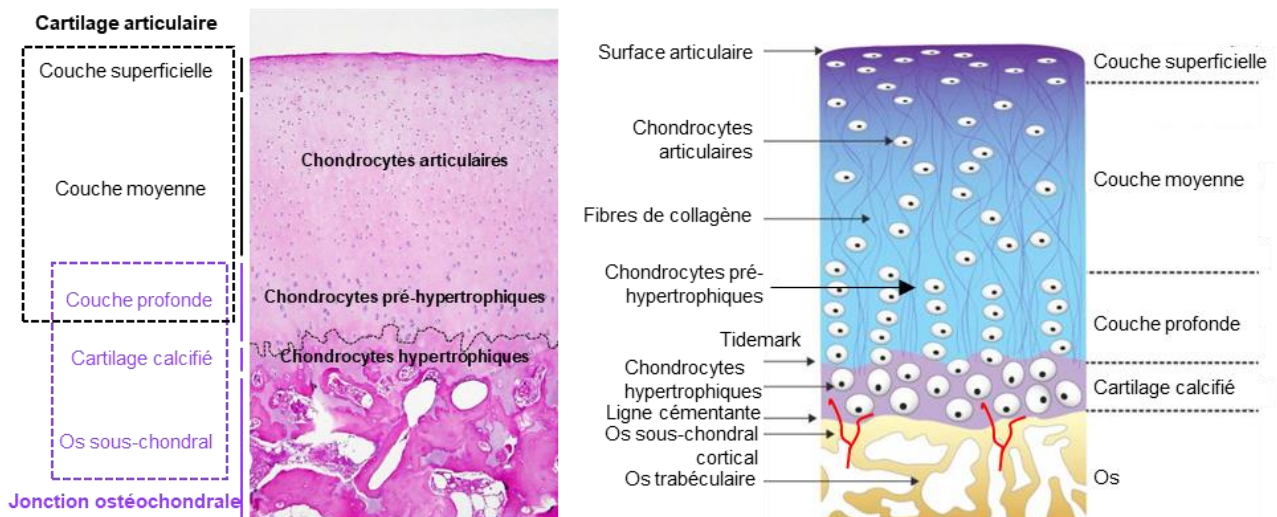


Figure 14. Organisation histologique du cartilage. (A) Coupe histologique d'un cartilage sain avec mise en évidence d'une organisation stratifiée en différentes couches de cartilage. (B) Illustration de la disposition des différents phénotypes de chondrocytes au sein des différentes couches de cartilage. D'après (Gadjanski et Vunjak-Novakovic 2015)

4.1.2. Homéostasie du cartilage

L'homéostasie du cartilage repose sur un équilibre entre la production et la dégradation des composants de la matrice. Suite à différents types de stimuli, biochimiques ou mécaniques, les chondrocytes adaptent leur métabolisme afin de réguler l'homéostasie de la matrice.

Les chondrocytes activent la synthèse des composants matriciels (collagènes de type II, VI, IX, agrécanes) par des facteurs de croissance comme l'IGF-1, les BMP et le TGF- β qui ont un rôle anabolique. La dégradation des protéines de la matrice passe par la synthèse d'enzymes matricielles, les MMP de type collagénases, gélatinases et stromélysines et les ADAMTS. Les facteurs pro-inflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β), interleukine-6 (IL-6) et Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) peuvent stimuler la production de protéases et inhiber les Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP), qui régulent négativement l'activité des MMP et ADAMTS (Aigner, Soeder, et Haag 2006).

a. **Maintien du phénotype des chondrocytes**

Le maintien des différents phénotypes de chondrocytes présents dans le cartilage articulaire est indispensable à l'homéostasie du tissu. Il existe un dialogue entre les chondrocytes des différentes couches du cartilage articulaire qui assure le maintien de l'architecture stratifiée du cartilage et qui régule sa minéralisation.

Jiang *et al.* ont étudié les interactions cellulaires entre les différentes populations de chondrocytes des différentes zones du cartilage articulaire bovin (J. Jiang et al. 2008). Ils ont ainsi montré que lorsque les couches superficielle, intermédiaire et profonde du cartilage articulaire étaient séparées et cultivées indépendamment *in vitro*, la couche profonde était la seule à présenter une activité phosphatase alcaline et une minéralisation de sa matrice accrue en réponse à une stimulation par l'hormone thyroïdienne T3. En revanche, lorsque les chondrocytes de la couche profonde sont cultivés avec les chondrocytes de la couche superficielle ou intermédiaire, l'effet de l'hormone T3 sur l'activité de la phosphatase alcaline et la minéralisation de la matrice était inhibé. Ainsi, les chondrocytes des zones superficielle et intermédiaire agissent directement sur les chondrocytes de la zone profonde et inhibe leur différenciation hypertrophique (J. Jiang et al. 2008). Cette régulation de l'hypertrophie est assurée par l'axe Ihh/PTHrP. Ihh, exprimé par les chondrocytes pré-hypertrophiques de la couche profonde du cartilage, stimule l'expression de PTHrP par les chondrocytes articulaires des couches superficielle et intermédiaire, qui inhibent alors la différenciation hypertrophique des chondrocytes pré-hypertrophiques.

Ji *et al.* ont récemment mis en évidence la présence de 7 populations de chondrocytes, différentes d'un point de vue moléculaire, au sein du cartilage humain arthrosique et ont identifié trois nouveaux phénotypes chondrocytaires, les chondrocytes effecteurs, les chondrocytes régulateurs et les chondrocytes homéostatiques (Ji et al. 2019). Ils ont également classés les chondrocytes hypertrophiques en deux sous-populations, le cluster A, qui exprime des gènes liés au développement du cartilage et des tissus conjonctifs et à la régulation négative de la croissance, et le cluster B, qui exprime des gènes liés à l'organisation de la matrice extracellulaire, à l'ossification et à la minéralisation. Une autre analyse par *single-cell* a démontré une hétérogénéité cellulaire dans le cartilage de souris et a révélé la présence de 9 sous-populations de chondrocytes (Sebastian et al. 2021).

b. Charge mécanique

La charge mécanique est un élément indispensable à l'homéostasie du cartilage. Le cartilage absorbe et dissipe ces charges grâce à une organisation spatiale des composants de la matrice extracellulaire particulière dans ses différentes couches.

Ainsi, de nombreuses équipes se sont intéressées aux effets bénéfiques ou délétères d'une charge mécanique, sur les fonctions des chondrocytes et la synthèse de matrice.

Des études *in vivo* ont montré que l'immobilisation des membres inférieurs chez le rongeur entraîne des lésions du cartilage, avec une perte de protéoglycanes associée à une augmentation de MMP-3 et ADAMTS-5 (Leong et al. 2010). Le cartilage patellaire et tibial subit également d'importantes modifications morphologiques, avec une diminution de son épaisseur, volume et surface, chez des patients immobilisés pendant 7 semaines pour une fracture de la cheville (Hinterwimmer et al. 2004). Des travaux *in vitro* ont montré qu'une contrainte mécanique modérée appliquée sur des chondrocytes ou des explants de cartilage, entraînaient l'activation de cascades de signalisation anabolique, avec une augmentation de la synthèse de GAG, d'agrécane et de collagène de type II, un effet anti-inflammatoire avec la suppression de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et médiateurs pro-inflammatoires comme la cyclooxygénase 2 (COX-2), la prostaglandine E2 (PGE₂) et le monoxyde d'azote (NO), l'augmentation des signalisations anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) ainsi que la réduction de l'activité de protéases MMP et ADAMTS (Bader, Salter, et Chowdhury 2011; Leong et Sun 2014).

Cependant, les effets bénéfiques ou délétères de la charge mécanique dépendent de la durée et de la fréquence d'exposition ainsi que du type de charge. Une surcharge mécanique peut augmenter la dégradation de la matrice extracellulaire de chondrocytes, via l'expression de MMP et d'IL-1 β (Fujisawa et al. 1999). Une compression excessive d'explant de cartilage induit la production de PGE₂ (Gosset et al. 2006), d'IL-8 (Chauffier et al. 2012) et de Nerve Growth Factor (NGF) (Pecchi et al. 2014) ainsi qu'une augmentation de la libération des GAG et de l'activité des MMP (Bougault et al. 2012).

Les chondrocytes détectent les stimuli mécaniques grâce à des mécanorécepteurs, des systèmes senseurs des vibrations, tensions et pressions, comme les intégrines, les connexines, les syndécans et les canaux ioniques. Comme la plupart des cellules eucaryotes quiescentes, les chondrocytes possèdent un cil primaire, organe non-motile localisé à leur surface, possédant des propriétés sensorielles. Il contient de nombreux mécanorécepteurs et est essentiel pour le

traitement des informations, comme les stimulations mécaniques ou la charge osmotique (Ruhlen et Marberry 2014). Ainsi, des altérations de la structure ou de la taille du cil primaire entraînent des modifications dans la réponse des chondrocytes aux stimuli mécaniques (Thorpe et al. 2016) et la déplétion du cil primaire conduit à une désorganisation du cartilage articulaire et l'expression de marqueurs de l'hypertrophie (Chang, Ramaswamy, et Serra 2012).

c. Propriétés avasculaires du cartilage articulaire et hypoxie

Propriétés avasculaires du cartilage

Le cartilage est l'un des rares tissus d'origine mésenchymateuse à être dépourvu de vaisseaux sanguins, excepté au cours de l'ossification endochondrale. Ainsi, l'apparition de vaisseaux résulte d'une rupture de l'équilibre de ce tissu. Le cartilage articulaire mature conserve ses propriétés avasculaires à l'état physiologique et possède donc une capacité de résistance à l'invasion vasculaire.

Dans un contexte d'angiogenèse tumorale, Hanahan et Folkman émettent l'hypothèse selon laquelle l'angiogenèse est régulée par un équilibre entre inducteurs et inhibiteurs de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (Hanahan et Folkman 1996). Ainsi, les cellules endothéliales alterneraient entre un état de quiescence et un état initiateur de l'angiogenèse par les effets cumulés de facteurs pro et anti-angiogéniques. Le « switch » angiogénique, passage d'un état inactif à un état activé des cellules endothéliales, se fait par l'augmentation des niveaux de facteurs pro-angiogéniques et/ou une diminution des niveaux de facteurs angiostatiques.

Plusieurs molécules angiogéniques sont présentes dans le cartilage comme le FGF-2 (Gonzalez et al. 1990; Twal et al. 1994), le TGF- β (Gelb, Rosier, et Puzas 1990) et le VEGF (Harada et al. 1994). Ces molécules agissent sur les cellules endothéliales en activant leur mise en mouvement par chimioattraction et leur division cellulaire par mitogenèse. Le cartilage serait ainsi un tissu potentiellement « angiogénique » qui cependant maintiendrait un phénotype « angiostatique ou anti-angiogénique » grâce à la présence de molécules anti-angiogéniques (Hiraki et al. 1997).

La résistance du cartilage à l'invasion vasculaire a été étudiée pour la première fois par l'équipe de Kuettner, avec un modèle de membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet sur laquelle ont été greffés différents types de tissus, dont du cartilage hyalin. Ces travaux ont montré que le cartilage articulaire était le seul tissu, avec la cornée, à ne pas être envahi par le

mésenchyme vascularisé de la membrane chorioallantoïdienne (Eisenstein et al. 1973) ; et que le cartilage contenait des facteurs de faible poids moléculaire, potentiellement des inhibiteurs de protéases, expliquant cette absence d'invasion vasculaire (Eisenstein et al. 1975).

L'équipe de Moses a mis en évidence en 1990 une protéine dérivée du cartilage bovin à l'origine de sa résistance à l'invasion vasculaire par des tests *in vitro* de prolifération et de migration de cellules endothéliales et *in vivo* sur des membranes chorioallantoïdiennes d'embryon de poulet. Cette protéine de 35 kDa possède des propriétés d'inhibition des métalloprotéases de type collagénases et inhibe la néovascularisation (M. A. Moses, Sudhalter, et Langer 1990; Marsha A. Moses et Langer 1991; Moses, Sudhalter, et Langer 1992). Les inhibiteurs de protéases et de métalloprotéases exercent leur activité anti-angiogénique en bloquant la dégradation de la matrice extracellulaire, nécessaire à l'invasion vasculaire. Ainsi, les TIMP-1, TIMP-3 et les inhibiteurs de protéases comme le Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor (SLPI) et le Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) sont impliqués dans le maintien des propriétés avasculaires du cartilage (Fransès et al. 2010). TIMP-1 est le plus abondant dans le cartilage et est capable d'inhiber toutes les MMP de type collagénase. TIMP-3 joue un rôle essentiel dans l'inhibition des ADAMTS-4 et ADAMTS-5, particulièrement impliqués dans la dégradation des agrécanes.

Le processus d'angiogenèse s'initiant avec la dégradation de la membrane basale des cellules endothéliales par des enzymes protéolytiques comme les MMP, les inhibiteurs de protéases et plus particulièrement les inhibiteurs de collagénases se révèlent être de potentiels facteurs anti-angiogéniques. D'autres étapes de l'angiogenèse nécessitent également l'action protéolytique d'enzymes, comme la migration des cellules endothéliales dans le stroma périvasculaire, l'élongation des bourgeons néoformés ou la formation de la lumière du vaisseau. De plus, la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage est nécessaire pour permettre une invasion vasculaire au cours de l'ossification endochondrale. Ainsi toute molécule interférant dans une étape de l'angiogenèse est considérée comme potentiellement anti-angiogénique.

Quelques années plus tard, la chondromoduline-I (ChM-I), une glycoprotéine de 25 kDa, a été identifiée et purifiée dans le cartilage bovin fœtal (Hiraki et al. 1991). Cette protéine stimulerait la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance et la synthèse de protéoglycanes *in vitro* (Hiraki et al. 1991, 1997). De plus, la ChM-I a été décrite comme étant un inhibiteur de l'angiogenèse, en inhibant la prolifération de cellules endothéliales et leur agencement en structures tubulaires *in vitro* (Funaki et al. 2001; Hiraki et al. 1997) et *in vivo*

(Shukunami et al. 1999). Au cours de l'ossification endochondrale, la ChM-I a été localisée dans des zones avasculaires du cartilage et sa présence était significativement réduite dans le cartilage calcifié, où des vaisseaux sanguins sont observés. Ainsi, la ChM-I jouerait un rôle clé dans la régulation de l'invasion vasculaire du cartilage au cours du processus d'ossification endochondrale (Hiraki et al. 1997). Cette glycoprotéine se retrouve également en abondance dans la partie interne des ménisques du genou, qui est une zone avasculaire tandis qu'elle est absente de la partie périphérique du ménisque, une zone vascularisée par le plexus capillaire périméniscal (Fujii et al. 2013). Plusieurs études montrent que la ChM-I est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie du cartilage et la stabilisation du phénotype chondrocytaire. Elle bloquerait l'activité catabolique induite par HIF-2 α (Zhang et al. 2016) et la différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires (Klinger et al. 2011). La délétion du gène codant la ChM-I ne montre pas d'anormalités phénotypiques dans l'ossification endochondrale ni le développement du cartilage. Cependant, les souris ChM-I^{-/-} présentent une densité minérale osseuse augmentée accompagnée d'une diminution de la résorption osseuse, indiquant que la ChM-I pourrait aussi être un facteur important pour le remodelage et le métabolisme osseux (Nakamichi et al. 2003).

Les membres de la famille des thrombospondines font également partie des composants de la matrice extracellulaire ayant des propriétés anti-angiogéniques. Les TSP-1 et 2, glycoprotéines trimériques de 450 kDa dont les structures en amino-acides sont très similaires, ont été largement décrites comme inhibant l'angiogénèse (Armstrong et Bornstein 2003; Good et al. 1990; Iruela-Arispe et al. 1999). Les autres membres de la famille des TSP (TSP-3, 4 et 5 ou COMP) ne semblent pas avoir de propriétés anti-angiogéniques (Volpert et al. 1995). Dans le cartilage murin, les TSP-1 et 2 ont été mises en évidence par immunohistochimie dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance, au niveau des zones quiescentes et des zones prolifératives, en amont de la zone hypertrophique (Tooney et al. 1998). Dans le cartilage humain, la TSP-1 a été détectée dans la matrice péricellulaire ainsi que dans la matrice extracellulaire des couches intermédiaire et profonde, où les chondrocytes ont un phénotype articulaire et pré-hypertrophique. La TSP-1 ne semble pas être présente dans le cartilage calcifié contenant des chondrocytes hypertrophiques (Pfander et al. 2000). Les propriétés anti-angiogéniques des TSP-1 et 2 sont relayées par plusieurs mécanismes complexes (Patra et Sandell 2012) et passent notamment par un de leur récepteur, le CD36 qui entraîne l'apoptose des cellules endothéliales (Nör et al. 2000) et inhibe la migration de ces cellules ainsi que la formation de capillaires (Huang et al. 2017).

Les fragments de collagène peuvent également avoir des propriétés anti-angiogéniques. Le plus décrit est l'endostatine purifiée en 1997, à partir de milieux conditionnés de cellules murines d'hémangioendothéliomes (O'Reilly et al. 1997). Ce fragment de 20 kDa correspond aux acides aminés de la région C-terminale non collagénique du collagène de type XVIII, issu du clivage protéolytique par la cathépsine L et dans une moindre mesure par plusieurs protéases dont la MMP-9 (Ferrerias et al. 2000). L'endostatine participe aux fonctions anaboliques des chondrocytes et permet le maintien de l'homéostasie du cartilage (Yi Feng et al. 2005) mais elle est également impliquée dans la résistance à l'invasion vasculaire. Comme la plupart des inhibiteurs de l'angiogenèse, l'endostatine inhibe la prolifération et la migration de cellules endothéliales et induit leur apoptose. L'endostatine a été détectée à la fois dans la plaque de croissance et dans le cartilage articulaire adulte, chez l'homme, la souris et le rat. De plus, dans le fibrocartilage méniscal, la concentration en endostatine est plus forte dans la partie centrale avasculaire du ménisque que dans sa partie externe vascularisée (Patra et Sandell 2012; Thomas Pufe, Petersen, et al. 2004).

Le collagène de type II participerait également aux propriétés avasculaires du cartilage. En effet, l'extrémité N-terminale du procollagène de type IIB (PIIBNP), clivé par des protéases avant incorporation du collagène dans la matrice extracellulaire, exercerait des activités anti-angiogénique et antitumorale. Ce fragment contient un domaine de liaison aux intégrines, le double motif RGD, qui induit la mort de cellules tumorales exprimant les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$. Les chondrocytes exprimant très peu ces intégrines sont protégés de l'action du PIIBNP. Plusieurs types cellulaires comme les ostéoclastes et les cellules endothéliales expriment les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ suggérant ainsi que le PIIBNP maintiendrait le cartilage avasculaire en empêchant l'invasion vasculaire provenant de l'os sous-chondral (Hayashi et al. 2011; Z. Wang et al. 2010).

Le Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF), également appelé serpine F1, est une glycoprotéine de 50 kDa faisant partie de la famille des inhibiteurs des sérines protéases, bien qu'il n'inhibe pas les protéases (Becerra et al. 1995). Le PEDF est impliqué dans la régulation de l'angiogenèse au cours du développement et dans la régulation de l'homéostasie de la rétine (K. Mori et al. 2001) où il inhibe la prolifération et la migration de cellules endothéliales et induit leur apoptose (Dawson et al. 1999). Dans la plaque de croissance murine, le PEDF est principalement exprimé dans la matrice extracellulaire de la zone de réserve, de la zone proliférative et de la couche supérieure de la zone hypertrophique, tandis qu'il est absent de la couche profonde de la zone hypertrophique non loin des zones vascularisées (Quan et al. 2005).

Le PEDF se lie aux GAG et aux collagènes de la matrice extracellulaire avec une forte affinité (Meyer, Notari, et Becerra 2002).

Enfin, les protéoglycanes seraient également des potentiels inhibiteurs de l'angiogénèse (Laurence Pesesse, Sanchez, et Henrotin 2011). Une étude a montré que la diminution du contenu en protéoglycanes de la matrice extracellulaire était associée à l'invasion vasculaire du cartilage (Smith et al. 2003). Certains protéoglycanes se fixent à des protéines angiogéniques, qui se retrouvent alors bloquées dans la matrice extracellulaire et ne peuvent plus exercer leur rôle pro-angiogénique. Par exemple, les perlécans fixent le FGF-2 dans la matrice péricellulaire des chondrocytes via l'héparane sulfate (Vincent et al. 2007) et les isoformes 189 et 206 du VEGF se lient aux protéoglycanes contenant de l'héparine (Cohen et al. 1995), empêchant ainsi la liaison de ces facteurs angiogéniques à leur récepteur tyrosine-kinase et bloquant leur diffusion dans la matrice extracellulaire. Les protéoglycanes à chondroïtine sulfates inhiberaient l'angiogénèse, en réduisant l'expression de MMP et la formation de vaisseaux *in vitro*. Ce mécanisme passerait par l'inhibition de la phosphorylation de la Focal Adhesion Kinase (FAK) impliquée dans la signalisation des intégrines, qui est activée au cours de l'angiogénèse (T. Kobayashi et al. 2017).

Dans l'ensemble, la présence de nombreux facteurs anti-angiogéniques associés à la matrice extracellulaire du cartilage permet de protéger ce tissu de l'invasion vasculaire et de maintenir l'homéostasie du cartilage. Le cartilage est donc un tissu physiologiquement hypoxique. Un déséquilibre de la balance angiogénique en faveur de protéines pro-angiogéniques pourrait permettre le passage de vaisseaux de l'os sous-chondral au cartilage articulaire et rompre l'homéostasie du cartilage.

[Hypoxie physiologique du cartilage](#)

L'absence de vaisseaux sanguins engendre un environnement hypoxique au sein du cartilage articulaire. La teneur en oxygène serait de 5 à 10% à sa surface et de moins de 1% dans les couches profondes du cartilage (S. Zhou, Cui, et Urban 2004).

Contrairement aux tissus vascularisés qui détectent l'hypoxie comme un signal de stress, le cartilage articulaire est parfaitement adapté aux faibles niveaux d'oxygène, l'hypoxie constituant une condition physiologique normale dans ce tissu avasculaire.

Un facteur a été identifié comme un acteur clé de ce métabolisme hypoxique, le facteur hypoxia-inducible factor HIF- α . La protéine HIF- α est produite aussi bien en normoxie qu'en

hypoxie. Cependant, en présence d'une quantité suffisante d'oxygène, HIF est rapidement dégradée par des hydrolases cytosoliques, sa demi-vie est donc assez réduite (environ 5 minutes). En quantité faible d'oxygène (5% d'oxygénation), l'hydroxylation de HIF- α est progressivement inhibée, ainsi la protéine HIF- α n'est plus dégradée par le protéasome. HIF- α peut alors s'accumuler dans le cytoplasme et former un dimère avec sa sous-unité β , produite de manière constitutive et non sensible à l'oxygène. L'hétérodimère HIF α/β est alors transloquée au noyau, où il se fixera sur son élément de réponse à l'hypoxie (Hypoxia response Element) au niveau de gènes cibles, activant ainsi leur transcription.

L'hypoxie est nécessaire au maintien de l'intégrité du cartilage et cette homéostasie passe principalement par l'action de l'isoforme HIF-1 α . Cette isoforme de 120 kDa, a été purifiée en 1995 par Wang et Semenza (G. L. Wang et Semenza 1995) et a été décrit dans le cartilage comme un facteur essentiel pour la fonction, la survie et le maintien du phénotype des chondrocytes (E. Schipani et al. 2001). HIF-1 α entraîne l'augmentation de l'expression et de l'activité de Sox9, conduisant à la production accrue des composants de la matrice extracellulaire (collagène de type II et agrécan) et à l'inhibition de gènes impliqués dans la différenciation hypertrophique (Runx2, MMP-13, collagène de type X, Ostérix). HIF-1 α agit également comme un facteur anti-catabolique, empêchant la dégradation du cartilage en diminuant la production d'enzymes cataboliques comme la MMP-13 et les ADAMTS-5 et en augmentant celle d'inhibiteurs de protéases, les TIMP-3 (**Figure 15**) (Thoms et al. 2013).

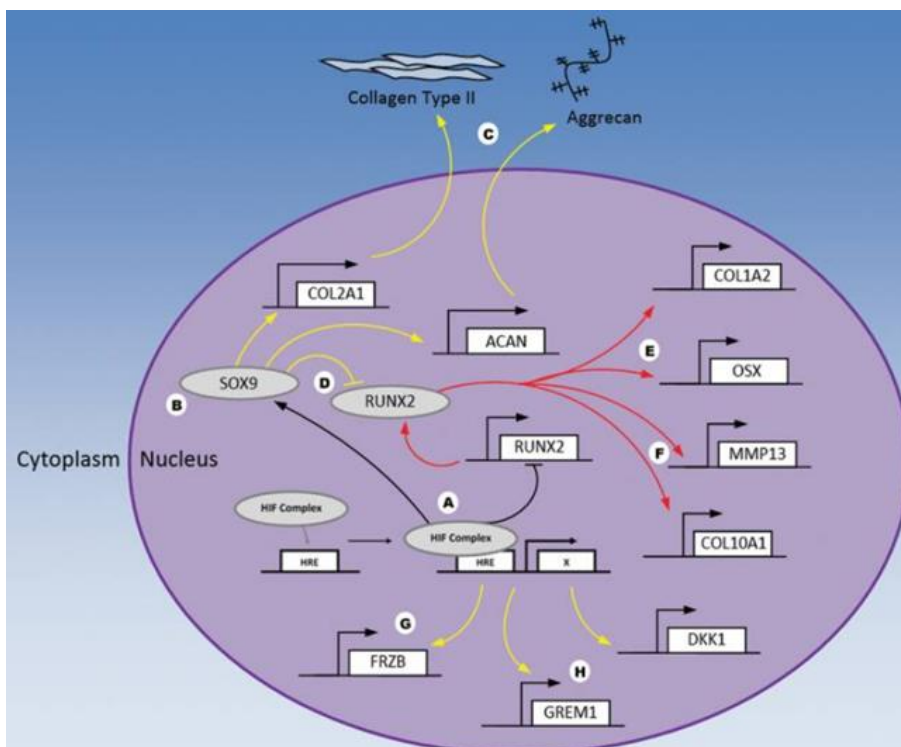


Figure 15. Voie de signalisation HIF. D'après (Taheem, Jell, et Gentleman 2020)

4.2. Le tissu osseux

4.2.1. Structure et fonctions de l'os

L'os est un organe complexe composé de plusieurs tissus dont le tissu osseux et la moelle osseuse. L'os assure quatre grandes fonctions :

- une fonction de soutien de l'organisme puisqu'il permet la locomotion du corps grâce à l'insertion des muscles, tendons et ligaments ;
- une fonction de protection des organes vitaux : la cage thoracique pour le cœur et les poumons, le crâne pour le cerveau et la colonne vertébrale pour la moelle épinière ;
- une fonction métabolique puisqu'il régule le stock de calcium et de phosphate de l'organisme et est impliqué dans le métabolisme énergétique par la sécrétion d'une hormone, l'ostéocalcine ;
- une fonction hématopoïétique par la moelle osseuse qui contient des progéniteurs des cellules sanguines.

Les os longs se divisent en trois régions : les épiphyses, les métaphyses et la diaphyse. Les épiphyses constituent les deux extrémités de l'os et sont recouvertes de cartilage hyalin articulaire. La métaphyse est une zone intermédiaire entre les épiphyses et la diaphyse qui constitue la partie médiane de l'os. Le périoste est une membrane fibreuse qui recouvre les os, à l'exception des articulations (**Figure 16**).

L'os sous-chondral est situé sous le cartilage calcifié et fait la transition entre le tissu cartilagineux et le tissu osseux. Il est composé de deux couches distinctes : la plaque sous-chondrale et l'os sous-chondral trabéculaire.

La plaque sous-chondrale est un os cortical dense séparé du cartilage calcifié par la ligne cimentante (Madry, van Dijk, et Mueller-Gerbl 2010). Cette fine plaque de 0,2 à 0,4 mm est constituée d'ostéons, également appelé système de Havers, qui constituent une unité fonctionnelle. Ces ostéons sont cylindriques (200 à 300 μm de diamètre) et se composent de 5 à 20 lamelles de tissu osseux, organisés de manière concentrique autour d'un canal central neuro-vasculaire de Havers, plus ou moins ouverts (50 μm de diamètre en moyenne). Les canaux de Havers renferment 1 à 2 petits vaisseaux sanguins avec un endothélium fenestré (sinusoïdes) et des fibres nerveuses sans myéline, qui permettent la nutrition et la transmission de stimuli à la plaque sous-chondrale. L'orientation des ostéons est parallèle à l'axe longitudinal

de l'os et sont reliés entre eux par des canaux transversaux ou obliques de Volkmann. Dans une lamelle, les fibres de collagène de type I sont toutes parallèles mais les fibres des deux lamelles adjacentes sont toujours orientées dans des directions différentes. Cette disposition renforce la structure de l'ostéon, fournissant ainsi une grande résistance aux forces de torsion que peut subir l'os.

La plaque sous-chondrale fusionne ensuite avec l'os sous-chondral trabéculaire ou spongieux, qui est un os plus poreux et actif que l'os compact. Dépourvu d'ostéons, il est constitué de travées ou trabécules osseuses qui forment une trame irrégulière. Les travées sont reliées entre elles et entourées par du tissu adipeux et de la moelle osseuse hématopoïétique. Les travées forment ainsi un réseau tridimensionnel dont l'orientation dépend des contraintes mécaniques.

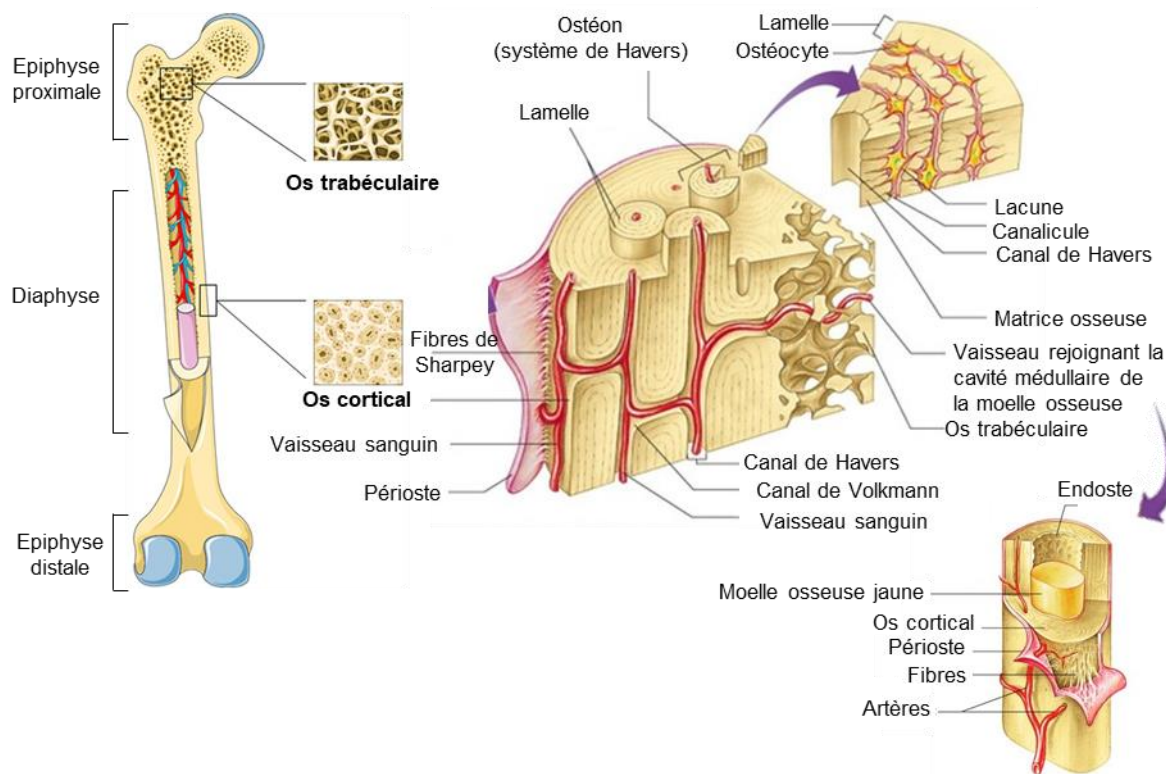


Figure 16. Structure et organisation d'un os long. L'os long des membres supérieurs et inférieurs présente à ses extrémités une épiphyse proximale et distale, formée d'os cortical ou trabéculaire et recouvert de cartilage hyalin articular. La partie centrale de l'os est constituée d'os cortical, organisé sous formes d'ostéons.

4.2.2. Les cellules de l'os

Le tissu osseux est composé de quatre types de cellules qui produisent, résorbent, maintiennent et organisent la matrice extracellulaire minéralisée de l'os : les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes (Marks et Popoff 1988). Ces cellules se regroupent en deux catégories, celles qui produisent la matrice osseuse (les ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes) et celles qui la résorbent (les ostéoclastes), assurant ainsi un processus de remodelage de l'os. Elles communiquent de façon étroite et permanente par la sécrétion de facteurs solubles ou par contact direct entre les cellules.

Les cellules osseuses trouvent leur origine dans la moelle osseuse, qui produit deux grands groupes de cellules souches : les cellules souches de la lignée hématopoïétique qui vont donner les cellules sanguines et immunitaires, dont la lignée monocyte-macrophage à l'origine des ostéoclastes et les cellules souches mésenchymateuses ou stromales, qui sont à l'origine des fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales, chondrocytes et des cellules osseuses ostéoformatrices.

a. Les cellules d'origine mésenchymateuse

Les cellules ostéoformatrices appartiennent à la lignée ostéoblastique. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont les cellules souches mésenchymateuses, présentes dans le périoste et le stroma de la moelle osseuse. Le facteur clé de la différenciation ostéoblastique est le facteur Runx2 (Ducy et al. 1997). Ce facteur essentiel permet l'activation de nombreux gènes exprimés par les ostéoblastes matures, comme le collagène de type I, la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéocalcine et l'ostéopontine.

La lignée ostéoblastique est composée de plusieurs types cellulaires correspondant à différents niveaux de maturation (**Figure 17**).

Les pré-ostéoblastes sont les précurseurs des ostéoblastes matures. Ces cellules allongées sont capables de se diviser mais ne synthétisent pas de matrice (Blair, Sun, et Kohanski 2007). Elles sont généralement présentes à proximité des surfaces de formation osseuse, où les ostéoblastes synthétisent de l'os (Franz-Odenaal, Hall, et Witten 2006). L'acquisition de ce phénotype transitoire entre l'ostéoprogéniteur et l'ostéoblaste mature débute par la condensation de cellules souches mésenchymateuses, grâce au facteur de transcription Sox-9. Ce facteur clé dans l'engagement vers la lignée ostéoblastique laisse ensuite place au facteur Runx2 qui assure exclusivement la différenciation ostéoblastique. Une fois Runx2 activé, les

cellules sont définies comme des pré-ostéoblastes et vont subir une succession de transformations avant d'acquérir un phénotype d'ostéoblastes matures, notamment grâce au facteur de transcription Ostérix. Ces transformations commencent par la prolifération des pré-ostéoblastes qui vont exprimer la fibronectine, le collagène de type I, les récepteurs au TGF- β et l'ostéopontine. Ils vont ensuite quitter le cycle cellulaire pour débiter leur différenciation et établir leur matrice extracellulaire par la production de phosphatases alcalines et de collagène de type I. Enfin, les cellules produisent de l'ostéocalcine, qui va favoriser la minéralisation de la matrice extracellulaire. A ce stade, l'ostéoblaste prend sa forme cuboïdale qui le caractérise (Long 2011; Rutkovskiy, Stensløykken, et Vaage 2016).

Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboïdales de 20 μm de diamètre, formant une monocouche de cellules jointives le long de la matrice osseuse. Ces cellules n'ont plus la capacité de se diviser mais présentent un cytoplasme riche en réticulum endoplasmique, en mitochondries et un appareil de Golgi très développé, démontrant une activité de synthèse très importante. Leur membrane plasmique est très riche en phosphatase alcaline, contribuant ainsi au processus de minéralisation de la matrice osseuse. Les ostéoblastes expriment et synthétisent de nombreuses protéines matricielles telles que le collagène de type I, la fibronectine, la sialoprotéine osseuse, l'ostéopontine, l'ostéocalcine, des protéoglycanes et des facteurs de croissance qui participent à la formation de la matrice osseuse également appelée matrice ostéoïde. Suite au dépôt de la matrice ostéoïde, les ostéoblastes minéralisent cette matrice par précipitation du calcium et d'hydroxydes de phosphate pour former des cristaux d'hydroxyapatite. Les ostéoblastes sécrètent également un certain nombre de facteurs de croissance et de cytokines, qui jouent un rôle important dans le remodelage osseux, notamment en régulant la différenciation et la prolifération des ostéoclastes. Les ostéoblastes peuvent activer la résorption osseuse en sécrétant du Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) qui stimule la différenciation des monocytes et macrophages en ostéoclastes ; mais également du Receptor Activator of Nuclear factor κ B Ligand (RANKL) qui va se fixer sur son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes et favoriser leur prolifération, fusion et activation. Au contraire, les ostéoblastes peuvent inhiber la résorption osseuse par la sécrétion d'ostéoprotégérine, qui est un récepteur soluble de RANKL et qui va limiter sa fixation avec son récepteur membranaire RANK et donc empêcher l'activation des ostéoclastes. Ainsi, les ostéoblastes régulent le remodelage osseux en fonction de la balance RANKL/OPG (ostéoprotégérine) qu'ils produisent (Boyce et Xing 2008). D'autres molécules permettent également de moduler la résorption osseuse comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 (activation) ou

l'IL-11 (inhibition) (Suda et al. 1999). Les ostéoblastes expriment également le récepteur à la parathormone (PTH), qui une fois activé par son ligand entraîne l'expression de RANKL et l'activation des ostéoclastes (Blair, Sun, et Kohanski 2007). A l'issue de la période de formation de la matrice ostéoïde, la majorité des ostéoblastes entrent en apoptose. Les ostéoblastes restants se transforment soit en ostéocytes soit en cellules bordantes (Manolagas 2000).

Les ostéocytes sont des ostéoblastes enfouis dans la matrice osseuse minéralisée, au sein de petites loges appelées ostéoplastes. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os mature. L'ostéoblaste va subir de nombreuses transformations avant d'acquiescer un phénotype plus quiescent. Le cytoplasme se réduit considérablement (Palumbo 1986) et forme de nombreux prolongements cytoplasmiques, donnant une forme étoilée aux ostéocytes. Ces cellules contiennent peu d'organites, traduisant une faible activité de synthèse protéique (Knothe Tate et al. 2004) mais renferment un cytosquelette très développé. Les ostéocytes communiquent entre eux, ainsi qu'avec les ostéoblastes et cellules bordantes par des jonctions communicantes présentes sur leurs prolongements cytoplasmiques. Les marqueurs ostéoblastiques disparaissent progressivement pour des marqueurs ostéocytaires, comme la sclérostine, qui inhibe la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (van Bezooijen et al. 2004); la Dental Matrix Protein 1 (DMP-1), phosphoprotéine exprimée par les pré-ostéocytes et les ostéocytes (Toyosawa et al. 2001) ; le CD44, glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhérence cellules-matrice (Hughes, Salter, et Simpson 1994) et la Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) impliquée dans la minéralisation osseuse (Nampei et al. 2004). Les ostéocytes forment un vaste réseau et interviennent dans la transmission de signaux mécanosensoriels, jouant ainsi un rôle essentiel dans le remodelage osseux en adaptant la formation ou la résorption de la matrice en réponse à un stress mécanique (Heino et al. 2009). De plus, les ostéocytes sécrètent des facteurs solubles comme le RANKL, qui agiront de manière paracrine sur les autres cellules du tissu osseux.

Les cellules bordantes sont des cellules aplaties qui recouvrent les surfaces osseuses inactives, non soumises aux processus de formation et de résorption. Ces cellules ont un métabolisme quiescent mais peuvent être réactivées sous l'action de la PTH et redevenir des ostéoblastes matures, constituant ainsi une source d'ostéoblastes chez l'adulte (Dobnig et Turner 1995; Matic et al. 2016). Les cellules bordantes joueraient un rôle important dans le remodelage osseux, en digérant le collagène non minéralisé avant la résorption de la matrice minéralisée par les ostéoclastes et en « nettoyant » les lacunes de résorption engendrées par les ostéoclastes (Everts et al. 2002).

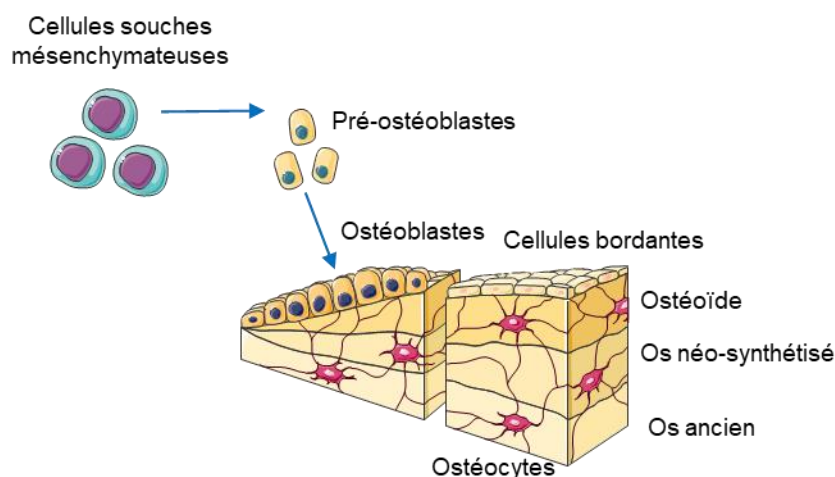


Figure 17. Différents types cellulaires de la lignée ostéoblastique. Les cellules ostéoformatrices comprennent des pré-ostéoblastes, issus de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses, d'es ostéoblastes, des ostéocytes et des cellules bordantes. D'après Servier Medical Art.

b. Les cellules d'origine hématopoïétique

Les ostéoclastes représentent les seules cellules ostéorésorbantes. Ce sont des cellules très volumineuses, de 100 μm de diamètre en moyenne, pouvant contenir jusqu'à 30 noyaux. Les ostéoclastes sont des cellules mobiles, capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Ces cellules multinucléées dérivent de précurseurs circulants appartenant à la lignée hématopoïétique monocyttaire, qui colonisent la moelle osseuse. Lors de l'initiation du remodelage osseux, les précurseurs mononucléés de la moelle osseuse sont recrutés au niveau de la surface osseuse à résorber où ils vont adhérer et fusionner par un processus appelé « multinucléation », entraînant la formation d'une cellule multinucléée, l'ostéoclaste mature (N. Takahashi et al. 2014). La différenciation des précurseurs en ostéoclastes est donc contrôlée par les facteurs solubles M-CSF et RANKL sécrétés par les ostéoblastes, ainsi que par le récepteur OPG qui inhibe l'interaction entre RANKL et son récepteur RANK présent à la surface des ostéoclastes. Les ostéoclastes présentent de nombreuses mitochondries, vacuoles et lysosomes (**Figure 18**).

Lorsqu'ils résorbent activement l'os, les ostéoclastes se caractérisent par une polarité morphologique et fonctionnelle. On distingue alors trois domaines membranaires : la bordure en brosse, le domaine basolatéral et la zone d'attachement. Au pôle apical de la cellule se trouve la bordure en brosse en regard de la matrice osseuse. Le pôle opposé, en rapport avec le

microenvironnement, contient de nombreux récepteurs, transporteurs et canaux ioniques nécessaires à la fonction des ostéoclastes. La bordure en brosse est séparée du pôle basolatéral par une zone d'attachement ou « *sealing zone* » contenant des intégrines de type $\alpha_v\beta_3$, impliquées dans l'adhérence de l'ostéoclaste à la matrice (Nakamura et al. 2007). L'ostéoclaste délimite ainsi une zone de résorption hermétique, entre la membrane plissée et l'os, dans laquelle sont déversés des protons (H^+) grâce à des pompes à protons. Cette acidité accrue permet la dissolution de la phase minérale osseuse et s'ensuit une phase de digestion de la matrice collagénique sous l'effet d'enzymes protéolytiques lysosomales comme la Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP), diverses cathépsines dont la cathépsine K et des métalloprotéases (MMP-9), libérées par exocytose. Au cours de la résorption osseuse, l'ostéoclaste se déplace le long de la surface osseuse, créant une succession de lacunes de résorption appelée lacunes de Howship, son activité alternant des phases de résorption et de migration. Les produits de dégradation sont endocytés par la partie centrale de la bordure en brosse des ostéoclastes et transportés grâce au trafic vésiculaire (transcytose) à travers la cellule et sont ensuite excrétés dans le milieu extracellulaire au niveau du pôle sécrétoire basolatéral. Les ostéoclastes se détachent ensuite de la surface résorbée suite à une augmentation du calcium dans les lacunes de résorption. Après un nombre déterminé de cycle de résorption, les ostéoclastes entrent en apoptose. Ainsi l'apoptose des ostéoclastes serait également un mécanisme de régulation de la résorption osseuse (Baron 2001).

a. La phase organique

La phase organique représente 30% de la matrice extracellulaire osseuse. Le collagène de type I est le constituant majeur de la matrice organique (90%). Cette glycoprotéine fibreuse et rigide s'associe à des protéines non collagéniques sécrétées par les ostéoblastes, ainsi qu'à des protéines plasmatiques et des facteurs de croissance.

Les protéines non collagéniques ne constituent que 10% du tissu organique de l'os et 2% du poids total de l'os. Elles peuvent se classer en trois groupes :

Les protéines non collagéniques osseuses proprement dites, quantitativement les plus importantes, qui font partie intégrante de la matrice osseuse, comme les protéoglycanes, les GAG, la fibronectine, l'ostéonectine, les thrombospondines ou les Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins (SIBLING), qui comprennent l'ostéopontine, les BSP, la MEPE, la DMP-1 et la dentin sialophosphoprotein.

Les protéines plasmatiques, synthétisées dans d'autres organes et qui s'accumulent dans l'os à partir du plasma et des liquides interstitiels ; l' α 2-HS glycoprotéine et l'albumine sont les plus abondantes de ces protéines adsorbées par l'os.

Les facteurs de croissance, dont certains ont pu être isolés dans la matrice osseuse, comme le TGF- β ou certains membres de la famille des IGF.

Les protéines non collagéniques participent non seulement à l'organisation macromoléculaire du tissu osseux mais elles interviennent également dans les mécanismes de la minéralisation – l'ostéopontine relie l'hydroxyapatite aux cellules osseuses, l'ostéonectine a une forte affinité pour le collagène de type I et le calcium – ; le chimiotactisme cellulaire – l'ostéocalcine attire les monocytes, précurseurs des ostéoclastes – ou le remodelage osseux (Thomas, Martin, et Lafage-Proust 2008).

b. La phase minérale

Cette phase représente 70% de la matrice extracellulaire osseuse. Elle est constituée majoritairement de cristaux d'hydroxyapatite [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] (phosphate de calcium cristallisé) et de carbonate de calcium. La minéralisation de la matrice nécessite des concentrations adéquates en minéraux et l'existence de sites de nucléation localisés dans des zones particulières des fibres de collagène de type I, permettant la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Ces cristaux sont formés de petites plaques hexagonales organisées en

lamelles sur lesquelles se répartissent les ions OH^- , Ca^{2+} et PO_4^{3-} . La phosphatase alcaline, enzyme localisée dans la membrane plasmique des ostéoblastes, est responsable du clivage des liaisons organophosphates qui libère le phosphate inorganique dans le milieu, participant ainsi au processus de minéralisation.

L'os est le principal réservoir de minéraux de l'organisme et contient 99% du calcium, 85% du phosphate, et entre 40 et 60% du sodium et magnésium disponible.

4.2.4. Cycle de remodelage osseux

Le remodelage osseux permet le renouvellement de la matrice osseuse. Ce remodelage est le résultat de l'activité de multiples unités cellulaires appelées « *basal multicellular unit* » (BMU), au sein desquelles agissent de manière séquentielle et couplée dans le temps et l'espace, les ostéoclastes et les ostéoblastes. Un cycle de remodelage dure en moyenne 4 à 6 mois chez l'adulte et présente différentes phases : l'activation, la résorption, l'inversion et la formation (**Figure 19**) (P. A. Hill 1998).

A l'état quiescent, la surface de la matrice osseuse est recouverte par les cellules bordantes, qui empêchent l'accès de la matrice aux ostéoclastes. Sous l'action de différents facteurs ostéorésorbants comme la PTH, la vitamine D3 et la PGE_2 , ces cellules se rétractent, c'est la phase d'activation. Les précurseurs mononucléés des ostéoclastes adhèrent alors à la matrice osseuse. Les ostéoblastes environnants favorisent la différenciation de ces précurseurs en ostéoclastes matures, via la sécrétion de M-CSF et de RANKL. Les ostéoclastes différenciés vont alors résorber l'os ancien, lors de la phase de résorption. Cette phase se déroule en deux étapes successives : la dissolution de la phase minérale par acidification puis la dégradation de la matrice organique sous l'action d'enzymes, creusant une lacune de Howship. Après résorption du minéral osseux et de la matrice organique, les ostéoclastes se détachent, meurent par apoptose et sont remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les résidus de matrice présents au fond de la lacune : c'est la phase d'inversion. La dernière phase du cycle de remodelage est la phase de formation du tissu osseux, qui a lieu en deux temps : la production d'une nouvelle matrice osseuse puis sa minéralisation. Les précurseurs des ostéoblastes présents à proximité des sites de résorption se différencient en ostéoblastes et forment la ligne cémentante au fond de la lacune de Howship. Ils vont ensuite apposer une nouvelle matrice osseuse, le tissu ostéoïde, comblant ainsi la lacune, qui pourra ensuite se minéraliser. Une fois la phase de formation terminée, les ostéoblastes entrent en apoptose ou sont emmurés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes, d'autres sont

convertis en cellules bordantes qui vont recouvrir la surface de la matrice osseuse et rester quiescentes jusqu'à un prochain cycle de remodelage osseux.

Les vaisseaux sanguins jouent un rôle primordial dans le processus de remodelage osseux (Lafage-Proust et al. 2015). Les vaisseaux apportent les précurseurs monocytaires des ostéoclastes à la surface osseuse où le remodelage a lieu et permettent ainsi un apport continu en cellules progénitrices. De plus, les précurseurs ostéoblastiques pourraient également être recrutés au niveau des cellules circulantes (Eghbali-Fatourehchi et al. 2005), différenciés à partir de péricytes (Doherty et al. 1998) ou des cellules de la canopée qui isole le site de remodelage de la moelle osseuse (Kristensen et al. 2014). Ainsi, de nombreux vaisseaux sanguins sont présents à proximité des zones de remodelage osseux (**Figure 19**).

Les BMU de l'os trabéculaire et de l'os cortical diffèrent grandement dans leurs structures et dans la manière dont se fait la résorption et la synthèse osseuse. Dans l'os trabéculaire, la BMU est située à la surface des travées et est recouverte d'une couche de cellules d'origine mésenchymateuse, appelée canopée. Des macrophages éliminent les résidus matriciels puis les précurseurs ostéoblastiques se chargent de la synthèse osseuse. Dans l'os cortical, la BMU s'organise sous forme de canal qui traverse l'os, dont le centre est occupé par un vaisseau sanguin avec des ostéoclastes présents en amont, suivis par des ostéoblastes (**Figure 20**).

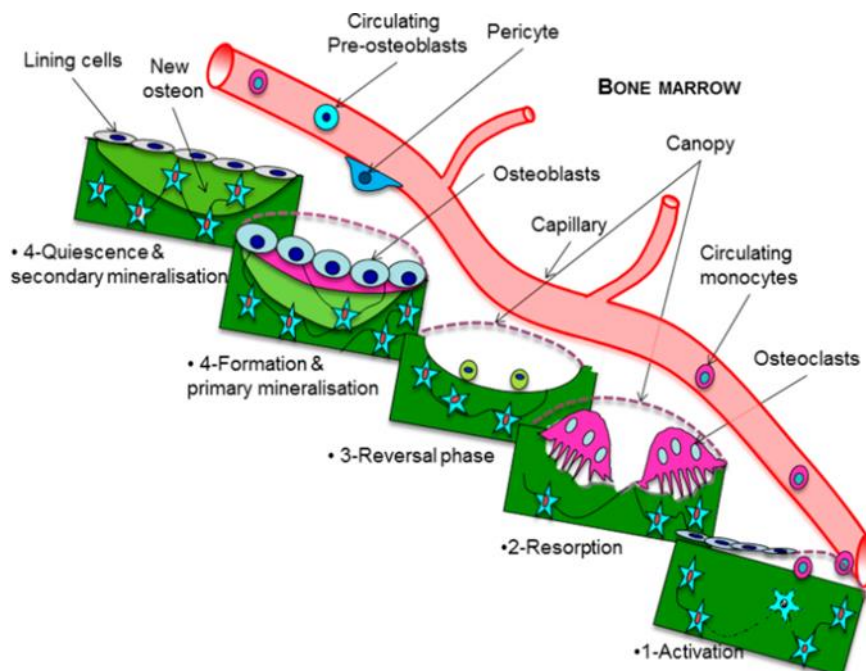


Figure 19. Illustration de la relation entre les vaisseaux sanguins et le remodelage osseux. D'après (Lafage-Proust et al. 2015)

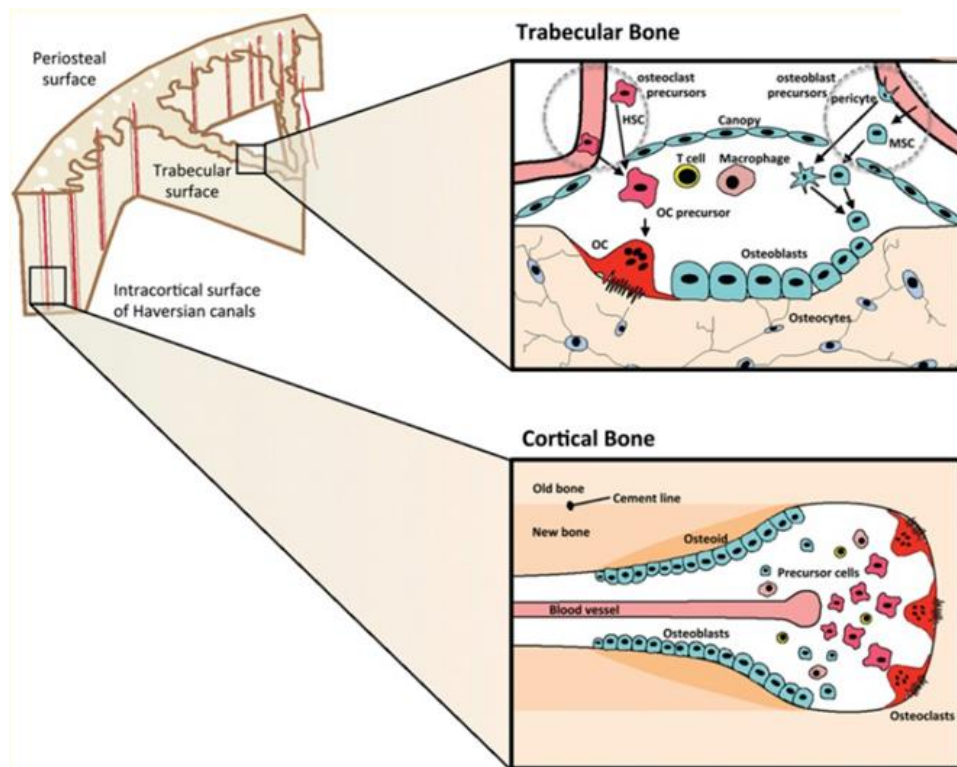


Figure 20. Illustration du remodelage de l'os trabéculaire et de l'os cortical. D'après (Sims et Martin 2014)

4.3. La membrane synoviale

4.3.1. Structure et fonction

La membrane synoviale est un tissu conjonctif lâche différencié qui tapisse la face interne de la capsule articulaire et délimite ainsi la cavité articulaire des articulations synoviales. Les insertions de la membrane synoviale et de la capsule articulaire se rejoignent sur l'os et se prolongent vers le périoste (**Figure 21**).

La membrane synoviale assure plusieurs fonctions au sein de l'articulation, notamment via la production du liquide synovial qui remplit la cavité articulaire. Le liquide synovial permet la lubrification des articulations et a également un rôle trophique vis-à-vis du cartilage où il participe grandement à sa nutrition. La membrane synoviale participe également aux propriétés mécaniques et à la stabilité de l'articulation. De plus, elle constitue une barrière de filtration et d'échange entre le sang et la cavité articulaire. Enfin elle joue un rôle de défense contre les agressions extérieures (Cantagrel et Constantin 2013).

4.3.2. Composition de la membrane synoviale

La membrane synoviale s'organise en deux couches : une couche superficielle, l'intima qui forme des replis ou franges, en regard de la cavité articulaire et au contact du liquide synovial et une couche profonde, la subintima, en contact avec la capsule articulaire.

L'intima a une épaisseur qui varie entre 20 et 40 μm . Ses cellules, les synoviocytes sont disposées en une à quatre couches. On distingue deux types de cellules, les synoviocytes de type A et de type B.

Les synoviocytes de type A ou de type macrophagique sont les plus nombreux. Ils ont une forme sphérique et disposent de prolongements cytoplasmiques dirigés vers la lumière articulaire. La densité de synoviocytes de type A en surface de l'intima varie selon la longueur des villosités synoviales et se rassemblent préférentiellement dans la région supérieure des villosités, elles sont moins fréquentes dans la zone moyenne et très rares dans la région basale des villosités (Shikichi et al. 1999). Ils ont des caractéristiques communes avec les cellules macrophagiques : les prolongements cytoplasmiques peuvent être assimilés à des lamellipodes, ils contiennent un appareil de Golgi développé, des lysosomes ainsi que de nombreuses vésicules de pinocytose, suggérant une activité macrophagique. Ces cellules sont renouvelées constamment et exercent un rôle dans l'immunité. Ils expriment les marqueurs CD68 et CD163. Ils ont pour fonction de nettoyer les débris produits par déchirure ou usure dans l'articulation et participent aux réponses immunologiques en condition pathologique.

Les synoviocytes de type B ou de type fibroblastique sont moins nombreux et ont une forme plus massive avec peu de prolongements cytoplasmiques. Ils possèdent moins d'organites que les synoviocytes macrophagiques, leur appareil de Golgi est réduit, les mitochondries, vacuoles et vésicules sont peu abondantes. Les synoviocytes de type B sont responsables de la production du liquide synovial et de la matrice extracellulaire de l'intima, riche en acide hyaluronique et en collagènes de type III, IV, V et VI (Kitamura et al. 1999; Schneider et al. 2007).

En condition physiologique, la cavité articulaire contient un volume de liquide synovial très faible (environ 2 mL dans le genou). Le liquide synovial est composé principalement d'acide hyaluronique et d'un dialysat du plasma sanguin, comprenant un nombre faible de cellules immunitaires.

La subintima est la couche située plus en profondeur, au contact de la capsule articulaire. Cette couche contient différents types de cellules, comme des fibroblastes, des cellules endothéliales, des mastocytes et des histiocytes, répartis dans toute son épaisseur (Dijkgraaf et al. 1996). La subintima est innervée et très vascularisée : on retrouve de nombreux capillaires, à proximité de l'intima, ainsi que des artérioles, veinules et des vaisseaux lymphatiques, plus profondément (Haywood et Walsh 2001).

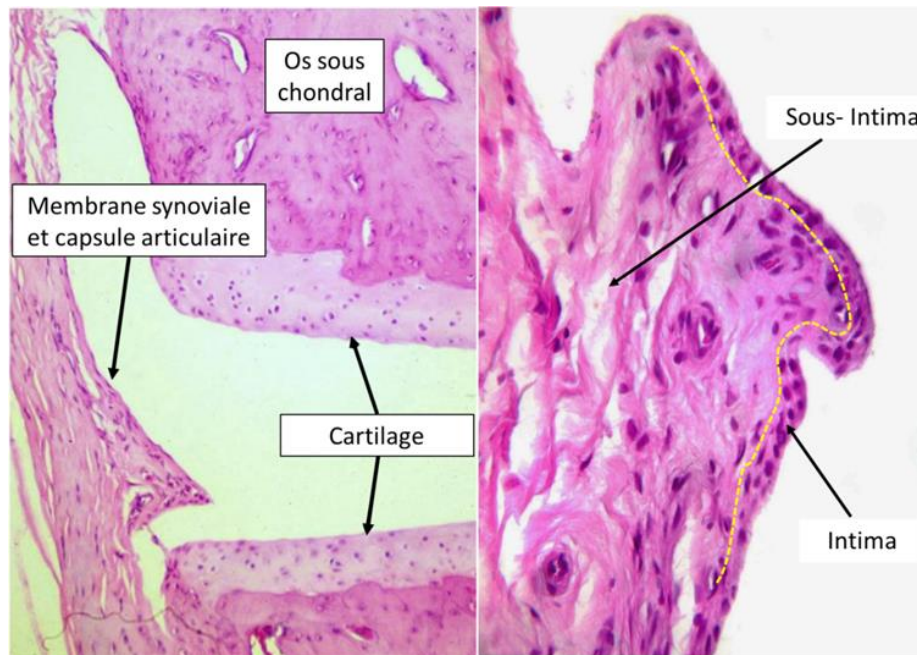


Figure 21. Coupe histologique de membrane synoviale. L'intima est constituée d'une fine couche cellulaire à la bordure de la membrane synoviale, au contact du liquide articulaire présent dans la cavité de l'articulation. Elle est composée de synoviocytes. La sous-intima, située plus en profondeur, contient des fibroblastes et est richement vascularisée.

4.4. Les autres tissus de l'articulation

4.4.1. La moelle osseuse

La moelle osseuse est contenue dans la cavité diaphysaire des os longs et dans les travées osseuses de l'os trabéculaire. La moelle osseuse est principalement composée de tissu hématopoïétique et de tissu adipeux. Elle est appelée « moelle rouge » ou hématopoïétique lorsqu'elle est principalement constituée de cellules hématopoïétiques et « moelle jaune » lorsqu'elle est essentiellement composée de tissu adipeux intra-médullaire (Hardouin, Pansini, et Cortet 2014).

La moelle rouge est quasiment omniprésente à la naissance, elle est ensuite progressivement remplacée dans le squelette appendiculaire par la moelle jaune. A l'âge adulte, la moelle hématopoïétique se limitera au squelette axial, dans les os iliaques et au niveau des épiphyses des os longs. Cependant, la moelle jaune peut se convertir en moelle rouge en cas de besoins importants en cellules sanguines (Kricun 1985). La moelle osseuse rouge est le siège de l'hématopoïèse, processus qui regroupe l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des cellules sanguines à partir de progéniteurs hématopoïétiques.

Le tissu adipeux intra-médullaire (BMAT pour Bone Marrow Adipose Tissue) est un tissu adipeux spécifique, dont l'étude fait l'objet d'un intérêt croissant. Il présenterait des caractéristiques communes avec d'autres dépôts de tissus adipeux mais semblerait avoir également des caractéristiques propres le distinguant des tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux. En effet, ce tissu adipeux se rapproche des tissus adipeux blancs, cependant certains marqueurs des tissus adipeux bruns, comme la protéine UCP-1, sont retrouvés dans certains tissus adipeux médullaires. Les adipocytes qui le composent sont plus petits que les adipocytes des tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux (Hardouin, Rharass, et Lucas 2016). Le tissu adipeux intra-médullaire présente également un phénotype métabolique et inflammatoire spécifique. Les adipocytes de ce tissu libéreraient davantage de médiateurs inflammatoires (IL-6, TNF- α) que le tissu adipeux viscéral dans les premiers temps de vie (Liu et al. 2011) ; et il présenterait un profil métabolique différents de celui du tissu adipeux sous-cutané (Griffith et al. 2009).

4.4.2. Les tissus adipeux intra-articulaires

En plus du tissu adipeux intra-médullaire, il existe au sein des articulations plusieurs dépôts de tissu adipeux, situé en dehors de la cavité articulaire mais au sein de la capsule articulaire, en regard de la membrane synoviale. Dans l'articulation du genou, on distingue les tissus adipeux supra-patellaire, infra-patellaire et postérieur. Situé sous la rotule, en arrière du tendon patellaire et en avant des condyles fémoraux et plateaux tibiaux, le tissu adipeux infra-patellaire ou tissu adipeux de Hoffa est le plus volumineux. Comme tout tissu adipeux, le tissu de Hoffa est richement innervé et vascularisé, composé d'adipocytes mais également d'une fraction stromale contenant des pré-adipocytes, fibroblastes, monocytes, macrophages et lymphocytes.

Les rôles physiologiques du tissu de Hoffa restent encore peu compris mais ce tissu semble multifonctionnel. En remplissant l'espace articulaire antérieur lors de la flexion du

genou, il jouerait un rôle d'amortisseur (Maurel et al. 2010). Le tissu de Hoffa possède également des propriétés endocrines : il est la source de nombreux médiateurs de l'inflammation (IL-6, TNF- α), de facteurs pro-angiogéniques (bFGF, VEGF) (Ushiyama et al. 2003) et d'adipokines (leptine, adiponectine, visfatine) (Labusca et Zugun-Eloae 2018). Il est également source de cellules souches mésenchymateuses (Koh et Choi 2012).

4.4.3. Les ménisques

Les ménisques sont des structures fibrocartilagineuses en forme de croissant que l'on retrouve exclusivement dans l'articulation du genou, interposées dans la portion périphérique des espaces fémoro-tibiaux. On compte deux ménisques au sein du genou, qui présentent de légères différences anatomiques. Le ménisque médial est en forme de « C » et couvre 60% de la surface articulaire du condyle médial. Le ménisque latéral est de forme plus ronde, en « O » et couvre 80% du condyle latéral. Il est également plus petit que le ménisque médial, plus uniforme et mobile (Evelinger, Dufour, et Cerioli 2018).

Lors des mouvements, les ménisques se déforment et s'adaptent à la surface articulaire afin de stabiliser l'articulation et de répartir les contraintes mécaniques que subissent le fémur et le tibia. La répartition des charges sur les ménisques est inéquitable puisque le ménisque médial supporte près de 80% du poids contre 20% pour le ménisque latéral.

Les ménisques sont composés à plus de 70% d'eau, de collagène de type I et II, de protéoglycanes et de protéines non collagéniques, comme l'élastine. Les cellules qui composent les ménisques sont des fibrochondroblastes, cellules proches des chondrocytes, à l'aspect fusiforme (Makris, Hadidi, et Athanasiou 2011).

Les ménisques sont vascularisés à partir d'un plexus capillaire périméniscal. A la naissance, ils sont entièrement vascularisés puis la vascularisation diminue au cours de la croissance. Chez l'adulte, la vascularisation résiduelle n'est plus que périphérique et ne s'étend que sur 10 à 25% de la largeur des ménisques. On distingue alors deux régions : la région externe, également appelée zone rouge, qui est vascularisée et innervée et la région interne ou zone blanche qui est dépourvu de vaisseaux sanguins et de nerfs. Les capacités de régénération des lésions étant directement liées à la vascularisation du tissu, la zone blanche avasculaire est plus sensible aux traumatismes articulaires (Makris, Hadidi, et Athanasiou 2011; Malghem et al. 2004).

4.4.4. Les ligaments et tendons

Les ligaments sont des tissus conjonctifs fibreux qui relient deux structures osseuses entre elles. Ils sont formés de fibres de collagènes regroupés en faisceaux épais qui leur confèrent des propriétés biomécaniques importantes. Ils assurent ainsi la stabilité de l'articulation et empêchent sa luxation, correspondant à une perte totale de contact des surfaces articulaires. Les ligaments sont constitués de fibroblastes, disposés de manière longitudinale, synthétisant une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et éléments fibreux (collagène de type I, élastine et réticuline). Au niveau du genou, il existe quatre principaux ligaments : les ligaments latéraux externe et interne et les ligaments centraux croisés antérieur et postérieur.

Les tendons sont des tissus conjonctifs fibreux dont la fonction est de transmettre mécaniquement les forces des muscles vers les os. Ses fibres de collagène s'assemblent en faisceaux épais et alignés dans l'axe longitudinal, afin d'améliorer la résistance du tendon à la traction. Le tendon comporte principalement une matrice extracellulaire riche en collagène de type I (95%) et III (5%), des protéoglycanes et des glycoprotéines, au sein de laquelle se situent les ténoblastes et les ténocytes. D'autres types cellulaires sont également présents en plus faible proportion (5-10%), puisque l'on retrouve des chondrocytes au niveau des zones d'insertion, des cellules synoviales et endothéliales (Kaux et Crielaard 2014).

PARTIE II - L'ARTHROSE

1. Aspects épidémiologiques et cliniques de l'arthrose

1.1. Epidémiologie et définition

L'arthrose est la pathologie musculosquelettique la plus répandue puisqu'elle touche plus de 300 millions de personnes dans le monde (GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators 2018) et serait actuellement la quatrième cause d'invalidité. En France, 10 millions de personnes sont concernées par ce type de rhumatisme, soit près de 17% de la population, dont la moitié serait symptomatique. Selon l'Inserm, l'arthrose concerne 65% des personnes âgées de plus de 65 ans et 80% des plus de 80 ans. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), entre 10 et 15% des personnes de plus de 60 ans dans le monde aurait une arthrose, avec une prévalence 2 fois plus importante pour les femmes que pour les hommes. En effet, 9,6% des hommes et 18% des femmes âgés de plus de 60 ans souffrent d'arthrose symptomatique (OMS).

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

Ainsi, longtemps perçue comme étant uniquement la conséquence d'une usure du cartilage due au vieillissement, l'arthrose est maintenant considérée comme une pathologie multi-tissulaire complexe, affectant tous les tissus de l'articulation : le cartilage, l'os sous-chondral et la membrane synoviale, mais également les ligaments, tendons et muscles (Rannou, Sellam, et Berenbaum 2010).

Les altérations pathologiques se développent sous l'action de facteurs biochimiques, métaboliques et/ou mécaniques qui engendrent la dégradation de l'articulation.

1.2. Prévalence

L'arthrose peut affecter toutes les articulations, aussi bien portantes comme le genou (gonarthrose), la hanche (coxarthrose), le rachis cervical et lombaire (arthrose vertébrale) que non portantes comme les articulations interphalangiennes (arthrose digitale). Certaines articulations comme l'épaule, la cheville, le coude ou le poignet sont néanmoins plus rarement atteintes.

La prévalence de la maladie varie en fonction de sa localisation. L'arthrose vertébrale est la plus fréquente, 75% des personnes âgées entre 65 et 75 ans ont une atteinte cervicale et 70% une atteinte lombaire, mais elle reste le plus souvent silencieuse. L'arthrose digitale est la deuxième localisation la plus fréquente (60%) et se traduit par des déformations irréversibles douloureuses, notamment lors de poussées arthrosiques. Elle touche préférentiellement les femmes puisque 70% des femmes âgées de 70 ans souffrent de cette atteinte, contre 50% des hommes du même âge (N. Arden et Nevitt 2006). La gonarthrose et la coxarthrose concernent respectivement 30% et 10% des personnes âgées entre 65 et 75 ans, mais représentent les formes les plus invalidantes (**Figure 22**).



Figure 22. Radiographie d'une articulation du genou arthrosique. (A) Articulatio saine. (B) Arthrose avancée, présentant une réduction de l'interligne, une sclérose de l'os sous-chondral et la formation d'ostéophytes. (C) Arthrose sévère avec un glissement des surfaces articulaires conduisant à un mauvais alignement des membres.

1.3. Diagnostic

Le diagnostic de l'arthrose se fait par des examens clinique et radiologique de l'articulation. La douleur est l'un des symptômes les plus importants chez les sujets atteints d'arthrose. Elle se manifeste principalement lors de la mise en mouvement de l'articulation touchée et s'atténue ou disparaît lors de sa mise en repos. L'arthrose peut également engendrer des raideurs, notamment matinales, qui s'estompent rapidement.

La classification de Kellgren-Lawrence permet d'évaluer l'arthrose radiologique (**Figure 23**). Cette échelle, comprise entre 0 et 4, détermine la sévérité de l'atteinte, en prenant en compte des paramètres radiologiques tels que l'apparition d'un pincement de l'interligne articulaire, reflétant l'amincissement du cartilage et augmentant ainsi la proximité entre les extrémités osseuses ; la présence d'ostéophytes, excroissances osseuses qui peuvent apparaître en marge de l'articulation et la condensation de l'os sous-chondral avec apparition de kystes, témoins d'un remodelage osseux pathologique.

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

Figure 23. Classification de Kellgren-Lawrence. Cette classification permet d'évaluer radiologiquement le stade de développement de la gonarthrose.

Il existe cependant une discordance entre les atteintes radiologiques et les symptômes cliniques rendant la prise en charge tardive des patients. En effet, une étude comparant trois indicateurs d'arthrose du genou (observation radiologique, douleur au genou et diagnostic par un médecin) a montré que seulement 47% des gonarthroses radiologiques modérées à sévères étaient symptomatiques et que 61% avaient fait l'objet un diagnostic par un médecin. De plus, seulement 15% des personnes ayant des douleurs au genou présentaient une gonarthrose radiologique (Hannan, Felson, et Pincus 2000).

1.4. Traitements

La prise en charge de l'arthrose englobe plusieurs mesures pharmacologiques et non pharmacologiques, qui visent à améliorer la qualité de vie des patients et à diminuer le handicap physique causé par la douleur et la perte de fonction des articulations. Ces mesures ne permettent toutefois pas de guérir de cette pathologie, puisqu'il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de l'arthrose.

Les mesures non pharmacologiques incluent principalement des règles hygiéno-diététiques qui préviendront ou limiteront certains facteurs de risque liés à l'arthrose. La pratique d'une activité physique associée à une bonne hygiène alimentaire préserve la mobilité des articulations, renforce les structures musculaires et tendineuses qui la maintiennent, régule l'homéostasie du cartilage et limite la prise de poids. Ces mesures peuvent être complétées par des orthèses, dispositifs médicaux visant à soutenir, stabiliser ou immobiliser l'articulation.

Lorsque ces mesures ne sont pas suffisantes, une approche pharmacologique, adaptée à chaque patient, est proposée. Le paracétamol est largement recommandé comme antalgique de première intention, bien que son efficacité soit discutée (Leopoldino et al. 2019; Miceli-Richard et al. 2004). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) administrés par voie orale sont utilisés en cas de poussée inflammatoire, à faible dose et le plus brièvement possible pour éviter les désordres cardiovasculaires, rénaux et digestifs. Les injections intra-articulaires de corticoïdes, comme la cortisone, sont utiles pour traiter localement l'inflammation et réduire les effets systémiques, avec cependant une durée d'action très variable. Les injections d'acide hyaluronique lubrifient l'articulation et restaurent la viscoélasticité du liquide synovial, de manière temporaire (Bannuru et al. 2019; Sellam et al. 2020).

Lorsque ces différentes approches ne suffisent plus à soulager le patient et en cas de handicap sévère, une prise en charge chirurgicale avec la pose d'une prothèse est proposée. L'articulation arthrosique, principalement le genou ou la hanche, est remplacée (de manière partielle ou totale) par une articulation artificielle, améliorant nettement la qualité de vie du patient. Son efficacité est cependant limitée à une quinzaine d'années et parfois relative puisque 20% des patients conservent des douleurs chroniques suite à une pose de prothèse totale du genou (Beswick et al. 2012). Chaque année, 150 000 prothèses de hanche et 80 000 prothèses de genou sont posées en France selon la Haute Autorité de Santé.

1.5. Facteurs de risque

L'arthrose est une pathologie complexe et hétérogène qui possède de nombreuses composantes, déterminées à la fois par les caractéristiques propres de chaque patient et par les causes des lésions articulaires. Il n'existe donc pas une arthrose mais différents phénotypes d'arthrose qui présentent différents mécanismes physiopathologiques. L'implication de chaque tissu (cartilage, os sous-chondral, membrane synoviale) est variable en fonction des patients et entraîne des manifestations différentes de la pathologie. La compréhension des mécanismes physiopathologiques intervenant au cours de ces différents phénotypes d'arthrose est nécessaire afin de développer des thérapeutiques adaptées à la pathologie.

Les facteurs prédisposant au développement de l'arthrose sont multiples, certains sont intrinsèques à chaque individu et ne peuvent être modifiés, d'autres peuvent être modulés afin de réduire leur impact.

1.5.1. Les facteurs de risques non modifiables

a. Le vieillissement

Le vieillissement est le principal facteur de risque d'arthrose, toute articulation confondue. Si seulement 3% des personnes âgées de moins de 45 ans ont des signes d'arthrose, ce pourcentage atteint 65% pour les plus de 65 ans et 80% pour les plus de 80 ans.

Le vieillissement induit au sein des tissus de l'articulation des modifications cellulaires et biochimiques contribuant à son remodelage pathologique. Dans le cartilage, celles-ci sont à l'origine de l'acquisition d'un profil chondrocytaire sénescents ou SASP (Senescence-associated secretory phenotype), caractérisé par un profil sécrétoire pro-inflammatoire et pro-catabolique (Jeon et al. 2018). Le cartilage sénescents est caractérisé par une diminution de la réponse des chondrocytes aux facteurs de croissance comme l'insulin-like growth factor (IGF-I) ralentissant la production de composants matriciels (R. F. Loeser et al. 2000), une altération de la qualité des protéoglycanes de la matrice extracellulaire, une diminution de la teneur en eau du cartilage et un avancement de la tidemark vers la surface du cartilage induisant ainsi un amincissement du cartilage non calcifié (David T. Felson et Zhang 1998). De plus, l'élimination des chondrocytes sénescents issus de tissus de patients arthrosiques diminue l'expression de marqueurs inflammatoire et de sénescence et prévient le développement de la pathologie dans un modèle murin (Jeon et al. 2017).

La formation et l'accumulation de produits de glycation avancés (Advanced glycation end products) ou « AGE » fragilisent le cartilage en modifiant ses propriétés biomécaniques, notamment en activant un phénotype pro-catabolique et pro-inflammatoire des chondrocytes et en altérant la structure du collagène de la matrice (Richard F. Loeser et al. 2012b; Verzijl et al. 2002). Les AGE ont également un effet délétère sur la membrane synoviale en induisant un profil pro-dégradatif des synoviocytes fibroblastiques (Steenvoorden et al. 2006). Le processus de vieillissement cellulaire affecte également les cellules osseuses comme les ostéocytes puisqu'il engendre des modifications de la densité, morphologie et structure des lacunes ostéocytaires, ces changements réduisant la capacité de l'os à répondre au stress mécanique (Busse et al. 2010; Richard F. Loeser et al. 2012b).

Le vieillissement induit également des altérations des tissus avoisinants comme une augmentation de la laxité des ligaments périarticulaires, une faiblesse musculaire ainsi qu'une diminution de la proprioception, rendant les articulations moins stables et plus sujettes aux fractures (David T. Felson et Zhang 1998; Litwic et al. 2013).

b. Le genre

Il existe une différence dans la prévalence de l'arthrose entre les hommes et les femmes. Avant l'âge de 50 ans, la prévalence de la maladie semble plus importante chez les hommes que chez les femmes, puis elle s'inverse pour devenir plus forte chez les femmes ménopausées et augmente avec l'âge (van Saase et al. 1989). Les femmes sont davantage touchées par l'arthrose digitale des mains et des pieds, et du genou, avec une sévérité de la gonarthrose radiographique plus importante que chez les hommes (Srikanth et al. 2005). Les hormones sexuelles féminines comme l'œstrogène joueraient un rôle protecteur et la carence hormonale suite à la ménopause serait un facteur prédisposant au développement de l'arthrose. Les récepteurs aux œstrogènes sont présents dans les différents tissus de l'articulation (cartilage, os sous-chondral, membrane synoviale, muscles et ligaments) et notamment au niveau des chondrocytes où ils engendrent suite à leur activation une augmentation de la production de protéoglycanes, une diminution intracellulaire de médiateurs inflammatoires comme NF- κ B, iNOS, COX-2 et les ROS et où ils régulent le calcium intracellulaire (Roman-Blas et al. 2009). Néanmoins, l'efficacité d'un traitement hormonal substitutif reste controversée (Cirillo et al. 2006; Nevitt et al. 2001).

D'autres facteurs pourraient expliquer la prédisposition des femmes à développer de l'arthrose, comme la différence de structure osseuse, l'alignement des membres, la laxité des

ligaments ainsi que la diminution du volume de cartilage articulaire par rapport aux hommes (Johnson et Hunter 2014).

c. Les facteurs génétiques, épigénétiques et ethniques

Des facteurs génétiques sont également impliqués dans l'apparition et l'évolution de l'arthrose. L'hérédité serait ainsi impliquée dans 39% des gonarthroses radiologiques (Spector et al. 1996) et 60% des coxarthroses radiologiques (MacGregor et al. 2000) chez les femmes (Valdes et Spector 2009), indépendamment des facteurs environnementaux connus. Ryder et al. ont ainsi répertorié plus de 80 mutations de gènes ayant un rôle dans la physiopathologie de l'arthrose (Ryder et al. 2008). La plupart de ces mutations affectent des gènes liés au métabolisme et à l'homéostasie des tissus de l'articulation (Musumeci et al. 2015). Ainsi, des altérations du gène codant pour la MGP (Matrix Gla Protein) augmentent le risque de développer une arthrose digitale (den Hollander et al. 2017) et celles sur le gène codant pour la COMP augmentent le risque de coxarthroses (Styrkarsdottir et al. 2017). D'autres mutations, sur les gènes codant le collagène de type II (Col2a1), le collagène de type IX (Col9a1, a2 et a3) et l'ostéoprotégérine (Tnfrsf11b), semble être impliquées dans des formes précoces d'arthroses (Aury-Landas et al. 2016). Des différences épigénétiques ont été observées au niveau des chondrocytes de personnes saines et arthrosiques. Les gènes codant le TNF- α , le connective tissue growth factor et la chimiokine CX3CL1, présentent des hypométhylations au niveau des chondrocytes articulaires de patients arthrosiques (Zhao et al. 2017) et les déméthylations des gènes MMP-13 et IL-1 β conduisent à leur surexpression dans le cartilage arthrosique (K. Hashimoto et al. 2013).

Les études s'intéressant à l'origine ethnique des patients arthrosiques ont montré que la population afro-américaine développe moins d'arthrose digitale que la population caucasienne, mais présente un risque deux fois plus grand de développer une gonarthrose (Nelson et al. 2011). Des différences d'alignement des genoux expliqueraient également la forte prévalence de l'arthrose tibio-fémorale latérale chez la population chinoise, comparée à la population caucasienne (Harvey et al. 2008). Ainsi, le mauvais alignement des membres inférieurs, comme lors de la dysplasie des hanches, du varus ou du valgus, peut mener à une arthrose précoce. La répartition des charges modifiée entraîne des forces de compression plus importantes sur certaines zones de l'articulation, compartiment médial ou latéral, causant près de 4 fois plus d'arthrose chez les individus présentant un varus et 5 fois plus chez ceux présentant un valgus (Sharma et al. 2010).

1.5.2. Les facteurs de risques modifiables

a. Surpoids, obésité et syndrome métabolique

A l'échelle mondiale, la prévalence de l'obésité a presque triplé depuis 1975, faisant de l'obésité un problème de santé publique majeur (OMS). Plusieurs études ont montré le lien entre la surcharge pondérale et l'arthrose. L'étude de la cohorte Rotterdam a montré que les individus ayant un indice de masse corporelle (IMC) ≥ 27 kg/m², présentaient un risque multiplié par 3,3 de développer une gonarthrose (Reijman et al. 2007). Ce risque est augmenté de 15% par point d'IMC supplémentaire (Sellam et Berenbaum 2011). Une autre étude a effectué un suivi de 1854 personnes entre 1994 et 2004 et a répertorié une augmentation de l'incidence de la gonarthrose mais pas de la coxarthrose chez les individus ayant un IMC ≥ 30 kg/m² (Grotle et al. 2008). Enfin, une étude de cohorte suédoise ayant inclus 27960 participants, répartis en 4 groupes selon leur IMC, a montré que les individus présentant l'IMC le plus élevé (30,1 kg/m² en moyenne) étaient 8 fois plus susceptibles de développer une gonarthrose sévère, par rapport au groupe présentant l'IMC le plus faible (Lohmander et al. 2009). Dans le cas de l'arthrose digitale, le surpoids et l'obésité augmentent le risque d'arthrose radiologique des mains d'environ 20% (L. Jiang et al. 2016; Yusuf et al. 2010). Les facteurs mécaniques liés à la charge pondérale n'expliquent pas les atteintes observées au niveau des articulations non portantes interphalangiennes. Ainsi, l'association entre obésité et troubles métaboliques intégrés au syndrome métabolique rend compte d'une étiologie plus complexe de l'arthrose. Le profil sécrétoire du tissu adipeux participe à une inflammation de bas grade qui soutient le développement de l'arthrose. Les acides gras libres comme l'acide palmitique s'accumulent dans les tissus articulaires et exercent un effet pro-inflammatoires et pro-cataboliques (S. Kim et al. 2017). Certaines adipokines, comme la leptine et l'adiponectine sont également produites par les tissus articulaires et ont démontré des effets pro-inflammatoires et pro-cataboliques sur les chondrocytes et la membrane synoviale (Gómez et al. 2011). La visfatine a également été impliquée dans l'inflammation de l'articulation arthrosique. Cette adipokine est produite par tous les tissus de l'articulation, notamment par la membrane synoviale (Laiguillon et al. 2014). L'hyperglycémie et l'insulino-résistance liés au diabète de type II sont associés à la prévalence de l'arthrose. L'accumulation excessive d'AGE et l'augmentation du stress oxydant participent à la dégradation des tissus articulaires (Oren et al. 2011; Vaamonde-Garcia et al. 2017). La dysbiose du microbiote intestinal observée dans l'obésité et le syndrome métabolique pourraient également jouer un rôle dans l'arthrose, en modifiant les taux d'endotoxines et de cytokines dans le sang, accélérant la dégradation du cartilage, l'hypertrophie des chondrocytes

et la formation d'ostéophytes (Schott et al. 2018). L'hypertension artérielle, une comorbidité fréquente chez les patients présentant une gonarthrose, constitue également un facteur de risque important dans la progression de l'arthrose (Ching et al. 2021).

b. Les traumatismes articulaires

Les antécédents traumatiques au niveau des articulations augmentent le risque d'apparition de l'arthrose. La pratique d'activités sportives intenses ou répétitives a été identifiée comme potentiel facteur prédisposant à la survenue d'une arthrose post-traumatique (G. Jones et al. 2003; Showery et al. 2016). Ainsi, les traumatismes articulaires multiplient par 5 le risque de développer une coxarthrose et par 4 celui d'une gonarthrose (Richmond et al. 2013). Les blessures articulaires, comme la rupture des ligaments croisés antérieurs qui s'accompagne souvent de lésions du cartilage, de l'os sous-chondral, des ligaments collatéraux et du ménisque, conduisent à une arthrose précoce dans les 10 ans suivant la lésion (Slauterbeck et al. 2009).

2. Physiopathologie de l'arthrose

L'arthrose est une pathologie complexe, qui affecte tous les tissus de l'articulation. Elle se caractérise principalement par une dégradation du cartilage, un remodelage de l'os sous-chondral et une inflammation de la membrane synoviale (**Figure 24**). Les interactions fonctionnelles entre les différents tissus de l'articulation sont très développées ce qui résulte en une déstructuration de toute l'articulation si un des tissus est lésé.

2.1. Modifications du cartilage articulaire

2.1.1. Modifications histologiques

Un stress excessif sur le cartilage, qu'il soit d'origine mécanique ou biochimique, altère les fonctions des chondrocytes articulaires et les active de façon anormale. Ainsi cette activation chondrocytaire entraîne la perte de l'homéostasie du cartilage, soit un déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme en faveur à une dégradation de la matrice extracellulaire, sous l'effet de protéases (MMP et ADAMTS).

Le cartilage arthrosique perd son aspect blanc, lisse et translucide. Aux stades précoces de la maladie, il devient rugueux et des microfissures apparaissent au niveau de sa couche superficielle. Progressivement, les lésions s'agrandissent et le cartilage s'érode, laissant apparaître l'os sous-chondral à des stades tardifs de la maladie (Aigner et al. 2006; Chevalier 1998). Ainsi, le cartilage arthrosique perd de son épaisseur, due à une érosion du cartilage à sa surface et d'un avancement du front de minéralisation en profondeur, conduisant à l'amincissement du cartilage jusqu'à sa disparition (**Figure 24**).

A



B

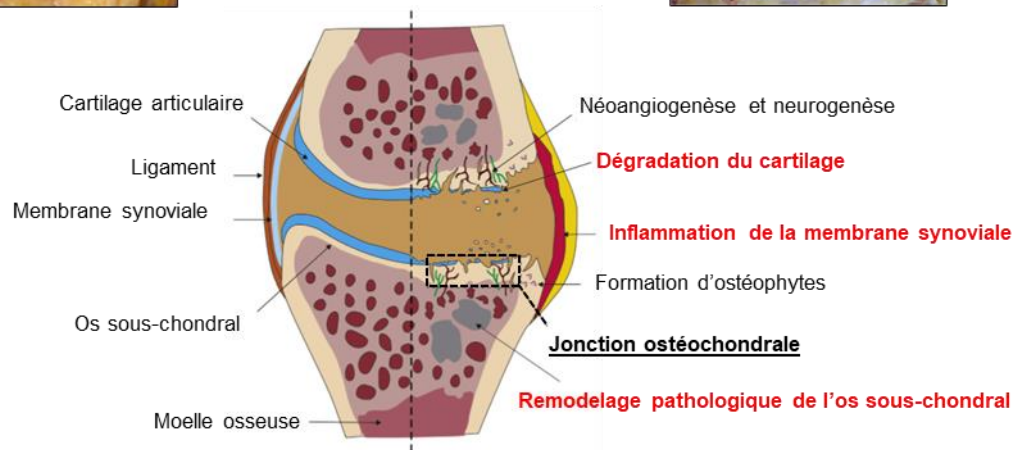


Figure 24. Atteintes des différents tissus de l'articulation arthrosique. (A) Aspect macroscopique du cartilage articulaire des condyles fémoraux du genou à un stade précoce (gauche) et très avancé (droite). D'après (Aigner et al. 2006) (B) Illustration des modifications tissulaires liées à l'arthrose. L'arthrose caractérise principalement par une dégradation du cartilage articulaire, une inflammation de la membrane synoviale et un remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale. D'après (X. L. Yuan et al. 2014)

En condition physiologique, les chondrocytes sont des cellules quiescentes qui se divisent peu. Suite à leur activation, ils vont initier un changement phénotype pro-catabolique. Ils vont alors proliférer, ce qui donne lieu à l'apparition de plusieurs amas cellulaires appelés « clusters » (Chevalier 1998). Ces chondrocytes entreront ensuite en apoptose, laissant des espaces vides au sein de la couche moyenne du cartilage. En profondeur, on observe un avancement du cartilage calcifié, visible par la duplication de la tidemark, vers la surface articulaire. Parallèlement, des structures vasculaires et nerveuses apparaissent à la jonction

ostéocondrale, en provenance de l'os sous-chondral. Des fissures sont également visibles entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral. Ces différentes modifications macroscopiques sont visibles en histologie et peuvent être évaluées grâce à un score semi-quantitatif établi par Mankin *et al.* qui permet d'établir une échelle de sévérité des atteintes du cartilage humain (**Figure 25**) (Mankin et al. 1971).

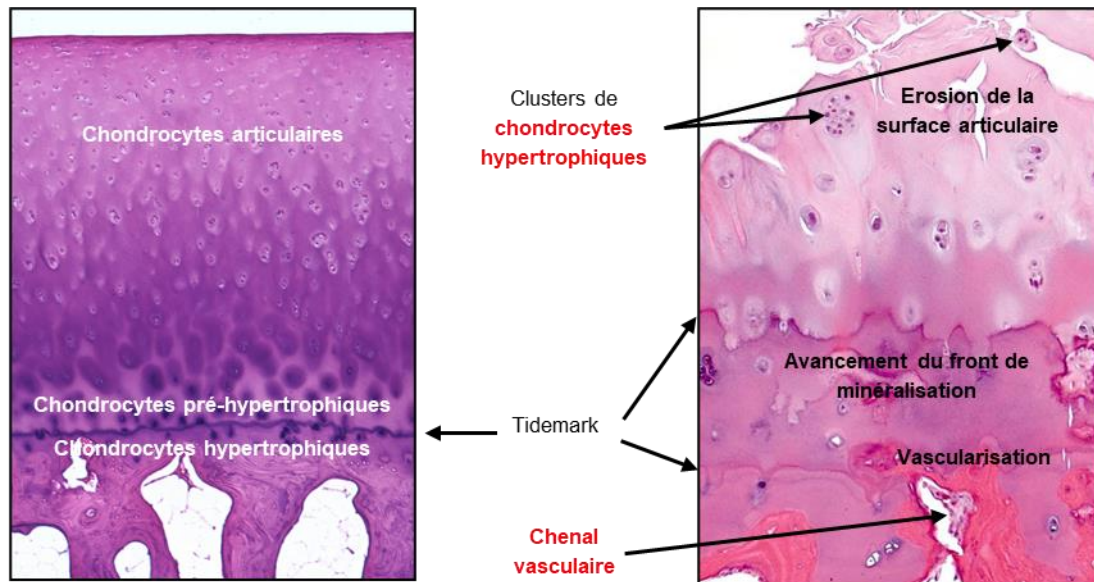


Figure 25. Coupes histologiques d'un cartilage sain et arthrosique après coloration à la Safranine-O. Le cartilage sain (droite) est organisé en différentes couches successives caractérisées par un phénotype de chondrocytes (chondrocytes articulaires, pré-hypertrophiques et hypertrophiques). L'organisation stratifiée du cartilage est totalement perturbée au cours de l'arthrose. Les chondrocytes prolifèrent, se regroupent en clusters de chondrocytes hypertrophiques. Des fissures et une érosion de la surface articulaire sont présentes ainsi qu'un avancement de la tidemark, preuve de la minéralisation du cartilage. Une vascularisation du cartilage, normalement avasculaire est également observée. D'après (Richard F. Loeser et al. 2012b)

2.1.2. Modifications cellulaires et matricielles

Lors de l'initiation des processus arthrosiques, un stress mécanique ou biochimique sera responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire. En réponse aux facteurs inflammatoires, les chondrocytes prolifèrent et forment des clusters. Les chondrocytes des clusters du cartilage arthrosique expriment des marqueurs de l'hypertrophie, comme le collagène de type X (von der Mark et al. 1992), la phosphatase alcaline (Kirsch, Swoboda, et Nah 2000), l'ostéocalcine (Pullig, Weseloh, Ronneberger, et al. 2000), la MMP-13 (Billinghurst et al. 1997) et Runx2 (Orfanidou et al. 2009), ainsi que des marqueurs de la sénescence comme p16, p53 et p21 (R. F. Loeser 2009). Ils acquièrent un phénotype pro-catabolique et produisent des protéases de la famille des MMP et des ADAMTS. Les chondrocytes expriment les MMP-

1, 3, 8, 9 et 13. La MMP-13 est une protéase de type collagénase qui joue un rôle majeur dans la dégradation des fibres de collagène de type II (M. Wang et al. 2013). Son expression est activée notamment par l'IL-1 β et le TNF- α , dont les concentrations augmentent au cours de l'arthrose (Vincenti et Brinckerhoff 2002). La MMP-3 est la protéase la plus exprimée par le cartilage aux stades précoces d'arthrose et clive les protéoglycanes de type agrécanes (Bau et al. 2002). Les ADAMTS-4 et 5 sont également fortement exprimées et dégradent l'agrécane (Little et al. 2007; Sandy et Verscharen 2001). De plus, les concentrations d'inhibiteurs de protéases matricielles, les TIMP, et plus particulièrement TIMP-3, diminuent dans le cartilage arthrosique ce qui contribue à la dégradation du cartilage (Morris, Cs-Szabo, et Cole 2010).

Afin de compenser ce déséquilibre de la balance homéostasique, des processus d'anabolisme vont se mettre en place pour réparer le tissu. Cependant, la tentative de réparation du cartilage endommagé conduit à la formation d'une matrice de moins bonne qualité, composée de protéines matricielles différentes de celles produites par les chondrocytes d'un cartilage sain. Certains chondrocytes arthrosiques peuvent subir une dédifférenciation et retrouver certaines caractéristiques des stades précoces du développement. Ils expriment ainsi la forme fœtale du collagène de type II, le collagène de type IIA, le collagène de type I et III (Sandell et Aigner 2001).

Ainsi, cette tentative de réparation ne sera pas suffisante pour restaurer la matrice initiale du cartilage et les processus inflammatoires et pro-cataboliques vont progressivement dépasser les processus anaboliques. Parallèlement, les modifications de la matrice diminuent les capacités de résistance du cartilage aux contraintes mécaniques, pouvant conduire à la nécrose des chondrocytes restants (Aigner et Kim 2002).

Les débris cartilagineux issus de la protéolyse de la matrice du cartilage alors présents dans la cavité articulaire peuvent activer les autres types cellulaires de l'articulation, notamment les synoviocytes et macrophages de la membrane synoviale et jouer le rôle de signaux d'alarmes en se fixant sur les Toll-like Récepteur (TLR) (Marion Millerand, Berenbaum, et Jacques 2019; Sellam et Berenbaum 2010). Ainsi, l'activation des cellules de la membrane synoviale engendre une réponse à l'origine des modifications de la membrane synoviale. Les synoviocytes et macrophages de la membrane synoviale participent également à la dégradation du cartilage articulaire. Ils synthétisent des facteurs pro-inflammatoires, comme du PGE₂, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) et des radicaux libres (NO, dérivés de l'oxygène ROS), ainsi que des facteurs pro-cataboliques, comme les MMP-2, 9 et 13 et des ADAMTS, responsables de la protéolyse de la matrice, aggravant le phénotype catabolique des

chondrocytes et participent ainsi à un cercle vicieux d'amplification du processus dégradatif (Gosset et al. 2008).

Au niveau de la couche profonde du cartilage articulaire, les chondrocytes pré-hypertrophiques se différencient vers un phénotype hypertrophique, responsable de la synthèse d'une matrice extracellulaire calcifiée.

2.1.3. Mise en évidence de la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le cartilage arthrosique

A l'instar des mécanismes de réparation tissulaire, comme ceux observés suite aux fractures osseuses, faisant intervenir des processus de chondrogenèse et d'ossification, le cartilage arthrosique est également le siège d'une réactivation de l'ossification endochondrale (Zuscik et al. 2008). Cette réactivation se caractérise par une récapitulation des différents événements ayant lieu au cours de l'ossification endochondrale, soit le remodelage de la matrice extracellulaire du cartilage par des protéases, la différenciation hypertrophique des chondrocytes, l'invasion vasculaire à la jonction ostéochondrale, la minéralisation du cartilage avec un avancement et la duplication de la tidemark et la formation de tissu osseux.

Les mécanismes précis de la physiopathologie de l'arthrose ne sont pas encore élucidés. L'étiologie très diverse de l'arthrose suggère qu'il existerait plusieurs mécanismes menant à la destruction du cartilage et à sa perte de fonction. La différenciation hypertrophique des chondrocytes constituerait un de ces mécanismes en jouant un rôle dans l'initiation et la progression de la dégradation du cartilage, comme c'est le cas dans la plaque de croissance au cours de l'ossification endochondrale (Dreier 2010a; P. M. van der Kraan et van den Berg 2012).

a. Calcification du cartilage articulaire

La calcification du cartilage articulaire puis son ossification est la résultante de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Passé l'âge de 60 ans, le nombre de tidemark augmente dans le cartilage humain, indiquant une calcification du cartilage articulaire (D. B. Burr et Schaffler 1997; Lane et Bullough 1980). L'épaisseur du cartilage calcifié n'augmente pas pour autant, il devient même plus fin avec l'âge, en cause le remplacement du cartilage calcifié par du tissu osseux par le processus d'ossification endochondrale.

Fuerst *et al.* (M. Fuerst et al. 2009) ont montré la présence de calcifications dans ses 120 échantillons de cartilages arthrosiques humains, avec une corrélation positive de la calcification de la matrice du cartilage et de la sévérité des lésions arthrosiques. De plus, les chondrocytes arthrosiques présentent une forte corrélation entre leur capacité à produire du phosphate de calcium *in vitro* et l'étendue des zones minéralisées observées dans le cartilage arthrosique des donneurs (M. Fuerst et al. 2009; Martin Fuerst et al. 2010). Cependant, d'autres études ont conclu que la calcification du cartilage arthrosique était plutôt liée à l'âge des patients plutôt qu'à l'arthrose elle-même (Mitsuyama et al. 2007). Cette conclusion est basée sur l'observation qu'aucune augmentation du niveau de calcification du cartilage est observée entre les stades modérés et sévères d'arthrose. Ainsi, la calcification du cartilage serait un phénomène précoce dans la physiopathologie de l'arthrose et n'évoluerait pas davantage dans les stades tardifs de la maladie. L'âge constitue le principal facteur de risque de l'arthrose et n'exclut pas des mécanismes sous-jacents qui associeraient calcifications et lésions du cartilage.

b. Marqueurs de l'hypertrophie dans le cartilage arthrosique humain

Au cours de l'arthrose, les chondrocytes articulaires enclenchent une différenciation hypertrophique comme c'est le cas au cours de l'ossification endochondrale au niveau de la plaque de croissance (Dreier 2010a). Le collagène de type X et la MMP-13 sont les marqueurs de l'hypertrophie les plus utilisés pour identifier les chondrocytes hypertrophiques.

Le collagène de type X est détecté dans le cartilage humain arthrosique, au niveau des clusters de chondrocytes hypertrophiques. Le gène *Col10a1*, codant le collagène de type X, n'est pas exprimé dans le cartilage articulaire sain et son expression (ARNm et protéines) est augmentée dans le cartilage arthrosique (Hoyland et al. 1991; von der Mark et al. 1992), notamment à proximité des lésions (Tchetina, Squires, et Poole 2005). Cependant des disparités dans sa localisation ont été observées, avec une expression de COL10A1 plus importante dans les zones moins dégradées (Fukui, Ikeda, et al. 2008; Fukui, Miyamoto, et al. 2008) et certains auteurs ne décèlent pas d'augmentation de COL10A1 dans le cartilage arthrosique (Brew et al. 2010), ce qui pourrait confirmer que le changement phénotypique des chondrocytes vers l'hypertrophie ne représente qu'un des mécanismes de la pathologie.

La MMP-13 ou collagénase-3 voit son expression augmenter par 40, entre un cartilage sain et un cartilage arthrosique. Certains auteurs ont montré que bien qu'il n'y ait pas d'augmentation d'expression de COL10A1, l'expression de MMP-13 était accrue dans le cartilage arthrosique (Aigner et al. 2001; Brew et al. 2010), ce qui semble indiquer que

l'expression du collagène de type X et de la MMP-13 sont découplées et que l'expression de la MMP-13 pourrait être due à d'autres mécanismes que l'hypertrophie chondrocytaire.

L'expression d'autres gènes augmente dans le cartilage arthrosique, par rapport à un cartilage sain, comme l'ostéopontine (Pullig, Weseloh, Gauer, et al. 2000), l'ostéocalcine (Pullig, Weseloh, Ronneberger, et al. 2000), Indian Hedgehog (Tchetina, Squires, et Poole 2005), Runx2 (Orfanidou et al. 2009), VEGFA (Pfander, Kortje, et al. 2001), β -caténine (Zhu et al. 2009), l'alcaline phosphatase (Goyal et al. 2010).

Les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance subissent également une apoptose, préalable au dépôt de tissu osseux. L'apoptose des chondrocytes pourrait ainsi être considérée comme un marqueur de l'hypertrophie dans le cartilage arthrosique. En effet, les chondrocytes arthrosiques humains présentent un fort marquage TUNEL et expriment des marqueurs de l'apoptose comme l'annexine II et V (Kirsch, Swoboda, et Nah 2000), la caspase-3 (Sharif et al. 2004), BCL-2 et FAS (H. A. Kim et al. 2000). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de caspases réduit considérablement la sévérité des lésions du cartilage dans des modèles expérimentaux d'arthrose (D'Lima et al. 2006).

c. Marqueurs de l'hypertrophie dans des modèles animaux d'arthrose

La présence de marqueurs de l'hypertrophie des chondrocytes a également été décrite dans plusieurs modèles animaux d'arthrose. Les souris STR/Ort développent une arthrose spontanée et présentent des caractéristiques assez similaires avec les patients arthrosiques, notamment des éléments liés à la réactivation du processus d'ossification endochondrale, comme un phénotype chondrocytaire hypertrophique avec l'expression des marqueurs collagène de type X et MMP-13 (Staines et al. 2016). Des marqueurs de l'hypertrophie ont également été détectés au niveau du cartilage du cochon d'Inde Hartley arthrosique, comme la transglutaminase-2 (J. L. Huebner et al. 2009) ou la MMP-13 (Burton et al. 2005). Dans un modèle d'arthrose spontanée chez un grand mammifère, le cheval, on retrouve également des marqueurs de l'apoptose au niveau du cartilage arthrosique (D. Y. Kim et al. 2003).

Davantage de données sont disponibles avec des modèles d'arthroses induites, où on retrouve une augmentation des marqueurs de l'hypertrophie chez différentes espèces. Chez la souris arthrosique, l'expression de MMP-13 et de collagène de type X est augmentée, suite à la déstabilisation de l'articulation par transection du ligament ménisco-tibial (Kamekura et al.

2005). On retrouve ces mêmes résultats chez le rat, après transection des ligaments croisés antérieurs (Appleton et al. 2007) ou le mouton après ménisectomie médiale (Ghosh et al. 1991).

d. Régulation de l'hypertrophie des chondrocytes dans l'arthrose

L'hypertrophie des chondrocytes au cours de l'arthrose est régulée par de multiples facteurs. Runx2 constitue le principal facteur de transcription impliqué dans la chondrogenèse et la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Hecht et al. 2007; X. Wang et al. 2004). Il régule l'expression du collagène de type X en se fixant sur son promoteur, au niveau d'une séquence répétée nommée HY box (« *hypertrophy box* ») (Higashikawa et al. 2009). Runx2 est fortement exprimé dans le cartilage arthrosique humain et dans des modèles animaux (Higashikawa et al. 2009; Kamekura et al. 2006; X. Wang et al. 2004). Les souris hétérozygotes déficientes pour Runx2 (Runx2^{+/-}) (Kamekura et al. 2006) présentent, suite à l'induction d'une arthrose post-traumatique, une dégradation du cartilage limitée et une diminution de l'expression de collagène de type X et de MMP-13, par rapport aux souris WT arthrosiques.

Le facteur de transcription Hypoxia-inducible factor 2-alpha (HIF-2 α) est également fortement exprimé dans le cartilage arthrosique humain et dans des modèles murins d'arthrose (T. Saito et al. 2010; S. Yang et al. 2010). HIF-2 α est impliqué dans la régulation de la différenciation hypertrophique des chondrocytes lors de l'ossification endochondrale. HIF-2 α , codé par le gène EPAS1 (endothelial PAS domain protein-1), est un activateur important du gène Col10a1 (T. Saito et al. 2010) et il active également l'expression de MMP-13 et du VEGF, via son interaction avec des éléments de réponses à l'hypoxie sur les promoteurs de ces gènes. Les souris hétérozygotes pour Epas1 (Epas1^{+/-}) montrent une résistance au développement de l'arthrose (T. Saito et al. 2010) tandis que la surexpression de Epas1 dans les chondrocytes entraîne la destruction du cartilage (S. Yang et al. 2010). Ainsi, HIF-2 α induit la destruction du cartilage en favorisant la différenciation hypertrophique des chondrocytes et en régulant l'expression d'enzymes cataboliques comme les MMP-1, 3, 9, 12 et 13, l'ADAMTS-4, Ptg2 et Nos2 (S. Yang et al. 2010). Zhang et al. ont montré que la chondromoduline participait au maintien du phénotype articulaire dans le cartilage sain, en inhibant la translocation nucléaire de HIF-2 α (X. Zhang et al. 2016) ainsi sa diminution dans le cartilage arthrosique pourrait conduire à l'activation de la voie de HIF-2 α .

La voie Wnt/ β -caténine est également impliquée dans les altérations du cartilage induites par la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Zhu et al. 2009). La surexpression de la β -caténine entraîne l'augmentation d'expression de marqueurs de l'hypertrophie comme

MMP-13, l'alkaline phosphatase, l'ostéocalcine et le collagène de type X par les chondrocytes articulaires tandis que son inhibition conduit à l'apoptose des chondrocytes (Zhu et al. 2008). La signalisation Wnt favorise la dégradation du cartilage, en augmentant l'activité de Runx2 (Y.-F. Dong et al. 2006; Guo et al. 2009).

La voie *Ihh* participe également à la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans le cartilage arthrosique, en induisant l'expression des marqueurs de l'hypertrophie, collagène de type X et MMP-13 (F. Wei et al. 2012). *Ihh* est exprimé dans le cartilage arthrosique et son expression est corrélée à la sévérité de l'arthrose, à l'expression des marqueurs de l'hypertrophie et à la taille des chondrocytes (F. Wei et al. 2012). La délétion de *Ihh* dans le cartilage de souris *Col2a1-CreER^{T2} ;Ihh^{fl/fl}* conduit à un développement modéré de l'arthrose et à une diminution d'expression des marqueurs de l'hypertrophie, comparé aux souris arthrosiques contrôles (J. Zhou et al. 2014).

Les facteurs pro-inflammatoires présents dans l'articulation arthrosiques, comme l'IL-8, les protéines S100 ou les facteurs de la voie NF-κB, participent et accélèrent l'hypertrophie des chondrocytes (Cecil et al. 2005; Cecil et Terkeltaub 2008; Olivotto et al. 2008).

Ainsi, il semblerait que de nombreux stimuli entraînent la différenciation hypertrophique des chondrocytes au cours de l'arthrose, où Runx2 jouerait un rôle central. La voie de différenciation des chondrocytes semble être inexorablement celle de l'hypertrophie, à moins qu'elle ne soit inhibée comme c'est le cas dans le cartilage articulaire sain, par des mécanismes finement régulés. L'arthrose est une pathologie principalement liée à l'âge qui serait donc associée à la perte de nombreux systèmes de régulation dans le cartilage dont celui de l'inhibition de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (P. M. van der Kraan et van den Berg 2012).

2.2. Modifications de l'os sous-chondral

L'implication de l'os sous-chondral dans la physiopathologie de l'arthrose a longtemps été considérée comme secondaire à la dégradation du cartilage et le résultat d'une adaptation de l'articulation. Il est maintenant établi que l'os sous-chondral constitue un acteur majeur du développement de l'arthrose (Funck-Brentano et Cohen-Solal 2015) et que ses altérations pourraient être concomitantes voir même précéder celles observées dans le cartilage (Carlson et al. 1994). Des modifications de la structure, de l'activité et du phénotype des cellules sont

observées au niveau de l'os sous-chondral arthrosique, aux stades précoce et tardif de la pathologie.

Au cours de l'arthrose, l'os sous-chondral est le siège d'un profond remodelage pathologique en réponse aux stress mécaniques et biochimiques qu'il subit. Les altérations osseuses comprennent des anomalies du remodelage osseux, avec *in fine* une augmentation de l'épaisseur de la plaque sous-chondrale – la sclérose de la plaque sous-chondrale – et la modification architecturale de l'os trabéculaire sous-chondral, le développement d'excroissances osseuses en marge de l'articulation – les ostéophytes – et la formation de lésions œdémateuses et de kystes sous-chondraux. Ainsi, ces altérations osseuses arthrosiques sont le résultat de modifications spatiales et temporelles que subit l'os sous-chondral au cours du développement et de la progression de la pathologie.

2.2.1. Modifications histologiques

a. Anomalies du remodelage de l'os sous-chondral

Le remodelage osseux est un processus essentiel à l'homéostasie osseuse mais il est altéré au cours de l'arthrose, suite à un déséquilibre entre la formation osseuse – assurée par les ostéoblastes – et la résorption de l'os – assurée par les ostéoclastes, avec des anomalies quantitatives de la masse osseuse mais également qualitatives de la minéralisation. Des observations récentes ont démontré que l'arthrose est associée à une perte osseuse précoce due à une augmentation du remodelage osseux, suivie d'un lent renouvellement du tissu osseux, conduisant à la densification de la plaque sous-chondrale aux stades tardifs de la maladie tandis que l'os trabéculaire reste ostéopénique (David B. Burr et Gallant 2012; S. R. Goldring et Goldring 2016).

Les modifications structurales de l'os sont visibles chez les patients arthrosiques grâce à des techniques d'imagerie dont la scintigraphie osseuse proposée en 1993 par Dieppe *et al.* comme marqueur prédictif des modifications structurales observées dans l'arthrose (Dieppe *et al.* 1993). Cette méthode permet d'évaluer le métabolisme osseux, grâce à l'absorption de diphosphonates marqués par un radiotracteur, et ainsi d'observer des altérations du remodelage osseux avant l'apparition de lésions du cartilage (Buckland-Wright 2004). Des biomarqueurs de résorption osseuse urinaires ou sériques, comme les fragments de collagène de type I (télopeptides C- et N- terminaux), sont corrélés positivement avec la progression de la

gonarthrose radiologique (Bettica et al. 2002), le pincement articulaire et la formation d'ostéophytes (Janet L. Huebner et al. 2014).

Stade précoce de la maladie

Des études menées sur différents modèles animaux d'arthrose, comme le chien et le lapin, ont montré un remodelage osseux accru aux stades précoces de la maladie conduisant à une résorption de l'os sous-chondral (**Figure 26**). Ainsi, dans deux modèles canins d'arthrose, le premier consistant à effectuer des lésions du cartilage articulaire sans endommager l'os sous-chondral et le second – plus sévère – de transection du ligament croisé antérieur (ACLT), l'épaisseur de la plaque sous-chondrale était réduite après quelques semaines (Sniekers et al. 2008). Sniekers *et al.* ont également montré que la résorption osseuse était associée à la dégradation du cartilage articulaire. En revanche, des modifications de densité de l'os trabéculaire n'ont été observées que dans le modèle d'arthrose sévère, où la fraction de volume osseux (volume osseux/volume total) et l'épaisseur des trabécules sont fortement réduites (Sniekers et al. 2008). L'amincissement de la plaque sous-chondrale est également associé à une dégradation accrue du cartilage chez le lapin arthrosique. L'induction d'une ostéoporose, par stimulation du remodelage osseux et de la perte osseuse, avant induction de l'arthrose augmente considérablement les lésions du cartilage, suggérant l'implication du remodelage osseux dans les atteintes du cartilage (Bellido et al. 2010). De même, l'ostéoporose pourrait contribuer à la progression de l'arthrose chez les patients (Chu et Yu 2019).

Ce remodelage osseux accru au stade précoce d'arthrose peut entraîner des modifications de la forme de l'articulation et de la transmission des charges prédisposant à la perte progressive du cartilage (David B. Burr et Gallant 2012).

Stade tardif de la maladie

La résorption osseuse est suivie d'un lent remaniement avec un découplage entre formation et résorption osseuse en faveur d'une synthèse accrue de matrice ostéoïde conduisant à un épaississement de la plaque sous-chondrale. Cette augmentation de volume osseux conduit à une rigidité mécanique et une sclérose sous-chondrale (B. Li et Aspden 1997). La sclérose sous-chondrale est un événement tardif qui ne concerne que la plaque sous-chondrale, l'os trabéculaire restant ostéopénique (**Figure 26**) (David B. Burr et Gallant 2012).

La sclérose est une des caractéristiques principales de l'arthrose et un des mécanismes participant à l'aggravation de la pathologie en augmentant le stress sur le cartilage (Radin et

Rose 1986). Les patients arthrosiques présentent une augmentation de 15% de la densité osseuse et 30% du volume osseux par rapport aux sujets sains (N. K. Arden et al. 1996; Hannan et al. 1993), accompagné d'une baisse de la minéralisation osseuse (Grynpas et al. 1991). La matrice ostéoïde nouvellement formée est constituée d'un important ratio de collagène de type I α -1/collagène de type I α -2, ce qui entraîne un défaut de minéralisation (Couchourel et al. 2009). Cette augmentation de la synthèse de collagène diminue fortement le ratio calcium/collagène, contribuant au défaut de minéralisation de l'os (Mansell et Bailey 1998).

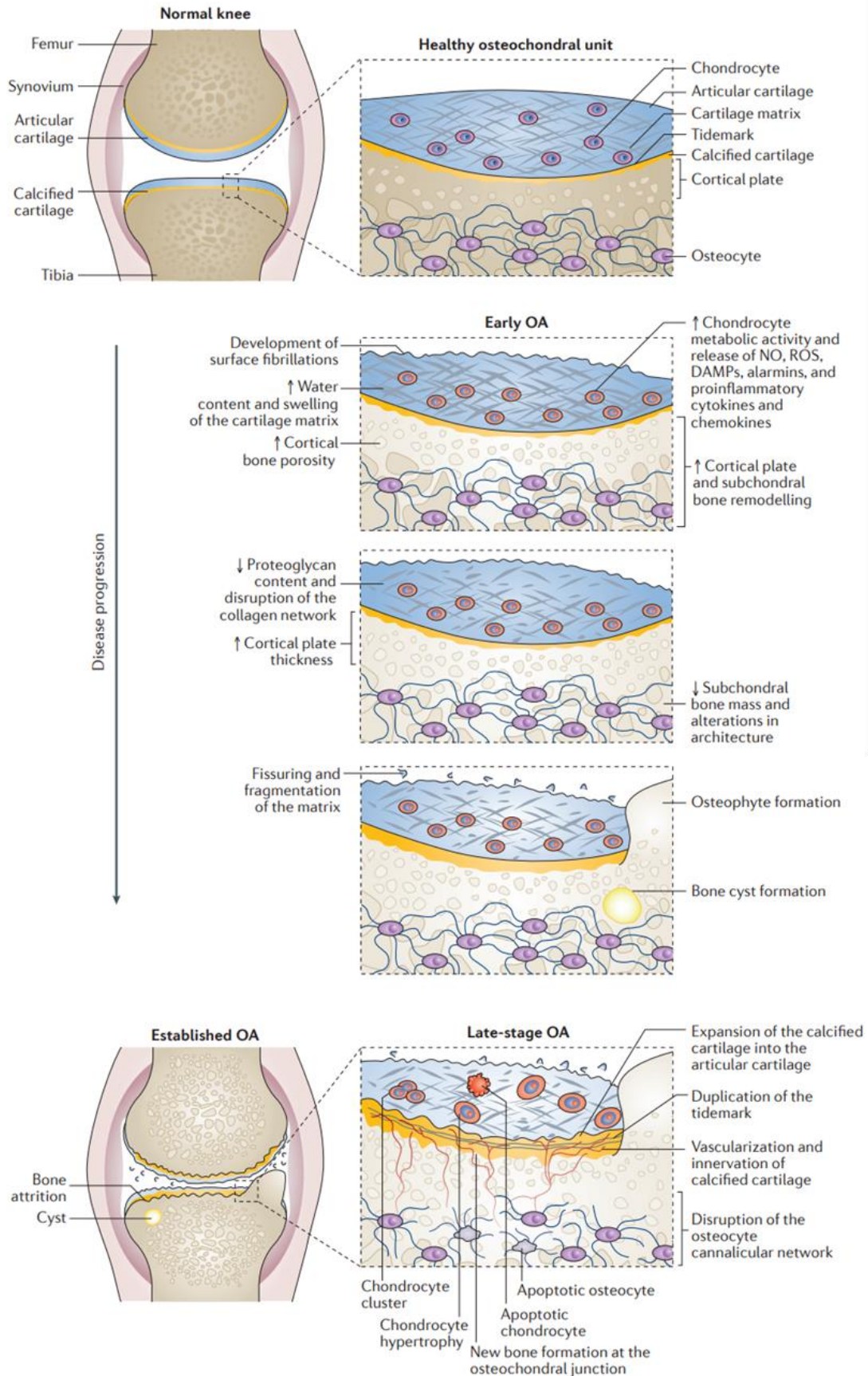


Figure 26. Evolution de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose. D'après (S. R. Goldring et Goldring 2016).

b. Anomalie de la vascularisation osseuse

L'ostéogenèse est un processus essentiel pour le maintien du système squelettique. En effet, la rupture de l'homéostasie osseuse est au cœur de plusieurs pathologies comme l'ostéoporose et l'arthrose. Au cours du développement embryonnaire du squelette, l'ostéogenèse est étroitement liée à l'angiogenèse (Kronenberg 2003). Dans l'embryon, les condensations mésenchymateuses puis les chondrocytes hypertrophiques expriment le VEGFA, principal régulateur de l'angiogenèse, et ligand du récepteur VEGFR2 (Eshkar-Oren et al. 2009). Le VEGFA contrôle la morphogenèse de la plaque de croissance, le remodelage du cartilage et l'invasion vasculaire au cours de l'ossification endochondrale (Gerber et al. 1999; Maes et al. 2004; Maes, Goossens, et al. 2010). Ainsi, l'os est un tissu hautement vascularisé, contenant un vaste réseau vasculaire composé de larges vaisseaux et de capillaires.

Les vaisseaux de l'os sont constitués de cellules endothéliales spécialisées qui présentent des propriétés morphologiques, moléculaires et fonctionnelles spécifiques. Kusumbe *et al.* ont identifié un sous-type particulier de vaisseaux sanguins présents dans l'os cortical et trabéculaire, à proximité de la plaque de proximité et au niveau du périoste et de l'endoste de la diaphyse (Kusumbe, Ramasamy, et Adams 2014). Ces vaisseaux ont été nommés vaisseaux de type H, en raison de leur forte expression pour CD31 et pour l'Endomucine (Emcn). Les vaisseaux H (CD31^{hi}Emcn^{hi}) sont organisés en colonnes, parallèlement à la longueur de l'os et sont interconnectés entre eux. En revanche, les vaisseaux sinusoidaux de la diaphyse, qui forment un réseau dense et ramifié dans la cavité médullaire, présentent une faible expression de CD31 et Emcn. Ces vaisseaux (CD31^{lo}Emcn^{lo}) sont appelés vaisseaux de type L. Les vaisseaux H présentent un arrangement dense de cellules ostéoprogénitrices, exprimant des facteurs comme Osterix, qui favorise la différenciation ostéoblastique (K. Nakashima et al. 2002b). Des ostéoprogéniteurs exprimant Runx2 et le collagène de type I sont également retrouvés en étroite relation avec les vaisseaux H de la métaphyse et de l'endoste (Kusumbe, Ramasamy, et Adams 2014). En revanche, les vaisseaux de type L ne présentent pas d'ostéoprogéniteurs à proximité (**Figure 27**) (Peng et al. 2020).

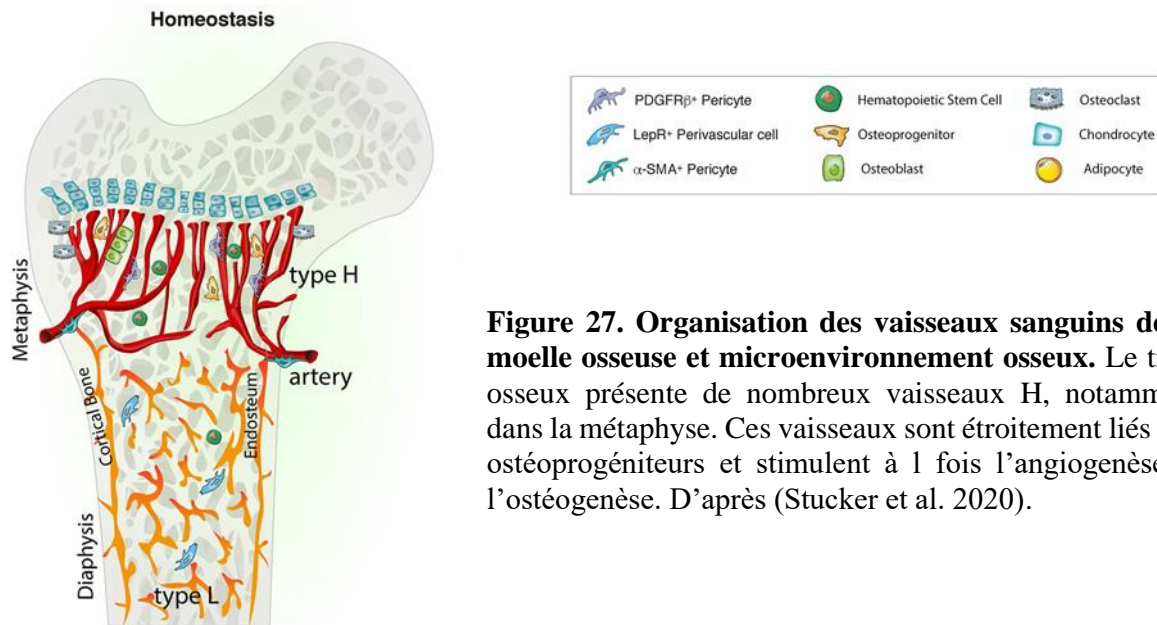


Figure 27. Organisation des vaisseaux sanguins de la moelle osseuse et microenvironnement osseux. Le tissu osseux présente de nombreux vaisseaux H, notamment dans la métaphyse. Ces vaisseaux sont étroitement liés aux ostéoprogéniteurs et stimulent à la fois l'angiogenèse et l'ostéogenèse. D'après (Stucker et al. 2020).

En condition arthrosique, le nombre de vaisseaux de type H augmente significativement dans l'os sous-chondral. Cette néo-angiogenèse est associée à la formation d'îlots ostéoïdes, à la sclérose de l'os sous-chondral et à la formation de kystes et d'ostéophytes (Lu et al. 2018). De plus, une invasion vasculaire est observée dans le cartilage arthrosique, normalement avasculaire. Ces vaisseaux sanguins proviennent de l'os sous-chondral. Ainsi, au cours de la progression de l'arthrose, les vaisseaux H de l'os sous-chondral progressent jusqu'au cartilage articulaire où ils pourraient contribuer à la progression de la pathologie. En effet, des vaisseaux H libèrent des protéases comme MMP-2, MMP-9 et MMP-14, qui favorise la résorption de la matrice du cartilage et donc sa dégradation (Romeo et al. 2019). Lu *et al.* ont observé une augmentation de vaisseaux H dans l'os sous-chondral de souris arthrosiques. Dans un système où mTORC1 est activé, les chondrocytes articulaires favorisent la formation de vaisseaux de type H, en réponse à une stimulation par l'L-1 β , via la production de VEGF (Lu et al. 2018).

c. Ostéophytes

Les ostéophytes font partie des principales caractéristiques radiologiques de l'arthrose. Ces excroissances osseuses recouvertes d'une structure fibrocartilagineuse apparaissent aux bords de l'articulation. Ils peuvent se former dès le début du développement de l'arthrose et sont visibles avant le pincement de l'interligne articulaire. Ils peuvent avoir un impact clinique très important en étant source de douleurs et de perte de fonction de l'articulation (Peter M. van der Kraan et van den Berg 2007a).

La formation d'un ostéophyte résulte de la récapitulation du processus d'ossification endochondrale et débute par la prolifération des cellules souches mésenchymateuses du périoste au niveau des marges de l'articulation. Ces cellules se différencient ensuite en chondrocytes qui vont déposer une matrice extracellulaire riche en agrécane. L'ostéophyte reste recouvert d'une couche de cellules fibroblastiques pendant son développement, qui contribuent à la croissance de l'ostéophyte par chondrogenèse. Les chondrocytes au centre de l'ostéophyte se différencient en chondrocytes hypertrophiques aboutissant au dépôt d'une matrice osseuse puis à la formation de cavités médullaires. Un ostéophyte complètement développé est intégré à l'os sous-chondral, conserve une couche fibreuse externe et sa surface est recouverte de cartilage, en continuité avec le cartilage articulaire (Peter M. van der Kraan et van den Berg 2007a). La production locale de facteurs de croissance comme le TGF- β et BMP-2 est impliquée dans ce mécanisme (van Beuningen et al. 1998). Ainsi, l'injection intra-articulaire de TGF β -1 ou de BMP-2 induit la formation d'ostéophytes (Bakker et al. 2001; van Beuningen et al. 1998) et l'inhibition de TGF β -1 réduit drastiquement leur formation dans des modèles murins (Scharstuhl et al. 2002). Les facteurs IGF-1 et bFGF sont également détectés dans les ostéophytes (Okazaki et al. 1999; Uchino et al. 2000). Il a été montré que la formation d'ostéophytes est accompagnée par la pénétration de vaisseaux sanguins dans les couches profondes du cartilage, comme c'est le cas dans la plaque de croissance lors du processus d'ossification endochondrale. Les chondrocytes hypertrophiques des ostéophytes expriment le VEGF, qui régule la vascularisation de l'ostéophyte (S. Hashimoto et al. 2002).

Les ostéophytes se forment dans des zones où s'appliquent de fortes charges mécaniques, laissant supposer que des facteurs mécaniques seraient également impliqués dans leur développement. Certaines études semblent montrer que les ostéophytes participent à la stabilisation de l'articulation. En effet, le sectionnement des ostéophytes chez les patients arthrosiques présentant un varus-valgus augmente l'instabilité de l'articulation (Pottenger, Phillips, et Draganich 1990). De plus, la taille des ostéophytes ne serait pas corrélée à la progression de la gonarthrose chez les patients (D. T. Felson et al. 2005).

d. Œdèmes médullaires et kystes sous-chondraux

Les œdèmes médullaires ou BML pour « *bone marrow lesion* » regroupent un ensemble d'anomalies histologiques caractérisées par une nécrose osseuse, une fibrose de la moelle osseuse et une infiltration de cellules inflammatoires (Zanetti et al. 2000). L'origine de ces lésions reste encore mal connue. Le stress mécanique a été mis en avant, notamment parce que

ces lésions apparaissent sur des zones de contraintes lors des troubles de l'alignement des membres inférieurs (David T. Felson et al. 2003). De plus, à un stade avancé de coxarthrose, ces lésions correspondraient à des microfractures à différents stades de cicatrisation, associées à de la fibrose ou de la nécrose de la moelle osseuse (Taljanovic et al. 2008). Ainsi, les œdèmes médullaires reflèteraient une activation du remodelage osseux, avec une augmentation de la densité osseuse, un épaississement de la plaque sous-chondrale et une augmentation du nombre, du volume et de l'épaisseur des trabécules. Ces anomalies du remodelage osseux sont associées à une augmentation de la vascularisation de l'os sous-chondral, à une nécrose et une fibrose de la moelle osseuse ainsi qu'à des lésions cartilagineuses plus sévères (Funck-Brentano et Cohen-Solal 2015). Les œdèmes médullaires pourraient évoluer en kystes sous-chondraux (Crema et al. 2010). Les kystes sous-chondraux correspondent à des cavités présentes dans l'os sous-chondral, qui contiennent des fragments d'os nécrotiques avec des cellules mortes et entourées d'une couche de tissu conjonctif fibreux (Pouders et al. 2008).

2.2.2. Modifications cellulaires et matricielles

a. Activité ostéoblastique

Les ostéoblastes de l'os sous-chondral subissent différentes modifications au cours de l'arthrose, qui vont entraîner l'acquisition d'un phénotype altéré (Hilal et al. 1998). Une analyse par microarray a révélé que l'os sous-chondral arthrosique présentait un profil d'expression génique différent de l'os sous-chondral ostéoporotique et sain. Ces gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans la fonction des ostéoblastes, des ostéocytes et des ostéoclastes, principalement la voie WNT et TGF- β (Hopwood et al. 2007).

En réponse au stress mécanique, les ostéoblastes acquièrent un phénotype sclérotique, caractérisé par une activité sécrétoire accrue par rapport aux ostéoblastes non sclérotiques. Ce phénotype sclérotique présente une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance (VEGF, TGF- β 1), de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8), d'enzymes matricielles (MMP-13, phosphatase alcaline) et de protéines matricielles (ostéocalcine, ostéopontine) (Sanchez et al. 2008). Le rôle du stress mécanique dans les modifications de l'os sous-chondral a été confirmé *in vivo* dans un modèle murin, où la compression cyclique des genoux favorise la sclérose de la plaque sous-chondrale, la perte osseuse de l'os trabéculaire et la formation d'ostéophytes (Ko et al. 2013).

b. Activité ostéoclastique

L'activation des ostéoclastes au cours de l'arthrose conduit à une résorption accrue survenant aux stades précoces de la pathologie, notamment via la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes, les ostéocytes mais également par les synoviocytes arthrosiques (Karsdal et al. 2014). Une étude récente a montré que l'implication des pré-ostéoclastes dans l'angiogenèse de l'os sous-chondral, par une sécrétion accrue de PDGF-BB, contribuant au développement de l'arthrose (Su et al. 2020).

2.3. Remodelage de la membrane synoviale

Au cours de l'arthrose, la membrane synoviale est activée par des fragments cartilagineux, issus de la protéolyse de la matrice extracellulaire du cartilage, libérés dans la cavité articulaire. La membrane synoviale, dont une des fonctions est la défense et la réponse immunitaire intra-articulaire, va recruter des cellules de l'immunité innée et adaptative et déclencher une réponse inflammatoire, afin d'éliminer ces débris matriciels (Sellam et Berenbaum 2010). Cette inflammation est dite de bas-grade, en comparaison avec d'autres rhumatismes dont la composante inflammatoire est beaucoup plus importante, comme la polyarthrite rhumatoïde. La membrane synoviale inflammatoire va libérer des cytokines (interleukines, chimiokines, lipides bioactifs, ROS) et des protéases (MMP, ADAMTS) qui vont aggraver la réponse inflammatoire et la protéolyse du cartilage.

2.3.1. Modifications histologiques

Histologiquement, la membrane synoviale inflammatoire est le siège d'une hyperplasie et une hypertrophie de sa couche superficielle, l'intima, associée à une fibrose et une néo-angiogenèse de sa couche profonde, la subintima. L'hyperplasie de l'intima est principalement causée par le recrutement de cellules immunitaires et notamment de monocytes, macrophages, lymphocytes T et B et mastocytes, en réponse à la sécrétion de chimiokines, cytokines et molécules d'adhérence comme V-CAM et E-sélectine par les cellules résidentes de la membrane synoviale (de Lange-Brokaar et al. 2012; Sellam et Berenbaum 2010). La membrane synoviale est aussi le siège d'une néo-angiogenèse, sous l'effet de facteurs pro-angiogéniques, qui participe à son inflammation. La densité vasculaire de la subintima est corrélée à l'inflammation synoviale mais pas aux lésions du cartilage, ni à l'angiogenèse ostéochondrale avec laquelle elle constitue deux mécanismes physiopathologiques différents (Walsh et al. 2007b). Le liquide synovial sera également altéré en conditions arthrosique avec un poids

moléculaire et une concentration en acide hyaluronique diminués, affectant la lubrification et l'intégrité du cartilage (**Figure 28**) (Scanzello et Goldring 2012).

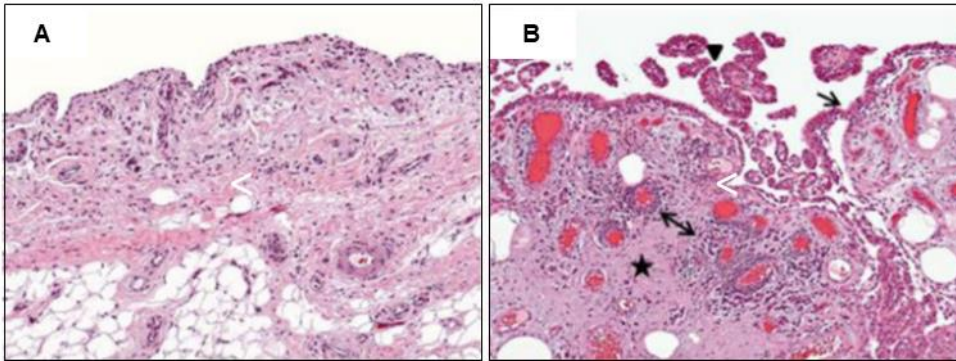


Figure 28. Coupes histologiques de la membrane synoviale saine et arthrosique. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (A) Membrane synoviale saine. (B) Membrane synoviale arthrosique, avec présence d'une hyperplasie (flèche), d'une fibrose (*) et d'infiltrations de cellules mononucléaires périvasculaires (double flèche). D'après (Scanzello et Goldring 2012)

2.3.2. Modifications cellulaires

Les synoviocytes de type A jouent leur rôle de cellules phagocytaires et s'activent après détection des débris de la MEC et des alarmines du liquide synovial. La détection des signaux de dangers est réalisée grâce à des récepteurs impliqués dans la reconnaissance de facteurs inflammatoires et de signaux d'alarmes, les PRR (Pathogen Recognition Receptors) de type TLR, RAGE ou NLR, présents à la surface des synoviocytes de type A et B. L'activation des PRR des synoviocytes macrophagiques par l'IL-1 β et le TNF- α activent des voies de l'inflammation comme NF- κ B et MAPK (Liu-Bryan et Terkeltaub 2015).

Le nombre de synoviocytes macrophagiques augmente au cours de l'arthrose. Ils sont une des principales sources de TNF- α et d'IL-1 β . Les cultures de membranes synoviales arthrosiques déplétées en synoviocytes macrophagiques ne produisent plus de TNF- α ni d'IL-1 β . Ces cytokines produites localement vont activer les autres cellules immunitaires ainsi que les synoviocytes fibroblastiques et induire à leur tour la production de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8 et MCP-1), de protéases (MMP-1, 3, 9 et 13) ainsi que de monoxyde d'azote et de PGE2 dans la cavité articulaire (Bondeson et al. 2006; D. Han et al. 2020). *In vivo*, la déplétion des synoviocytes de type A protège de l'arthrose induite par injection de collagénase dans l'articulation (Blom et al. 2007).

Sous l'effet du stress inflammatoire, les synoviocytes produisent des facteurs pro-angiogéniques, favorisant l'angiogénèse locale et la production de TGF- β qui va induire la formation d'ostéophytes (Bakker et al. 2001). Le tissu synovial est très vascularisé physiologiquement afin d'apporter nutriments et oxygène au cartilage. La densité vasculaire augmente nettement dans la membrane synoviale arthrosique, suite à la production de nombreux facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF et son inducteur HIF-1 α , par les synoviocytes macrophagiques (Giatromanolaki et al. 2003; Haywood et al. 2003). L'angiogénèse contribue fortement au maintien d'une inflammation chronique au sein du tissu synovial, par exemple en produisant des molécules d'adhérence au niveau des nouveaux vaisseaux qui facilite l'infiltration de cellules immunitaires. Ainsi l'inflammation et l'angiogénèse sont deux mécanismes qui s'entretiennent mutuellement au sein du tissu synovial (**Figure 29**) (Bonnet et Walsh 2005).

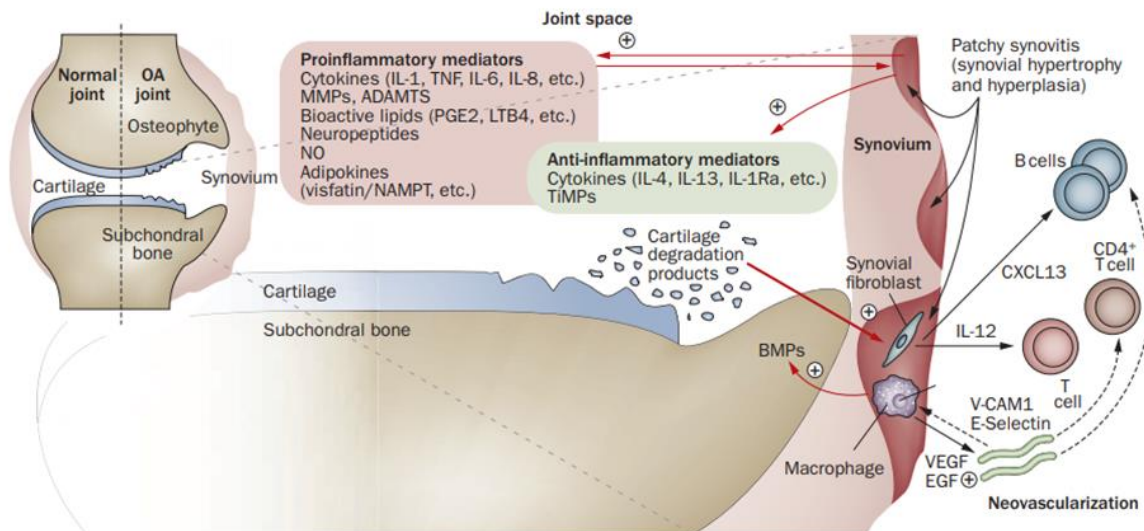


Figure 29. Rôle de la membrane synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose. D'après (Sellam et Berenbaum 2010)

2.4. Modifications des autres tissus de l'articulation

2.4.1. Tissu adipeux de Hoffa

Le rôle bénéfique ou délétère du tissu adipeux de Hoffa dans l'arthrose du genou est sujet à de nombreux débats (L.-F. Jiang, Fang, et Wu 2019; Zapata-Linares et al. 2021). Il aurait des effets protecteurs, notamment grâce à sa localisation qui permet d'augmenter la surface de la membrane synoviale et donc d'améliorer la lubrification de l'articulation (Ding et al. 2013). Han *et al.* ont montré que le volume du tissu de Hoffa était corrélé positivement avec l'épaisseur

du cartilage, l'âge des sujets mais pas avec leur IMC. Le volume du tissu de Hoffa est également négativement corrélé avec la présence d'ostéophytes et d'œdème médullaires (W. Han et al. 2014). Le tissu de Hoffa serait également source de facteurs bénéfiques comme la leptine qui contribue à la synthèse de protéoglycanes et de collagène de type II et de cellules souches mésenchymateuses qui bloqueraient la sécrétion de médiateurs inflammatoires par la membrane synoviale et les chondrocytes arthrosiques (Manferdini et al. 2013).

Cependant le tissu de Hoffa pourrait contribuer à la physiopathologie de l'arthrose, en sécrétant de grandes quantités de facteurs inflammatoires et d'adipokines, comme l'IL-6, l'adiponectine, la PGE₂, la PGF₂α et la visfatine (Bastiaansen-Jenniskens et al. 2013; Eymard et al. 2014; Klein-Wieringa et al. 2011). Le rôle de la leptine est néanmoins ambigu puisque plusieurs équipes ont montré son rôle pro-catabolique sur le cartilage arthrosique (Koskinen et al. 2011). L'inflammation du tissu de Hoffa contribuerait également grandement aux douleurs associées à la gonarthrose (Ballegaard et al. 2014; Belluzzi et al. 2019). En effet, au cours de l'arthrose, le tissu de Hoffa est la cible d'une infiltration de cellules inflammatoires, d'une fibrose et d'une augmentation de sa vascularisation (Eymard et al. 2017; Klein-Wieringa et al. 2011).

2.4.2. Tissu adipeux intra-médullaire

Le tissu adipeux intra-médullaire ou BMAT pourrait également participer à la pathophysiologie de l'articulation arthrosique, puisqu'il est en étroite collaboration avec le tissu osseux qui subit un profond remodelage au cours de la maladie. Le BMAT est impliqué dans d'autres pathologies où l'homéostasie osseuse est rompue comme l'ostéoporose (Jiao Li et al. 2020), cependant il reste peu étudié dans un contexte d'arthrose. Les adipocytes de la moelle osseuse favoriseraient la résorption de l'os, en bloquant la différenciation ostéoblastique de cellules souches mésenchymateuses (Abdallah 2017) et en favorisant la différenciation des ostéoclastes à partir des cellules souches hématopoïétiques (Muruganandan et Sinal 2014).

Chez les patients ostéoporotiques, la résorption osseuse s'accompagne d'une augmentation de l'adiposité médullaire. Les têtes fémorales de patients arthrosiques contiennent de grande quantité de lipides, particulièrement de l'acide arachidonique -précurseur de PGE₂- comparé aux patients ostéoporotiques (Plumb et Aspden 2004). Li *et al.* ont montré que le volume du BMAT était augmenté chez les femmes ménopausées atteintes d'arthrose et d'ostéoporose (G. Li et al. 2017).

2.4.3. Ménisques et ligaments

Les ménisques sont très fréquemment atteints dans l'arthrose et peuvent être à la fois la cause de l'apparition et la conséquence de la progression de la pathologie. Les lésions des ménisques sont soit de type traumatique soit de type dégénératif (Martin Englund, Guermazi, et Lohmander 2009). Les lésions traumatiques surviennent généralement chez des individus jeunes en raison d'un traumatisme articulaire au cours duquel le ménisque se retrouve coincé entre le plateau tibial et le condyle fémoral, dû à des forces mécaniques excessives. Le ménisque se fend alors en deux, à la verticale, parallèlement ou perpendiculairement aux fibres de collagène. Ces déchirures conduisent souvent à une ménisectomie et sont associées à un risque accru de développer une gonarthrose 15 à 22 ans plus tard (M. Englund et Lohmander 2004; Fairbank 1948). Les lésions dégénératives sont quant à elles plutôt associées aux sujets âgés, avec la présence de fibrillations et de fissures dues à la dégradation du ménisque. L'étude de la cohorte de Framingham a montré que 82% des gonarthroses radiologiques présentaient des lésions du ménisque (Martin Englund et al. 2008). Les modifications macroscopiques de la morphologie des ménisques sont positivement corrélées aux altérations du cartilage arthrosiques (Pauli et al. 2011). Le fibrocartilage méniscal subit de nombreuses altérations au cours de l'arthrose, semblables aux altérations observées dans le cartilage articulaire, comme la dégradation de la matrice, la fibrillation du tissu, le passage d'un phénotype fibroblastique à un phénotype chondrocytaire, la prolifération des cellules avec la formation de clusters et la calcification du tissu (Pauli et al. 2011). L'opération chirurgicale de déstabilisation du ménisque médial associée ou non à une ménisectomie est d'ailleurs fréquemment utilisée dans les modèles murins pour induire une arthrose post-traumatique (Glasson, Blanchet, et Morris 2007).

Les lésions des ligaments croisés antérieurs (LCA) sont relativement fréquentes chez les individus pratiquant des sports impliquant des pivotements des genoux. L'incidence de l'arthrose post-traumatique suite à des lésions des ligaments croisés antérieurs atteint 87% (Friel et Chu 2013; Shelbourne et Stube 1997). Les mécanismes responsables du développement et de la progression de l'arthrose suite à des lésions du LCA sont multifactoriels. Le traumatisme initial déstabilise toutes les structures intra-articulaires et entraîne des dommages au cartilage et à l'os sous-chondral dans près de 90% des cas (Nishimori et al. 2008). Outre le traumatisme initial, la perte d'un LCA fonctionnel conduit à des modifications des charges qui s'exercent sur le cartilage et les ménisques, augmentant le risque de lésions sur ces tissus. Ainsi, des lésions du LCA combinées à des atteintes du cartilage et des ménisques augmentent le risque de

développer de l'arthrose post-traumatique (Oiestad et al. 2010). Cependant les lésions du LCA ne sont pas uniquement associées à l'arthrose post-traumatique. Sur 360 patients présentant une gonarthrose symptomatique, 22,8% présentaient une rupture totale du LCA et seulement la moitié d'entre eux avaient signalé une blessure au genou (C. L. Hill et al. 2005). La transection des ligaments croisés antérieurs est également fréquemment utilisée comme modèle d'arthrose post-traumatique.

PARTIE III - L'UNITÉ FONCTIONNELLE CARTILAGE / OS SOUS-CHONDRAL

Le cartilage articulaire et l'os sous-chondral sont deux acteurs majeurs contribuant à l'apparition, au développement et à la progression de l'arthrose. Ces deux tissus forment une unité fonctionnelle au sein de l'articulation qui permet d'assurer le maintien de son homéostasie (Goldring et Goldring 2016; Lories et Luyten 2011). Ainsi, le changement des propriétés mécaniques ou biochimiques de l'un de ces deux tissus peut modifier les propriétés et donc l'homéostasie de l'autre. Le remodelage pathologique de l'os sous-chondral contribue donc au développement d'un environnement défavorable pour l'articulation, aggravant la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose.

1. Interactions fonctionnelles entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral

1.1. Les différents types d'interactions fonctionnelles entre le cartilage et l'os

1.1.1. Interactions mécaniques

L'altération des propriétés mécaniques de l'os sous-chondral se répercute sur les capacités d'amortissement de l'articulation et conduit à un stress mécanique anormal au niveau du cartilage. Une étude réalisée chez le mouton a démontré que l'augmentation de la rigidité osseuse par l'introduction d'un cylindre métallique dans la plaque sous-chondrale, donc à proximité du cartilage, entraînait une augmentation des contraintes mécaniques d'environ 50% dans la couche profonde du cartilage, alors que le cylindre ne provoque aucune réponse du cartilage lorsqu'introduit dans l'os trabéculaire (Brown et al. 1984). Une autre étude a montré que l'application d'une charge compressive cyclique sur des articulations de souris pendant 6 semaines induisait un épaississement de la plaque sous-chondrale associé à des altérations du cartilage, notamment des fibrillations, une perte de protéoglycanes et un amincissement (Ko et al. 2013). Dans un modèle murin d'ostéogenèse imparfaite, une fragilité osseuse due à une mutation du gène codant le collagène de type I, provoque la dégradation progressive du cartilage (Blair-Levy et al. 2008). L'haploinsuffisance de GDF-5 chez la souris *Gdf5* (Bp-J/+) conduit à des altérations de la densité minérale osseuse et à une désorganisation du réseau de collagène, qui contribueraient au développement d'une instabilité de l'articulation au cours de la marche et ainsi à l'apparition d'une arthrose (Daans, Luyten, et Lories 2011). Au contraire, dans des modèles expérimentaux d'arthrose, l'administration de composés

pharmacologiques qui inhibent le remodelage osseux, tels que l'alendronate chez le rat (Hayami et al. 2004), l'ostéoprotégérine chez la souris (Kadri et al. 2008), la calcitonine chez le lapin (Papaioannou et al. 2007) ou le chien (El Hajjaji et al. 2004), a un effet chondroprotecteur en limitant les atteintes du cartilage. Enfin, des observations cliniques confirment le lien existant entre la dégradation du cartilage et le remodelage pathologique de l'os sous-chondral, puisque des altérations de la structure de l'os sous-chondral sont associées à des lésions du cartilage des régions adjacentes (Buckland-Wright 2004; Neogi et al. 2009).

1.1.2. Interactions biochimiques

De nombreuses études mettent en évidence la présence d'une interaction biochimique physiologique entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral, à travers le cartilage calcifié, via un ensemble de molécules solubles qui participent à la communication entre ces différents tissus de l'articulation.

Dans les années 1950, le cartilage calcifié et la tidemark étaient considérés par certains comme une barrière imperméable qui empêchait tout transfert de molécules entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral, proposant que la nutrition du cartilage était principalement assurée par le liquide synovial (Collins 1949; Maroudas et al. 1968). Ces études ont été remise en question par une étude de 1962 montrant que le cartilage était perméable aux colorants cationiques, indiquant que le passage de molécules au travers de la matrice du cartilage dépendait de la charge des molécules (Brower, Akahoshi, et Orlic 1962). Depuis, des études réalisées avec des agents de contraste et des molécules fluorescentes ont démontré que de nombreuses molécules pouvaient diffuser au travers du cartilage articulaire, non seulement par la surface articulaire mais également par le cartilage calcifié, depuis l'os sous-chondral. Ainsi, Bashir *et al.* ont démontré *in vivo* grâce à l'IRM que le gadopentétane (Gd-DTPA²⁻), administré en intraveineuse, pénétrait les couches profondes du cartilage par la vascularisation sous-chondrale (Bashir et al. 1997). La diffusion de molécules de petites tailles (inférieure à 400 Da) entre l'os et le cartilage a été évaluée dans un modèle d'explant de cartilage équin à l'aide de traceurs fluorescents et a révélé que le cartilage calcifié était bien perméable aux solutés de petits poids moléculaires, en particulier à proximité de la tidemark. Cependant, cette diffusion était 5 fois moins rapide que dans le cartilage non calcifié. De plus, une charge positive des solutés facilitait leur diffusion dans la matrice anionique du cartilage calcifié (Arkill et Winlove 2008). Pan *et al.* ont également démontré *in vivo* et *ex vivo* que de nombreuses molécules diffusaient au travers de l'interface os-cartilage chez la souris et que cette diffusion était assurée

par des zones non minéralisées au sein du cartilage calcifié (Pan et al. 2009). Quelques années plus tard, Pan *et al.* montraient que cette diffusion était accélérée dans des modèles murins d'arthrose, et suggéraient que cette interaction fonctionnelle entre l'os et le cartilage était augmentée, par la diminution de l'épaisseur de l'os et du cartilage mais également par l'apparition de structures vasculaires permettant cette interaction (Pan et al. 2012). Une autre étude rapportait une augmentation de la conductance hydraulique à la jonction ostéocondrale avec la progression de l'arthrose humaine. Cette forte conductance faciliterait le transport de facteurs de croissance, de cytokines, de nutriments et d'enzymes et modifierait les propriétés mécaniques du cartilage (Hwang et al. 2008).

Ainsi, de nombreuses études soulignent la présence d'une interaction fonctionnelle biochimique à l'état physiologique entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral (Lories et Luyten 2011). En effet, lorsque le cartilage est séparé de l'os par une structure imperméable, il dégénère (Malinin et Ouellette 2000). En condition pathologique, le remodelage de l'os sous-chondral excessif conduirait à la libération de médiateurs solubles qui pourraient atteindre le cartilage articulaire et participer à l'initiation et à la progression de l'arthrose (Lajeunesse et Reboul 2003). En effet, les ostéoblastes arthrosiques produisent l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) qui diffuse jusqu'au cartilage, où on le détecte par immunohistochimie dans les couches profondes du cartilage arthrosique humain (Guévremont et al. 2003).

Différents systèmes de co-cultures entre ostéoblastes et chondrocytes démontrent l'implication des cellules osseuses dans les modifications du cartilage arthrosique. Une première étude de co-culture de cellules osseuses arthrosiques et d'explants de cartilage sains a montré que les ostéoblastes arthrosiques causaient la perte des protéoglycanes du cartilage, alors que des ostéoblastes sains n'avaient aucun effet sur le métabolisme du cartilage *in vitro* (Westacott et al. 1997). Ces résultats suggèrent que des médiateurs solubles sont sécrétés par les ostéoblastes arthrosiques et qu'ils peuvent induire directement la dégradation du cartilage. Plus récemment, Sanchez *et al.* montraient que les ostéoblastes issus des zones scléreuses de l'os sous-chondral présentaient un profil d'expression génique en culture primaire différents des ostéoblastes des zones non scléreuses des mêmes patients arthrosiques (Sanchez et al. 2008) et qu'ils affectaient le phénotype des chondrocytes *in vitro*, notamment en inhibant l'expression d'agrecane, de Sox9 et de Col2 et augmentant l'expression de protéases comme la Mmp3 et 13 (Sanchez et al. 2005a, 2005b). Les chondrocytes arthrosiques stimulent également la différenciation des ostéoblastes, contrairement aux chondrocytes sains qui l'inhibent (Prasadam et al. 2010). Notre équipe a identifié le rôle de la protéine 14-3-3 ϵ soluble (Priam et al. 2013),

une alarmine produite par les ostéoblastes murins soumis à un stress mécanique, dans l'acquisition d'un phénotype inflammatoire et catabolique des chondrocytes, des synoviocytes et des macrophages (M. Millerand et al. 2020; Priam et al. 2013).

1.2. Les vecteurs des interactions biochimiques entre le cartilage et l'os

La communication entre le cartilage et l'os est assurée par différents vecteurs qui facilitent le passage de signaux biologiques d'un tissu à l'autre. Au niveau de la jonction ostéochondrale, les vecteurs des interactions peuvent être de plusieurs types. Des zones de contact direct entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral existent, des microfissures peuvent se former à l'interface de ces deux tissus et des chenaux vasculaires provenant de l'os sous-chondral peuvent s'introduire dans le cartilage calcifié et former une voie de passage.

1.2.1. Les contacts directs

La jonction ostéochondrale se révèle être une zone plus complexe que celle décrite jusqu'à présent. La tidemark, qui délimite une frontière entre le cartilage articulaire non calcifié et le cartilage calcifié, ne constitue pas une ligne droite mais plutôt une structure tridimensionnelle complexe qui suit les prolongements du cartilage non calcifié. Ainsi, il a pu être observé dans un contexte physiologique, que des portions de cartilage non calcifié plongeaient fréquemment au travers du cartilage calcifié pour atteindre l'os et ses cavités médullaires (Lyons et al. 2006). Ces zones de contact direct entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral et sa moelle osseuse augmentent la diffusion de fluides entre les deux compartiments et pourraient participer à la nutrition du cartilage et à son métabolisme (**Figure 30**).

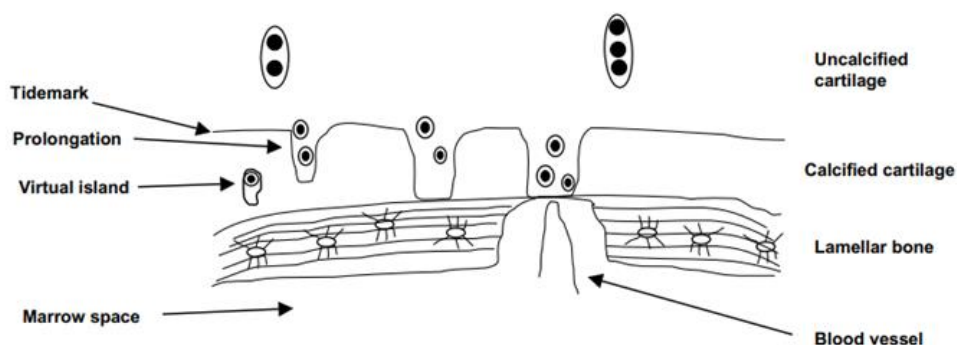


Figure 30. Représentation de la jonction ostéochondrale avec des zones de contacts entre le cartilage et l'os sous-chondral. D'après (Lyons et al. 2006)

1.2.2. Les microfissures

Les microfissures représentent une séparation physique de la matrice minéralisée à un niveau microscopique. D'une largeur moyenne d'environ 50 à 100 μm , en coupe transversale, et d'une longueur de 200 à 400 μm (Mohsin, O'Brien, et Lee 2006), les microfissures restent difficiles à visualiser en microscopie et nécessitent des techniques invasives. Les microfissures peuvent survenir dans l'os trabéculaire, la plaque corticale sous-chondrale et dans le cartilage calcifié. La présence de microfissures a été montrée dans le cartilage calcifié de personnes âgées et de patients arthrosiques alors qu'elles ne sont que pas décrites chez des individus jeunes et sains (S. Mori, Harruff, et Burr 1993; Sokoloff 1993). L'apparition de microfissures au cours du vieillissement des articulations et/ou dans un contexte arthrosique suggère que les microfissures sont liées aux contraintes mécaniques excessives subies par l'articulation (David B. Burr et Radin 2003) et seraient des sites d'initiation du remodelage osseux (**Figure 31**) (S. Mori, Harruff, et Burr 1993; Verborgt, Gibson, et Schaffler 2000).

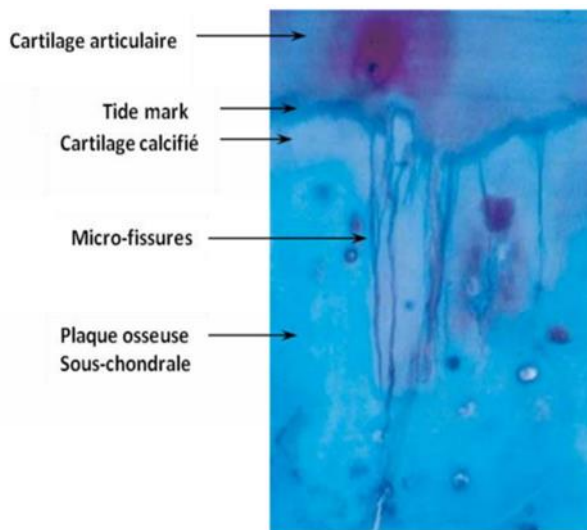


Figure 31. Microfissures à la jonction ostéochondrale. Coupe histologique du cartilage mettant en évidence la présence de microfissures traversant le cartilage calcifié. D'après (Sokoloff 1993)

1.2.3. Les chenaux vasculaires ou *resorption pits*

En 1953, Trueta et Harrison décrivaient l'anatomie vasculaire de la tête fémorale humaine saine et ont observé la présence de chenaux vasculaires provenant de l'os sous-chondral en contact avec la partie profonde du cartilage calcifié (Trueta et Harrison 1953). La plaque sous-chondrale et les chenaux vasculaires la traversant ont été davantage décrits par Clark à partir de prélèvements de genoux et de hanches de cadavres humains, de chiens et de lapins (Clark 1990). Ces chenaux vasculaires forment un cylindre étroit de 10 à 30 μm de diamètre, s'étendent dans toutes les directions et contiennent un à deux vaisseaux sanguins. Les chenaux sont entourés

par des lamelles concentriques d'os, formant une gaine autour du chenal vasculaire (**Figure 32**). Néanmoins, certains chenaux sont décrits comme étant « ouvert » à leur extrémité, le vaisseau sanguin faisant ainsi face à une cavité au sein du cartilage calcifié, contenant des cellules non vasculaires (Clark 1990). Ces structures s'apparentent aux canaux de Havers que l'on retrouve au niveau des ostéons de l'os cortical (Sims et Martin 2014).

Les chenaux vasculaires participent à l'apport de nutriments de l'os vers le cartilage articulaire (Malinin et Ouellette 2000) où près de 50% du glucose, de l'oxygène et des besoins en eau sont fournis par la vascularisation ostéocondrale (Imhof et al. 2000). Lane *et al.* ont montré que les chenaux vasculaires se concentraient dans les zones de fortes contraintes mécaniques et ont constaté que la vascularisation sous-chondrale de la tête fémorale augmentait autour de 60-70 ans (Lane, Villacin, et Bullough 1977). Harrison *et al.* ont également observés une augmentation de la vascularisation fémorale chez des patients arthrosiques (Harrison, Schajowicz, et Trueta 1953). Ces données suggèrent un lien entre le stress mécanique et l'augmentation des communications entre l'os et le cartilage ainsi que le rôle de la vascularisation du cartilage dans la prévalence de l'arthrose.

Shibakawa *et al.* utilisent le terme de « *resorption pits* » pour évoquer les chenaux vasculaires. En effet, les chenaux vasculaires contiennent divers types cellulaires mononucléés et polynucléés qui expriment de nombreux facteurs comme la vimentine, la chaîne α du récepteur de la vitronectine (VNR- α), les MMP-1, MMP-3, MMP-13, BMP-2 et BMP-4. Des ostéoclastes, cellules polynucléaires positives pour le marquage TRAP et exprimant le VNR- α , sont présents à la surface interne des *resorption pits*, et expriment des métalloprotéases. Des cellules d'origine mésenchymateuse, positives à la vimentine, sont également présentes, expriment BMP2 et BMP4 et pourraient constituer des précurseurs ostéoblastiques. Les ostéoclastes présents participeraient au remodelage de la matrice osseuse et cartilagineuse et par conséquent à la progression des chenaux vasculaires dans le cartilage. De plus, des terminaisons nerveuses et des cellules adipeux sont présentes dans ces structures (Shibakawa et al. 2005).

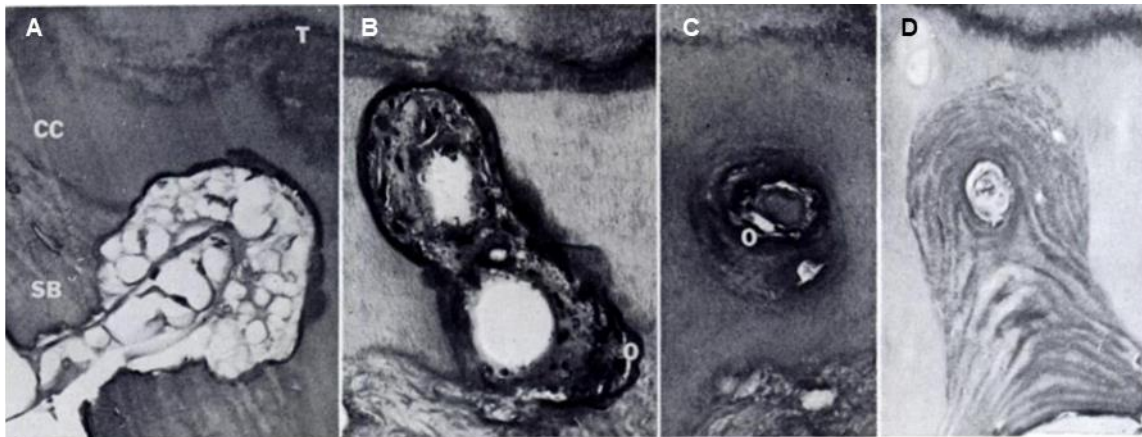


Figure 32. Chenaux vasculaires à la jonction ostéocondrale. Photographies mettant en évidence des chenaux vasculaires à différentes phases de résorption. (A) Phase résorptive. Les chenaux vasculaires sont dits « actifs » et pénètrent le cartilage calcifié. (B) Phase de synthèse osseuse. Présence d'un chenal vasculaire dans le cartilage calcifié, entouré par des ostéoblastes. (C) Phase de synthèse osseuse. Présence d'un chenal vasculaire dans le cartilage calcifié, dans une structure d'ostéon. (D) Phase inactive. Présence d'un chenal vasculaire entourés par du tissu osseux mature. D'après (Lane et Bullough 1980)

2. Réactivation pathologique de l'ossification endochondrale au cours de l'arthrose

2.1. L'angiogenèse ostéocondrale au cours de l'arthrose

2.1.1. Implication de l'angiogenèse ostéocondrale dans l'arthrose humaine

Le cartilage arthrosique est le siège d'une invasion vasculaire. En effet, les chenaux vasculaires ou *resorption pits* présents dans l'os sous-chondral et le cartilage calcifié en condition physiologique, dépassent la tidemark et envahissent le cartilage articulaire dans un contexte arthrosique. Le cartilage arthrosique perdrait alors sa capacité de résistance à l'invasion vasculaire (Fenwick, Gregg, et Rooney 1999). La vascularisation ostéocondrale devient donc pathologique et participe aux processus de dégradation de la matrice du cartilage (**Figure 33**). Shibakawa *et al.* ont observé une perte de la coloration Safranine-O autour des chenaux vasculaires qui pénètrent le cartilage articulaire arthrosique, indiquant une perte des protéoglycanes et donc une dégradation de la matrice extracellulaire (Shibakawa et al. 2005). La perte des propriétés avasculaires du cartilage arthrosique a été étudié dans un modèle *in vivo* de membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet par Fenwick *et al.*, où une perte du contenu en protéoglycanes et le dépôt de collagène de type X sont observées en présence d'un système vasculaire actif à proximité (Fenwick, Gregg, et Rooney 1999). Les prélèvements de

cartilage sains ne sont pas envahis par les vaisseaux sanguins de la membrane chorioallantoïdienne, indiquant que la perte des propriétés avasculaires du cartilage est à l'origine de l'invasion vasculaire des prélèvements arthrosiques. Enfin, il a été démontré que la densité de chenaux vasculaires traversant la tidemark étaient corrélée positivement à la sévérité de l'arthrose (Shibakawa et al. 2005). Dans une étude centrée sur l'angiogenèse de la membrane synoviale et de la jonction ostéochondrale dans un contexte arthrosique, Walsh *et al.* ont constaté que 60% des patients présentaient une vascularisation du cartilage articulaire, contre seulement 20% des individus contrôles. Ils ont également montré que la densité des chenaux vasculaires à la jonction ostéochondrale augmentait avec la sévérité des atteintes du cartilage et du score clinique de l'arthrose. En revanche, aucune corrélation entre l'angiogenèse de la jonction ostéochondrale et l'angiogenèse synoviale n'a été décelée. Ces deux mécanismes pathologiques sont donc indépendants l'un de l'autre.

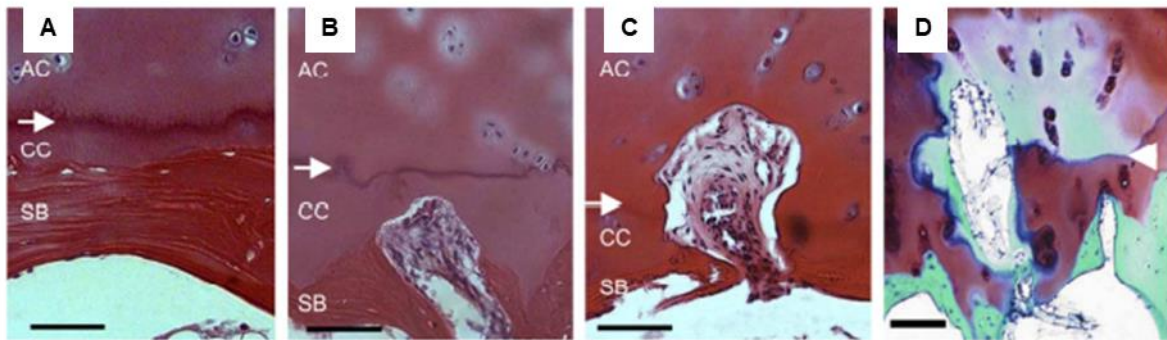


Figure 33. Mise en évidence du rôle des chenaux vasculaires dans la dégradation du cartilage. Coupes histologiques de cartilage sains et arthrosiques. (A) Jonction ostéochondrale saine ne présentant pas de chenaux vasculaires. (B) Jonction ostéochondrale saine présentant un chenal vasculaire dans le cartilage calcifié, mais n'atteignant pas la tidemark. (C) Jonction ostéochondrale arthrosique montrant la présence d'un chenal vasculaire qui traverse la tidemark et qui atteint le cartilage articulaire. (D) L'invasion du cartilage articulaire est associée à une dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage, visible par une perte de la coloration rouge des protéoglycanes. D'après (Shibakawa et al. 2005)

Zhang *et al.* ont étudié le niveau d'expression de nombreuses cytokines et protéines liées à l'angiogenèse et ont ainsi pu démontrer une régulation à la hausse de facteurs pro-angiogéniques et une régulation à la baisse de facteurs anti-angiogéniques par le cartilage arthrosique. En effet, à un stade avancé d'arthrose, l'expression des protéines pro-angiogéniques (VEGFA, PDGF AA, TGF- α), de leurs récepteurs (VEGFR2, VEGFR3, PDGFR α , NGFR), d'interleukines (IL-1 β , Il-6, TNF- α), de chimiokines (SDF-1 β , IP-10), de molécules d'adhérence (PECAM-1, VE-cadhérine) et de MMP (MMP-9, MMP-13) est significativement augmentée alors que l'expression de facteurs anti-angiogéniques, comme la

chondromoduline-1, les thrombospondines, l'angiopoïétine-like 4 et les TIMP1-2 est significativement diminuée (X. Zhang et al. 2016; Xufang Zhang, Crawford, et Xiao 2016). Ainsi, le cartilage arthrosique est le siège d'un déséquilibre de la balance angiogénique qui pourrait expliquer l'apparition de structures vasculaires dans ce tissu, qui à l'état physiologique en est dépourvu.

Le VEGF constitue le médiateur de l'angiogenèse le plus étudié, et est responsable de l'angiogenèse de nombreux tissus et organes. Il a notamment été impliqué dans la vascularisation de la plaque de croissance, au cours de l'ossification endochondrale (Y.-Q. Yang et al. 2012). Les chondrocytes expriment le VEGF en réponse à l'hypoxie et le facteur HIF-1 α , sous l'effet d'un stress mécanique de compression ou de cisaillement, à des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-17, TNF- α), du stress oxydant (monoxyde d'azote, ROS) (M. Murata, Yudoh, et Masuko 2008). L'activation des voies de signalisation de l'angiogenèse conduit à l'expression de médiateurs cataboliques entraînant la dégradation de la matrice du cartilage ainsi que la formation d'ostéophytes.

Bien qu'avasculaire, le cartilage sain est une source de VEGF, qu'il soit soluble (isoformes 121 et 165 du VEGF) ou matriciel (isoforme 189), comme le cartilage arthrosique. Cependant, les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 du VEGF ne sont retrouvés que dans le cartilage arthrosique (Enomoto et al. 2003; Pfander, Körtje, et al. 2001; T. Pufe et al. 2001). Une augmentation du nombre de chondrocytes VEGF⁺ est observée dans les stades tardifs d'arthrose (Pfander, Körtje, et al. 2001). Enomoto *et al.* ont montré que des explants de cartilage arthrosique libéraient 3 fois plus de VEGF que des explants de cartilage sain et que la stimulation des chondrocytes arthrosiques par le VEGF entraînait l'expression de MMP-1 et MMP-3. Ainsi, le VEGF exercerait également un rôle catabolique (Enomoto et al. 2003). Pufe *et al.* ont confirmé ce rôle catabolique en montrant que le VEGF induisait la sécrétion de MMP-1, MMP-3 et MMP-13 et diminuait l'expression de TIMP-1 et TIMP-2, par des chondrocytes immortalisés (Thomas Pufe, Harde, et al. 2004).

Les chenaux vasculaires contiennent des vaisseaux sanguins mais également des fibres nerveuses sensorielles et sympathiques (Suri et al. 2007). Ces fibres nerveuses expriment le facteur de croissance NGF, suggérant un lien entre l'angiogenèse ostéochondrale et la douleur associée à l'arthrose (Walsh et al. 2010). De plus, Bonnet et Walsh ont montré que l'inflammation et l'angiogenèse s'entretenaient mutuellement au sein des tissus de l'articulation arthrosique (Bonnet et Walsh 2005).

Les chenaux vasculaires assurent la communication entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral en permettant le passage de signaux d'un tissu à l'autre. L'apparition de ces structures dans le cartilage articulaire pourrait contribuer à la dégradation du cartilage et à sa minéralisation, en favorisant le passage de molécules inflammatoires et cataboliques produites par l'os sous-chondral arthrosique, qui auraient un effet délétère sur le cartilage.

2.1.2. Implication de l'angiogenèse ostéocondrale dans des modèles animaux d'arthrose

La vascularisation du cartilage est également observée dans des modèles animaux d'arthrose. Pan *et al.* ont analysé la vascularisation de la jonction ostéocondrale dans deux modèles murins d'arthrose et ont constaté une augmentation du nombre de vaisseaux dans le cartilage calcifié, à proximité de la tidemark de 100% dans le modèle d'arthrose liée au vieillissement et de 50% et dans le modèle d'arthrose post-traumatique de déstabilisation du ménisque médial (DMM), par rapport à des souris contrôles (Pan et al. 2012).

Dans un autre modèle d'arthrose post-traumatique de transection du ménisque médial chez le rat (Mapp et al. 2008), une angiogenèse ostéocondrale et synoviale est observée, comparables aux observations faites dans la gonarthrose de patients (Walsh et al. 2007b). Ces modifications de la jonction ostéocondrale et de la membrane synoviale ont lieu à des stades précoces du développement de l'arthrose, suggérant que l'angiogenèse pourrait contribuer à l'initiation de la pathologie.

Cela a été confirmé par Saito *et al.* qui ont évalué l'activité angiogénique de l'os sous-chondral, du cartilage et de la membrane synoviale au cours de la progression de l'arthrose dans un modèle de transection des ligaments croisés antérieurs (ACLT) chez le lapin. L'activité angiogénique de l'os sous-chondral atteint un pic maximal dans le stade précoce à intermédiaire d'arthrose et diminue ensuite à un niveau normal dans les stades tardifs de l'arthrose. L'activité angiogénique du cartilage n'a pas montré de variation au cours de la progression de l'arthrose. Ainsi, l'augmentation de l'invasion vasculaire ayant été décelée suite à l'augmentation de l'activité angiogénique osseuse au stade intermédiaire de la pathologie, suggère un rôle de l'os sous-chondral dans la vascularisation ostéocondrale (M. Saito et al. 2012).

La chondromoduline-1 est un facteur anti-angiogénique fortement exprimé dans le cartilage articulaire sain et est impliquée dans le maintien des propriétés avasculaires du cartilage. Son expression diminue dans le cartilage arthrosique de rat, tandis que l'expression

du VEGF, de la MMP-9 et MMP-13 augmente. Ces résultats suggèrent que la perte de la ChM-1 dans les couches profondes du cartilage pourrait être en partie à l'origine de l'invasion vasculaire observée au cours de l'arthrose (Hayami et al. 2003).

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

Des thérapies ciblant l'angiogenèse pourraient réduire les symptômes associés à l'arthrose et limiter la sévérité des lésions des différents tissus arthrosiques. Différentes stratégies thérapeutiques ont permis de mieux comprendre les mécanismes de l'angiogenèse ostéochondrale et pourrait contribuer au développement de moyens thérapeutiques ciblés. Hamilton *et al.* ont recensé différentes études ciblant spécifiquement le VEGF mais également d'autres facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques dans des modèles animaux d'arthrose, de polyarthrite rhumatoïde, d'atteintes ostéochondrales ou uniquement des atteintes du cartilage (Hamilton et al. 2016). Parmi ces études, nous nous sommes particulièrement intéressés à celles inhibant le VEGF, les facteurs angiostatiques comme la TSP-1 et la chondromoduline-1. L'inhibition du TGF- β sera également abordée.

a. Inhibiteurs du VEGF

L'utilisation de Bevacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, dans le traitement de l'arthrose post-traumatique induite par transection des ligaments croisés antérieurs chez le lapin a montré d'importantes améliorations au niveau de l'articulation lésée. En effet, l'administration par voie intraveineuse de Bevacizumab réduit significativement la dégradation du cartilage articulaire, la formation d'ostéophytes, l'inflammation de la membrane synoviale et de la douleur associée à ces différentes lésions (Nagai et al. 2014). Les lapins traités par le Bevacizumab présentent une diminution d'expression de gènes cataboliques par la membrane synoviale (MMP-13, ADAMTS-5), une diminution d'expression de Runx2 au niveau de l'os sous-chondral ainsi que qu'une augmentation d'expression de l'agrécan, du collagène de type II et de la chondromoduline-1 par les chondrocytes du cartilage articulaire, par rapports aux lapins non traités. L'administration du Bevacizumab localement, par voie intra-articulaire, présente les mêmes bénéfices sur la membrane synoviale, le cartilage et l'os sous-chondral et réduit également la douleur. De plus, la plus faible dose administrée en intra-articulaire se révèle être plus efficace que la plus forte dose utilisée en intra-veineuse.

D'autres équipes ont également montré les bénéfices du Bevacizumab. L'anticorps monoclonal administré en intra-articulaire chez le lapin diminue fortement l'inflammation de la membrane synoviale. Une réduction de l'angiogenèse et l'hyperplasie synoviale sont observés ainsi qu'une diminution d'expression de VEGF et de MMP-1 dans le cartilage (W. Li et al. 2019a). Plus récemment, l'administration de Bevacizumab a permis de réduire la dégradation du cartilage et les changements de la membrane synoviale liées à l'arthrose. L'administration intra-articulaire chez le lapin induit une diminution d'expression de MMP-13 au niveau du cartilage, et une augmentation de la production de collagène de type II et d'agrécans (Vadalà et al. 2014).

L'utilisation d'un récepteur-leurre se liant au VEGF a également permis de réduire la progression de l'arthrose dans un modèle de rat arthrosique (Matsumoto et al. 2009). En effet, la transplantation de cellules souches musculaires exprimant le récepteur soluble du VEGF, sFlt-1, ainsi que BMP-4, directement dans l'articulation limitent la formation d'ostéophytes et prévient la dégradation du cartilage. Des effets bénéfiques sur la chondrogenèse ont également été démontrés.

L'inhibition du VEGF par un lentivirus (VEGF small hairpin RNA, shRNA) administré directement dans l'articulation retarde la progression de l'arthrose dans un modèle de rat arthrosique. L'utilisation du lentivirus augmente la différenciation chondrogénique et protège les chondrocytes de l'hypertrophie induite par le TNF- α (Xufang Zhang, Crawford, et Xiao 2016).

b. Facteurs anti-angiogéniques

La thrombospondine-1 est une glycoprotéine présente dans les articulations, où elle est exprimée et produite par les chondrocytes. La TSP-1 est un inhibiteur de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales et favorise l'apoptose de ces cellules (Paul Bornstein 2009). Le niveau d'expression de la TSP-1 est significativement diminué dans le cartilage à un stade avancé d'arthrose (Pfander et al. 2000). Cette glycoprotéine inhibe la signalisation du VEGF en se liant directement au facteur angiogénique, en rentrant en compétition avec lui pour les sites de liaison des protéoglycanes à héparane sulfate et en interagissant avec le récepteur CD47 (Gupta et al. 1999; Kaur et al. 2010). L'injection intra-articulaire d'un vecteur adénoviral codant la TSP-1 (AdTSP-1) entraîne une diminution de la dégradation du cartilage, de la formation d'ostéophytes, de la densité des vaisseaux synoviaux et de l'inflammation de la membrane synoviale, dans un modèle d'arthrose chez le rat (Hsieh et al. 2010).

La chondromoduline-1 est une glycoprotéine présente dans le cartilage, qui régule l'invasion vasculaire du cartilage au cours de l'ossification endochondrale (Shukunami et al. 1999). Une étude dans un modèle d'arthrose a démontré que l'invasion vasculaire du cartilage arthrosique avait lieu au niveau sites présentant une diminution de ChM-1 et une augmentation de VEGF (Hayami et al. 2003). L'injection intra-articulaire d'un lentivirus (LV-ChM-1) retarde la progression de l'arthrose, en inhibant l'activité catabolique assurée par HIF-2 α (X. Zhang et al. 2016).

c. Inhibition du TGF- β

Zhen *et al.* ont montré que une augmentation des niveaux de TGF- β 1 dans l'os sous-chondral de souris arthrosiques. Ces concentrations élevées de TGF- β 1 entraînent la formation de clusters de cellules mésenchymateuses nestine⁺ et une synthèse accrue osseuse qui conduira à une sclérose de l'os (Zhen et al. 2013). L'inhibition de la signalisation du TGF- β 1 chez des souris KO pour le récepteur de type II du TGF- β spécifiquement au niveau des cellules mésenchymateuses nestine⁺ réduit le développement de l'arthrose.

Cui *et al.* se sont intéressés aux effets de l'halofuginone dans la progression de l'arthrose et la formation des vaisseaux H. Ils ont ainsi démontré que ce composé atténuait la dégradation du cartilage et les dommages de l'os sous-chondral. La perte des protéoglycanes et la calcification du cartilage étaient significativement réduites par l'halofuginone, suite à l'induction d'une arthrose post-traumatique par ACLT chez le rat. L'halofuginone diminue également l'expression de collagène de type X, de MMP-13 et d'ADAMTS-5 et augmente celle de l'agrécane, du collagène de type II et de la lubricine. Les auteurs ont mis en évidence que le blocage de l'angiogenèse des vaisseaux H était à l'origine des améliorations de l'halofuginone sur la progression de l'arthrose (Z. Cui et al. 2016).

Ainsi, ces différentes études démontrent les bénéfices de la mise en place d'une stratégie thérapeutique visant l'angiogenèse sur les différents tissus de l'articulation.

2.2. L'ostéoclastogenèse au cours de l'arthrose

L'invasion des chenaux vasculaires dans la matrice du cartilage calcifié et du cartilage articulaire nécessitent une résorption matricielle. De manière intéressante, les chenaux vasculaires présentent des similarités avec les structures responsables du remodelage de l'os cortical. Ainsi, les chenaux vasculaires contiennent des cellules chargées de résorber les

matrices, des vaisseaux sanguins qui permettent le passage de molécules, entourés par des ostéoblastes qui synthétisent une matrice osseuse.

Les chondrocytes du cartilage pourraient donc interagir avec les cellules contenues dans les chenaux vasculaires, afin de favoriser l'angiogenèse ostéochondrale. Ainsi, un dialogue entre chondrocytes et ostéoclastes serait un prérequis pour l'invasion vasculaire du cartilage.

2.2.1. Communication entre chondrocytes et ostéoclastes au cours de l'arthrose

La communication entre chondrocytes et ostéoclastes est principalement assurée par des médiateurs biochimiques qui diffusent de l'os sous-chondral vers le cartilage, ou inversement, par les zones de contacts direct entre ces deux tissus, les microfissures ou les chenaux vasculaires (**Figure 34**). Au cours de l'ossification endochondrale, les précurseurs des ostéoclastes sont recrutés dans la zone hypertrophique de la plaque de croissance par les vaisseaux du péri-chondre et participent au remodelage de la matrice du cartilage et à la formation du centre d'ossification primaire. Les ostéoblastes mais également les chondrocytes régulent la différenciation des ostéoclastes par le complexe RANKL/OPG (B. Wang et al. 2015). Dans la polyarthrite rhumatoïde, il a été décrit, grâce à une technique de tracking *in vivo* des précurseurs des ostéoclastes CX3CR1⁺, que les pré-ostéoclastes parvenaient jusqu'au cartilage inflammatoire par les vaisseaux sanguins, se différenciaient en ostéoclastes matures et favorisaient la destruction du cartilage (Hasegawa et al. 2019). De plus, des données récentes ont mis en évidence la capacité qu'ont les ostéoclastes à dégrader les différents tissus de la jonction ostéochondrale, l'os sous-chondral et le cartilage calcifié, mais également le cartilage articulaire via des processus dépendant du type de matrice à résorber (Löfvall et al. 2018).

a. Régulation des chondrocytes par les ostéoclastes

Les facteurs de croissance, libérés suite à la résorption de la matrice osseuse, régulent le métabolisme des chondrocytes et participent à la dégradation du cartilage. Zhang *et al.* ont constaté que l'expression du TGFβ1 par les ostéoclastes était augmentée suite à un stress mécanique. De plus, ils ont observé une surmortalité des chondrocytes par apoptose, suite à une co-culture avec des ostéoclastes (R.-K. Zhang et al. 2018). Ainsi, le TGFβ1 provenant de l'os sous-chondral pourrait diffuser jusqu'au cartilage ou être transporté via les vaisseaux sanguins et affecter le métabolisme des chondrocytes. L'IGF-1, également libéré par l'os, pourrait jouer un rôle chondroprotecteur. L'IGF-1 favorise l'expression de Col2a1 et inhibe l'expression et

l'activité de la MMP-13 dans un modèle de chondrocytes de rat (M. Zhang et al. 2009). Le cartilage arthrosique accumule également des ions calcium et phosphates provenant de l'os sous-chondral et forment un complexe qui favorise la production de MMP-13 par les chondrocytes (Jung et al. 2018). Les pré-ostéoclastes et ostéoclastes matures favorisent également l'hypertrophie des chondrocytes via la formation d'exosomes (J. Dai et al. 2020).

b. Régulation des ostéoclastes par les chondrocytes

Les cellules de l'os sous-chondral peuvent être exposées aux cytokines pro-inflammatoires produites par les chondrocytes arthrosiques. Des contraintes mécaniques entraînent une augmentation d'expression de l'IL-1 β par des chondrocytes en culture primaire (Fujisawa et al. 1999). La production d'IL-1 β conduit à l'expression de RANKL par les ostéoblastes et induit donc indirectement la formation des ostéoclastes (J. Dai et al. 2020). Une production excessive de TNF- α et d'IL-6 a été détectée au niveau des chondrocytes, dans un modèle d'arthrose de déstabilisation du ménisque médial (Pearson et al. 2017). Le TNF- α induit la différenciation des ostéoclastes en activant NF- κ B et la protéine c-Jun (K. Kobayashi et al. 2000), mais également en stimulant l'expression de RANKL par les ostéoblastes (Lam et al. 2000). L'application d'un stress mécanique au niveau de l'articulation temporo-mandibulaire entraîne une augmentation du nombre de chondrocytes VEGF⁺ et RANKL⁺ dans le cartilage calcifié. En parallèle, le nombre d'ostéoclastes TRAP⁺ augmente dans la plaque sous-chondrale située juste sous la couche de cartilage calcifié (Tanaka et al. 2005). De plus, à l'aide d'un test de chimiotactisme dans un système de « chambre de Boyden », RANKL et VEGF favorisent la migration et attirent les ostéoclastes, via la phosphorylation de ERK1/2 (Henriksen et al. 2003). HMGB1 est exprimée par les chondrocytes arthrosiques et est détectée autour des chondrocytes *in vivo* (Aulin et al. 2020). Le développement osseux de souris déficientes pour HMGB1 spécifiquement dans les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance montre une interruption du processus d'ossification endochondrale due à un retard dans l'invasion de précurseurs des ostéoclastes, au niveau du centre primaire d'ossification (Taniguchi et al. 2007). La présence de chondrocytes présentant des caractéristiques de cellules apoptotiques dans le cartilage arthrosique est associée à la sévérité de l'arthrose (Musumeci et al. 2011).

Ainsi, la mise en évidence d'interactions fonctionnelles entre les chondrocytes et les ostéoclastes de l'os sous-chondral suggère un rôle des chondrocytes dans la résorption requise à l'invasion vasculaire.

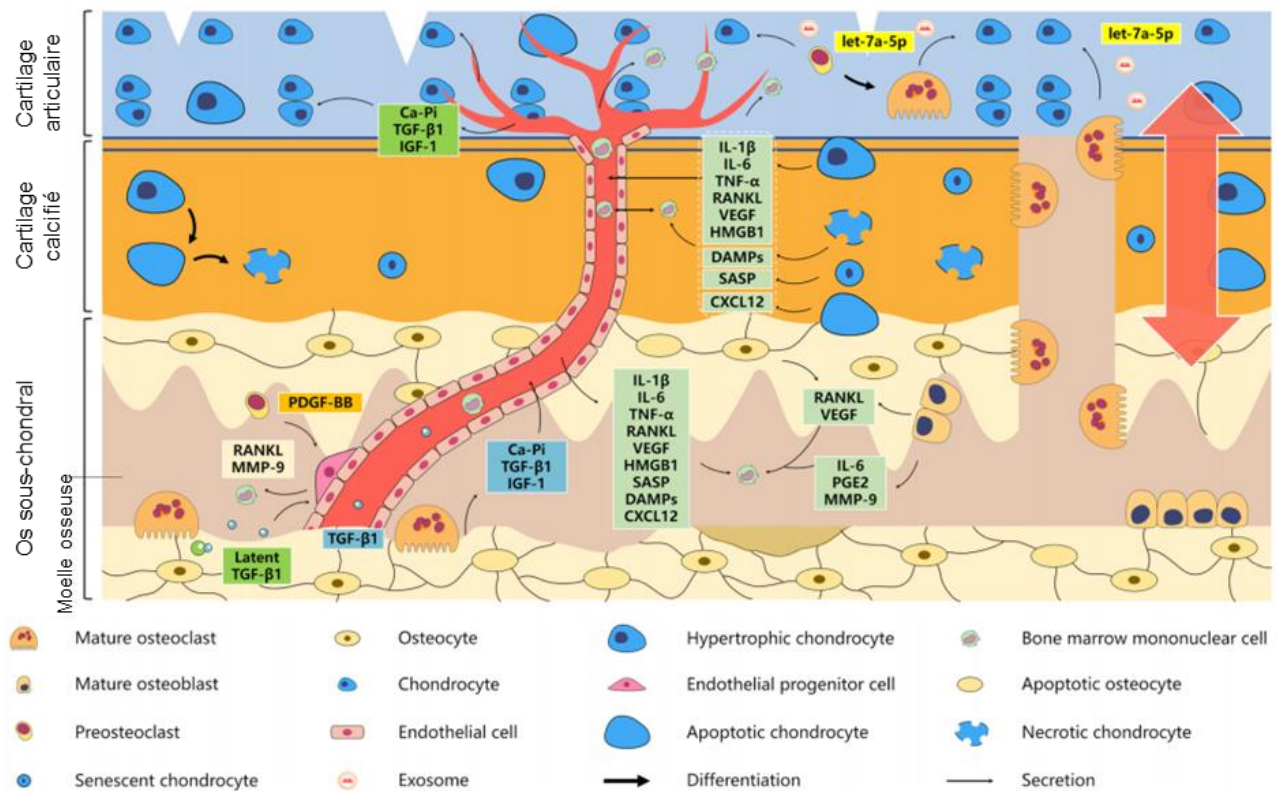


Figure 34. Communication entre les chondrocytes et les ostéoclastes dans un contexte d'arthrose. De multiples facteurs sont produits au niveau de l'os sous-chondral et transitent jusqu'au cartilage articulaire par les chenaux vasculaires, où ils réguleront le métabolisme des chondrocytes. D'après (W. Hu et al. 2020)

HYPOTHESE DE TRAVAIL

Nous pensons que la différenciation des chondrocytes en profondeur du cartilage, les chondrocytes pré-hypertrophiques en chondrocytes hypertrophiques, qui a lieu au cours de l'arthrose, pourrait jouer un rôle orchestrateur dans le remodelage de la jonction ostéochondrale, et notamment la vascularisation du cartilage.

En effet, le rôle de la différenciation hypertrophique des chondrocytes a été démontré dans l'invasion vasculaire de la plaque de croissance au cours de l'ossification endochondrale. Au cours de l'arthrose, on observe différents évènements analogues à ceux décrit dans ce processus. Ainsi, la dégradation et la minéralisation du cartilage, la différenciation hypertrophique des chondrocytes et la vascularisation du cartilage résulteraient d'une réactivation du processus d'ossification endochondrale.

A ce jour, peu d'étude se sont intéressées au lien pouvant exister entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes et l'angiogenèse ostéochondrale au cours de l'arthrose. Pesesse *et al.* ont évalué la capacité angiogénique de chondrocytes hypertrophiques de patients arthrosiques et ont montré une stimulation de la migration et de l'adhérence de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques arthrosiques. Les auteurs ont mis en évidence des facteurs angiogéniques, comme la BSP, comme étant à l'origine des effets pro-angiogéniques des chondrocytes.

OBJECTIFS

Le remodelage de la jonction ostéochondrale dont fait partie l'angiogenèse ostéochondrale pourrait jouer un rôle central dans la progression de l'arthrose, cependant les acteurs moléculaires responsables de la vascularisation du cartilage sont encore méconnus.

Nous pensons que la différenciation des chondrocytes de la couche profonde du cartilage, les chondrocytes pré-hypertrophiques, en chondrocytes hypertrophiques pourrait contribuer au remodelage de la jonction ostéochondrale.

Ainsi les objectifs de ce travail de thèse ont été :

- De montrer que le ciblage de l'angiogenèse ostéochondrale limite la progression de l'arthrose dans un modèle d'arthrose post-traumatique chez le rat.

- D'étudier le potentiel angiogénique et ostéoclastogénique de chondrocytes pré-hypertrophiques et de chondrocytes hypertrophiques, issus d'un nouveau modèle de différenciation progressive de chondrocytes, développé au sein du laboratoire.

- D'évaluer et de comparer le rôle biologique de ces chondrocytes à l'aide de différents tests fonctionnels d'ostéoclastogenèse et d'angiogenèse.

- D'identifier les molécules impliquées dans la différenciation hypertrophiques des chondrocytes, l'angiogenèse et le remodelage de la jonction ostéochondrale, afin de les cibler spécifiquement.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS D'ETUDE

1. Collection et préparation des prélèvements de tissus humains arthrosiques

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

1.1. Inclusion des patients

Les prélèvements de genoux humains arthrosiques proviennent de patients, homme ou femme de tout âge, opérés pour une pose de prothèse totale de genou (PTG) dans le cadre d'une gonarthrose symptomatique dans le service d'orthopédie de l'hôpital Saint-Antoine (AP-HP) et à la clinique des Maussins-Nollet (Paris). Les patients ont apporté leur consentement écrit la veille de l'opération après avoir été informés sur l'utilisation des tissus recueillis et les objectifs de l'équipe de recherche.

1.2. Dissection des tissus et préparation des échantillons

Les prélèvements sont conservés dans du phosphate-buffered saline (PBS) à 4°C, jusqu'à récupération et utilisation, généralement le lendemain de l'intervention chirurgicale. Différents tissus sont récoltés par le chirurgien : les plateaux tibiaux médial et latéral, les condyles fémoraux médial et latéral, les ménisques médial et latéral, de la membrane synoviale, du tissu adipeux de Hoffa. Le recueil de ces échantillons de patients arthrosiques alimente la biobanque « BioJoint » de notre équipe de recherche.

Pour les analyses biochimiques, les tissus osseux et cartilagineux provenant des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux sont disséqués et incubés dans du milieu RPMI1640 sans rouge phénol (Sigma-Aldrich), supplémenté en pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL) (PS) à 6 mL de milieu par gramme de tissu frais, pendant 24h à 37°C. Au bout de 24h, les tissus sont congelés à -80°C et les surnageant sont centrifugés (3000 g pendant 3 minutes), aliquotés puis conservés à -80°C.

Des carottes histologiques d'un diamètre de 8 mm sont également effectuées au centre des quatre compartiments ostéo-cartilagineux (plateau tibiaux et condyle fémoraux, médial et latéral) afin de recueillir pour chacun une couche de cartilage articulaire, de cartilage calcifié et

d'os sous-chondral (**Figure 35**). Les tissus sont fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 3,7% (dilution dans du PBS) pendant 24h puis décalcifiés dans une solution d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (VWR, 20302.293) à 14% (dilution dans de l'eau) ajustée à un pH 7,4, pendant 4 à 6 semaines à 4°C. Les bains d'EDTA sont changés tous les deux jours, jusqu'à décalcification complète des tissus. La décalcification est jugée totale lorsque les parties osseuse et cartilagineuse du prélèvement sont mous. Les prélèvements sont conservés dans une solution d'éthanol 70% (dilution dans de l'eau) jusqu'à leur inclusion en paraffine. Des coupes d'une épaisseur de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome à rotation Leica RM2135 (Leica Biosystems) selon l'axe frontal des échantillons, afin d'obtenir des coupes comprenant le cartilage articulaire, calcifié et l'os sous-chondral. Les lames sont séchées à 37°C pendant 24h puis conservés à température ambiante et à l'obscurité.

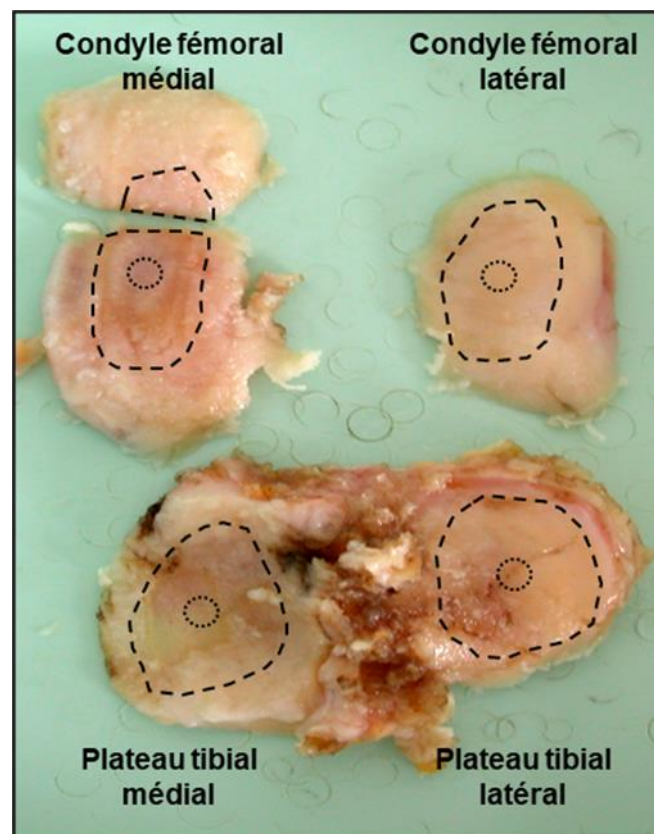


Figure 35. Prélèvements d'un genou humain arthrosique issu d'un patient opéré pour une pose de prothèse totale du genou (PTG). Des tissus osseux et cartilagineux des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux sont récupérés pour effectuer des analyses biochimiques. Des carottes au centre de chaque compartiment sont réalisées pour effectuer des analyses histologiques.

2. Induction de l'arthrose chez le rat et injection d'une molécule anti-angiogénique

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

2.1. Conditions d'hébergement des animaux

Dans cette étude, le modèle expérimental utilisé est le rat (*Rattus norvegicus*) adulte mâle âgé de 10 semaines, provenant de chez Charles River France. Les animaux sont hébergés au sein de la plateforme d'hébergement et d'expérimentation animale (PHEA) du centre de recherche Saint-Antoine et une période d'acclimatation d'une semaine est effectuée avant utilisation des animaux. Les animaux sont hébergés dans les conditions standard A1 EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) du CRSA (autoclave et sas chimique en barrière) avec :

- Hébergement en portoirs ventilés en pression positive (2-4 rats/cage)
- Salle d'hébergement en surpression
- Cycle nyctémère de 12h (8h-20h jour/20h-8h nuit)
- Hygrométrie de 55% (+/- 10%)
- Température comprise entre 20°C et 24°C
- Change litière/abreuvement/nourriture deux fois par semaine et vérification quotidienne par les techniciens de la PHEA
- Enrichissement du milieu : briquette en bois et/ou sopalin

2.2. Modèle d'arthrose post-traumatique

Le modèle d'induction de l'arthrose utilisé dans cette étude est le modèle de déstabilisation du ménisque médial (DMM) accompagné d'une ménisectomie partielle. Ce modèle d'arthrose de référence (Kadri et al. 2008; Kamekura et al. 2005) développé initialement chez la souris est classiquement utilisée chez le rat (Iijima et al. 2014). Il permet d'induire une arthrose post-traumatique dès 4 semaines post-chirurgie et consiste à déstabiliser le ménisque médial par section du ligament ménisco-tibial médial et par ménisectomie partielle. L'opération est réalisée sur les genoux droits de rats mâles âgés de 10 semaines. L'intervention

est pratiquée par un chirurgien orthopédique, habilité à pratiquer la chirurgie sur le petit animal. Cette procédure est classée comme modérée. Nous avons évalué l'arthrose induite 8 semaines post-chirurgie.

L'analgésie pré-opératoire est prise en charge par l'administration intra-péritonéale de buprénorphine (Buprecare®) (0,05mg/kg), une demi-heure avant l'intervention. Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'un mélange d'isoflurane (Aerane®, Baxter) dans l'air ambiant à 4% avec un débit de 300 mL/min pour induire l'anesthésie puis à 1,5-2,5% pour maintenir l'endormissement. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de réflexe de retrait suite au pincement des coussinets plantaires. La procédure est poursuivie uniquement quand l'animal est sous narcose profonde (absence de conscience, myorelaxation). Les animaux sont placés sur un tapis chauffant tout au long de l'anesthésie. La patte postérieure droite est rasée, désinfectée à l'alcool puis à la bétadine avant l'incision. L'intervention est effectuée sous microscope optique. L'incision cutanée est longitudinale, au bord médial du ligament patellaire dont le relief est visible à travers la peau. L'aileron patellaire médial est sectionné, ainsi qu'un millimètre du tenon quadricipital entre le vaste médial et le vaste intermédiaire. La rotule est luxée en externe, genou en extension.

La déstabilisation du ménisque médial est réalisée en sectionnant le ligament ménisco-tibial médial antérieur et le ligament collatéral médial. La ménisectomie partielle est réalisée en réséquant la partie antérieure du ménisque médial. La rotule est ensuite replacée dans sa position initiale, et sa stabilité est vérifiée en mobilisant l'articulation. Chez le rat, la rotule est instable et se reluxe lorsque le genou est en extension, des points de fils résorbable (PDS) sont donc ajoutés entre les deux chefs du quadriceps, au sommet de l'aileron patellaire médial. La peau est ensuite suturée par des points de fils résorbable d'Ethilon 5/0 (Ethicon) et une goutte de colle (SurgiBond Tissue Adhesive, IMS Global Medical) est déposée sur la suture pour terminer l'opération. Le genou gauche est laissé intact. Cette intervention dure moins de 5 minutes par animal (**Figure 36**).

La douleur post-opératoire est prise en charge par l'administration intra-péritonéale de buprénorphine (0,05 mg/kg) toutes les 8-12h durant 24-48h. Une gelée hydratante (GelDiet® Recovery) est mise à disposition, ainsi que de croquettes directement dans la cage, afin de faciliter leur réhydratation post-chirurgicale. Les animaux sont suivis quotidiennement par l'équipe de la PHEA avec une attention particulière concernant la cicatrisation de la plaie, le comportement, la prise alimentaire des animaux. Les rats sont pesés chaque semaine pour suivre l'évolution du poids des animaux. Les rats sont placés en stabulation standard pendant 8

semaines après l'acte chirurgical. Les critères d'arrêt en cours d'expérimentation, également appelés points limites, ont été définis dans les cas où un animal montre des signes de douleurs ne pouvant être soulagées par des analgésiques, si un animal présente des signes de troubles respiratoires visibles, un aspect général dégradé (tête penchée, poils hérissés, dos vouté) ou un comportement anormal (isolement, agressivité, troubles de la marche).

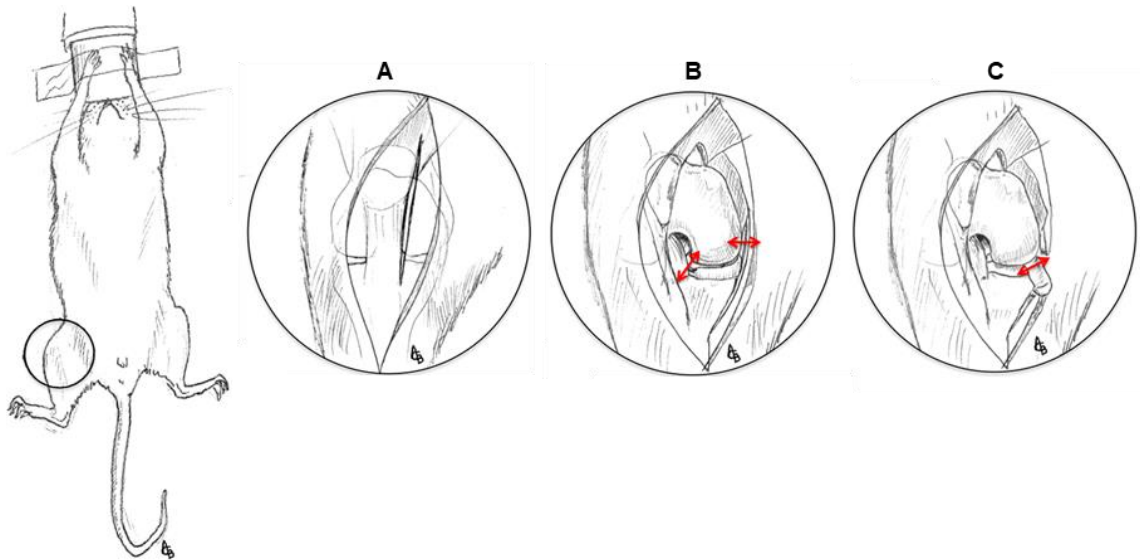


Figure 36. Etapes schématiques de réalisation d'une déstabilisation du ménisque médial chez le rat. (A) Après avoir effectué un abord para-patellaire médial, le ligament patellaire est incisé sur son versant médial. (B) La rotule est luxée en externe, exposant l'articulation du genou. Le ligament ménisco-tibial antérieur, fixant la corne antérieure du ménisque médial au tibia, et le ligament collatéral médial sont sectionnés. (C) La corne antérieure du ménisque est mobilisée et sa moitié antérieure est réséquée.

2.3. Injection systémique d'une molécule anti-angiogénique

Une injection systémique d'une molécule anti-angiogénique est réalisée chaque semaine sur toute la durée de l'expérimentation, afin d'inhiber l'angiogenèse ostéochondrale.

Les rats sont séparés en deux groupes, chaque rat étant identifié par un code couleur dessiné sur la queue (marquage au feutre non invasif). Une solution d'Aflibercept (Zaltrap®, Sanofi) à 8 mg/mL (dilution dans du NaCl 0,9%) ou de solution contrôle de NaCl (0,9%) est injectée en intra-péritonéale à 12,5 mg/kg sur animal vigile, par simple contention, une fois par semaine pendant 8 semaines (**Figure 37**). La première injection est réalisée 5 jours post-DMM.

2.4. Injection de tétracycline, sacrifice des animaux et prélèvement des tissus

Les animaux sont injectés en intra-péritonéale avec une solution de tétracycline (Sigma-Aldrich, T3383) à 3,75 mg/mL (dilution dans du PBS) à 6,66 μ L/g sur animal vigile, par simple contention, 7 jours et 2 jours avant le sacrifice (**Figure 37**).

A 8 semaines post-DMM, les rats sont sacrifiés par prélèvement sanguin en intracardiaque. Les animaux sont préalablement anesthésiés par inhalation d'un mélange d'isoflurane dans l'air ambiant à 4% avec un débit de 300 mL/min pour induire l'anesthésie puis à 1,5-2,5% pour maintenir l'endormissement. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par l'absence de réflexe de retrait suite au pincement des coussinets plantaires. La procédure est poursuivie uniquement quand l'animal est sous narcose profonde. La paroi thoracique est ensuite ouverte, le diaphragme est sectionné puis un prélèvement sanguin intracardiaque est réalisé à l'aide d'une aiguille insérée dans le ventricule gauche du cœur de l'animal. Un volume de 2 mL en moyenne est prélevé entraînant la mort de l'animal par exsanguination. La mort de l'animal est confirmée par l'observation de l'absence de battement cardiaque pendant au moins une minute et le début de rigidité cadavérique.

Les pattes postérieures droites et gauches sont prélevées. La peau et les muscles sont enlevés pour ne garder que le genou. Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau pour enlever les résidus de poils puis fixés dans une solution de PFA 3,7% pendant 48h à 4°C. Les tissus sont ensuite décalcifiés dans une solution d'EDTA à 14% pendant 6 à 8 semaines à 4°C. Les bains d'EDTA sont changés tous les deux jours, jusqu'à décalcification complète du prélèvement. La décalcification est jugée totale lorsque le genou est devenu mou. Les prélèvements sont conservés dans une solution d'éthanol 70% jusqu'à leur inclusion en paraffine. Les genoux de rats sont inclus en paraffine, face médiale tournée vers le fond de la cassette en plastique. Des coupes d'une épaisseur de 5 μ m sont réalisées à l'aide d'un microtome à rotation Leica RM2135 (Leica Biosystems) selon l'axe sagittal des échantillons, afin d'obtenir des coupes comprenant les plateaux tibiaux et condyles fémoraux médiaux. Les coupes sont conservées à partir du moment où le ménisque se sépare en deux structures de forme triangulaire. Trois à quatre coupes sont déposées sur chaque lame, 25 à 30 lames sont collectées par échantillon. Les lames sont séchées à 37°C pendant 24h puis conservées à température ambiante et à l'obscurité.

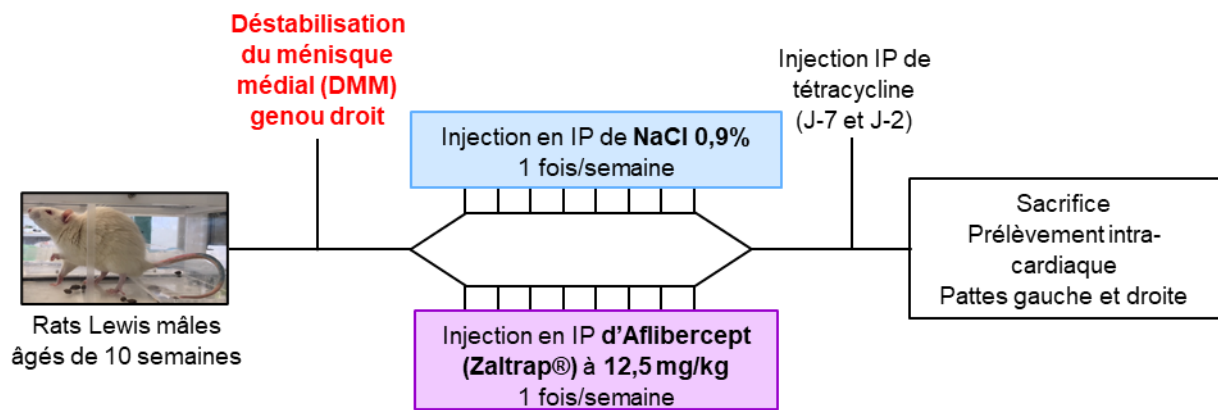


Figure 37. Schéma du protocole expérimental. Des rats Lewis âgés de 10 semaines subissent une déstabilisation du ménisque médial et une ménisectomie partielle sur leur genou droit, afin d'induire une arthrose post-traumatique. Une injection en intra-péritonéale (IP) d'Aflibercept (Zaltrap®) à 12,5 mg/kg ou de solution contrôlée NaCl (0,9%) est effectuée 1 fois par semaine pendant 8 semaines. Deux injections de tétracycline en intra-péritonéale sont effectuées 7 et 2 jours avant le sacrifice des animaux. Après sacrifice, les pattes postérieures sont récupérées pour une analyse histologique.

3. Cultures et différenciations cellulaires

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

3.1. Culture et différenciation de chondrocytes murins

3.1.1. Culture primaire de chondrocytes articulaires immatures murins

Des souriceaux C57BL/6J (élevage Janvier-Labs) âgés de 5 à 6 jours sont disséqués afin de prélever les genoux et les têtes fémorales (Bougault et al. 2012; Gosset et al. 2008). Les prélèvements sont rincés au PBS puis soumis à des digestions enzymatiques par la libérase (Roche, 5401127001) à 37°C (deux digestions de 45 min à 0,52 unité Wunsch/mL et une digestion sur la nuit à 0,13 unité Wunsch/mL) dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich) à 1 g/l de glucose, de la pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL) et L-glutamine (4 mM) (Sigma-Aldrich). Le lendemain, les chondrocytes articulaires immatures (iMAC) sont isolés des débris matriciels par passages successifs dans des pipettes de 25, 10, 5 mL et pipette Pasteur puis par filtration sur tamis cellulaire (100 µm). Les iMAC sont ensuite ensemencés à une densité cellulaire de 40 000

cellules par puits (plaque 12 puits) dans 1 mL de milieu DMEM PS/Glu supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (milieu 1) (Gibco, A3160802). Les cellules sont cultivées dans ce milieu de croissance à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'humidité et 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les deux jours, jusqu'à confluence.

3.1.2. Modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes

Les iMAC sont cultivés pendant 7 jours en milieu de croissance jusqu'à confluence. Ils sont ensuite cultivés dans un milieu de différenciation pré-hypertrophique (milieu n°2) pendant 28 jours. Ce milieu est composé de DMEM-HamF12 (Ham's F-12 Nutrient Mixture) (Sigma-Aldrich) à 4,5 g/l de glucose, SVF (5%), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), L-glutamine (4 mM), insuline (5 µg/mL) – transferrine (5 µg/mL) – sodium sélénite (5 ng/mL) (ITS) (Sigma-Aldrich, 11074547001), hormone tri-iodo-L-thyronine (T3) (50 ng/mL) (Sigma-Aldrich, T6397) et extemporanément de l'acide L-ascorbique (vitamine C) (40 µg/mL) (Sigma-Aldrich, A4544). Les chondrocytes obtenus au bout de 28 jours de culture dans le milieu n°2 sont qualifiés de chondrocytes pré-hypertrophiques (Prehyp). Les chondrocytes pré-hypertrophiques sont ensuite cultivés dans un milieu de différenciation hypertrophique (milieu n°3) pendant 42 jours, constitué d'un milieu de différenciation pré-hypertrophique supplémenté extemporanément en β-glycérophosphate (10 mM) (Sigma-Aldrich, G9422), acide rétinolique (vitamine A) (100 nM) (Sigma-Aldrich, R2625) et 1,25-dihydroxyvitamine D3 (10 nM) (Sigma-Aldrich, D1530). La différenciation des chondrocytes pré-hypertrophiques en chondrocytes hypertrophiques est réalisée à 37°C en atmosphère comprenant 95% d'humidité et 3% de CO₂. Les chondrocytes obtenus au bout de 42 jours de différenciation sont qualifiés de chondrocytes hypertrophiques (Hyp) (van Eegher et al. 2021).

A la fin de chaque stade de différenciation (pré-hypertrophique et hypertrophique), des cultures de cellules sont arrêtées pour réaliser des milieux conditionnés. Deux types de milieux conditionnés sont engendrés selon le type de milieu de culture utilisé. Un premier milieu conditionné est réalisé dans un milieu ECGM2 (Endothelial Cel Growth Medium) (PromoCell, C-22011) supplémenté en pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL) et L-glutamine (2 mM) et un second milieu conditionné est réalisé dans un milieu DMEM 1 g/l de glucose supplémenté en pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL) et L-glutamine (2 mM). Les chondrocytes sont rincés deux fois au PBS puis incubés dans 1 mL de milieu ECGM2 ou DMEM décrit précédemment pendant 24h, selon leurs conditions de culture usuelles. Après incubation, les milieux conditionnés sont récupérés, centrifugés à 2500 rpm pendant 5 min,

aliquotés et conservés à -80°C. Les cellules utilisées pour générer les milieux conditionnés sont rincées deux fois au PBS avant extraction des ARN totaux et des protéines cellulaires et matricielles. Les lysats cellulaires sont conservés à -80°C. D'autres cultures de chondrocytes sont fixées au PFA 3,7% pendant 15 min, rincées deux fois au PBS puis conservées à -20°C ; ou bien utilisées directement pour d'autres expériences décrites ultérieurement.

3.2. Culture et différenciation de monocytes murins

La culture, la différenciation des monocytes et la détection des ostéoclastes ont été effectuées dans l'unité de recherche BIOSCAR – Biologie de l'os et du cartilage (U1132) de l'hôpital Lariboisière (Paris) par notre collaborateur, le Dr Éric Hay.

Des monocytes murins de la lignée RAW 264.7 sont ensemencés à une densité cellulaire de 57 000 cellules/cm² dans des chambres de culture Labtek à 1 ou 8 compartiments dans respectivement 2 mL et 400 µL par compartiment de milieu de culture αMEM sans rouge phénol (Gibco) supplémenté en pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), L-glutamine (2 mM) et 10% de SVF (Hyclone, SH30071.03). Les monocytes sont cultivés à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'humidité et 5% de CO₂. Une fois que les cellules sont confluentes, soit 24h après ensemencement, les monocytes sont différenciés en ostéoclastes dans du milieu αMEM supplémenté en pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), L-glutamine (2 mM), 5% de SVF et RANK-L (100 ng/mL) pendant 5 jours. Un milieu contrôle sans RANKL est utilisé pour vérifier la différenciation ostéoclastogénique assurée par ce facteur. Les capacités de différenciation ostéoclastogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques ont été évaluées en utilisant les milieux conditionnés (en DMEM) de chondrocytes, supplémenté avec 5% de SVF. A l'issue de la différenciation, les cellules différenciées dans les Labtek 8 compartiments sont fixées au PFA 3,7% pour effectuer un comptage des ostéoclastes et les cellules différenciées dans les Labtek 1 compartiment sont lysées pour extraire les ARN totaux.

3.3. Culture de cellules endothéliales humaines

Des cellules endothéliales humaines HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, PromoCell) sont cultivées dans du milieu ECGM2 (Endothelial Cell Growth Medium 2, PromoCell, C-22011) supplémenté en pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), L-glutamine (2 mM) (1% PS/Glu) et mix complémentaire (25,2 µL/mL de milieu). Après ajout du mix complémentaire, le milieu de culture contient les facteurs suivants : SVF (0,02 mL/mL),

Epidermal Growth Factor (humain recombinant) (5 ng/mL), Basic Fibroblast Growth Factor (humain recombinant) (10 ng/mL), Insulin-like Growth Factor (R3 IGF-1) (20 ng/mL), Vascular Endothelial Growth Factor 165 (humain recombinant) (0,5 ng/mL), acide ascorbique (1 µg/mL), héparine (22,5 µg/mL) et hydrocortisone (0,2 µg/mL). Les cellules endothéliales sont cultivées dans ce milieu de culture dit complet, à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'humidité et 5% de CO₂. Les cellules endothéliales sont utilisées à maximum passage 7.

METHODES D'ANALYSE

1. Tests fonctionnels d'angiogénèse

1.1. Adhérence de cellules endothéliales aux matrices extracellulaires de chondrocytes

Des cellules HUVEC en culture sont incubées avec de la calcéine-AM (1 μ M) (Invitrogen, C3099) à 37°C pendant 1h. Les cellules HUVEC sont ensuite détachées (trypsine/EDTA), centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min puis resuspendues à une concentration finale de 25000 cellules/mL dans du milieu de culture complet. Des cultures de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques sont rincées au PBS, puis 1 mL de solution de cellules endothéliales est déposé sur chaque puits de chondrocytes. Chaque condition est réalisée en duplicat. Des concentrations croissantes de cellules HUVEC (0, 2500, 5000, 10000, 20000 et 40000 cellules/mL) sont déposées dans des puits vides afin de réaliser une gamme. Les cellules endothéliales et chondrocytaires sont incubées à 37°C dans une atmosphère comprenant 95% d'humidité et 5% de CO₂ pendant 4h. Après 4h, les cellules non adhérentes sont retirées par lavage au PBS. L'adhérence des cellules endothéliales marquées à la calcéine est détectée par spectrophotométrie (longueur d'onde émission/excitation 535 nm/485 nm). L'auto-fluorescence des chondrocytes est retranchée à chacun des puits. L'adhérence des cellules endothéliales aux matrices de chondrocytes est calculée grâce à la gamme d'adhérence des cellules endothéliales sur puits vide de culture cellulaire.

1.2. Prolifération de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes

Les cellules HUVEC sontensemencées à 4000 cellules/puits dans une plaque 96 puits avec 100 μ L de milieu de culture complet et incubées sur la nuit. Le lendemain, les cellules sont mises à jeun avec 100 μ L de milieu dit contrôle négatif (ECGM2, 1% PS/Glu, 2% de SVF décomplémenté) pendant 4h. Les cellules HUVEC sont ensuite stimulées avec 100 μ L de milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques ou hypertrophiques (supplémentés avec 2% de SVF décomplémenté ou 2% de mix complémentaire), de milieux contrôle négatif ou de milieu de culture complet, qui servira de contrôle positif, pendant 48h. La prolifération cellulaire est détectée par incorporation de l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), sur les 4 dernières heures de l'expérience (EdU HTS kit, Baseclick, BCK-HTS555). Après 44h de

stimulation, 100 μ L d'EdU (2 μ M) est ajouté à chaque puits. Au bout de 48h de stimulation, les cellules sont fixées au PFA 3,7% et perméabilisées au Triton 0,5%. Une solution cocktail est ensuite déposée dans chaque puit et incubée 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite marquées au DAPI (dilution 1/2000^{ème} dans PBS) pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Chaque puits est ensuite photographié au microscope optique Olympus IX83 (objectif x10). Un comptage des cellules EdU-positives et DAPI-positives est ensuite réalisé à l'aide du logiciel CellSens Dimension.

1.3. Migration de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes

Les cellules HUVEC sontensemencées à 100000 cellules/puits dans une plaque 24 puits avec 1 mL de milieu complet. A confluence, les cellules sont incubées avec de la mitomycine C (Sigma-Aldrich, M4287) (5 μ g/mL) pendant 1h à 37°C, pour bloquer la prolifération cellulaire. En parallèle, les cellules sont incubées ou non avec de l'AMD3100 (Sigma-Aldrich, 239820) (10 μ g/mL), pour bloquer le récepteur CXCR4. Une fente verticale est réalisée au centre de chaque puits, en grattant le fond du puits à l'aide d'un cône de 200 μ L. Après lavage au PBS, les cellules sont stimulées avec 400 μ L de milieux conditionnés pré-hypertrophiques ou hypertrophiques, de milieu contrôle négatif (ECGM2, 1% PS/Glu) ou de milieu de culture complet qui servira de contrôle positif. Chaque condition est réalisée en duplicat. La migration des cellules HUVEC au niveau de la fente est observée pendant 24h. 3 à 4 champs par puits sont photographiés toutes les 30 min pendant 24h, au microscope optique Olympus IX83 (objectif x10). Le surface de la fente au cours de l'expérience est calculée à l'aide du logiciel ImageJ.

1.4. Formation de tubules sur Matrigel en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes

Le Matrigel (sans rouge phénol et réduit en facteur de croissance, Corning, 356231) est décongelé dans la glace, à 4°C sur la nuit. Un volume de 11 μ L de Matrigel est déposé dans le compartiment inférieur de chaque puits d'une plaque 15 puits μ -slide Angiogenesis (ibidi, 81506). Le Matrigel est incubé dans une chambre humide à 37°C pendant 1h pour polymérisation. Les cellules HUVEC en culture sont incubées ou non avec de l'AMD3100 (Sigma-Aldrich, 239820) (10 μ g/mL) pendant 1h à 37°C, pour bloquer le récepteur CXCR4. Les cellules HUVEC sont ensuite détachées (trypsine/EDTA), centrifugées à 1200 rpm pendant

5 min puis resuspendues à une concentration finale de 300000 cellules/mL dans du milieu conditionné de chondrocytes pré-hypertrophiques ou hypertrophiques, du milieu contrôle négatif (ECGM2, 1% PS/Glu) ou de milieu de culture complet qui servira de contrôle positif. Chaque condition est réalisée en duplicat. La formation de tubules sur Matrigel est observée pendant 22h. Quatre champs par puits sont photographiés toutes les 1h pendant 22h, au microscope optique Olympus IX83 (objectif x10). Une segmentation des images (cellules/bruit de fond) est réalisée à l'aide du logiciel Ilastik, pour obtenir un squelette du réseau de tubules. La longueur totale du réseau de tubules et le nombre de jonctions sont calculés à l'aide du plugin Angiogenesis Analyzer du logiciel ImageJ (**Figure 38**).

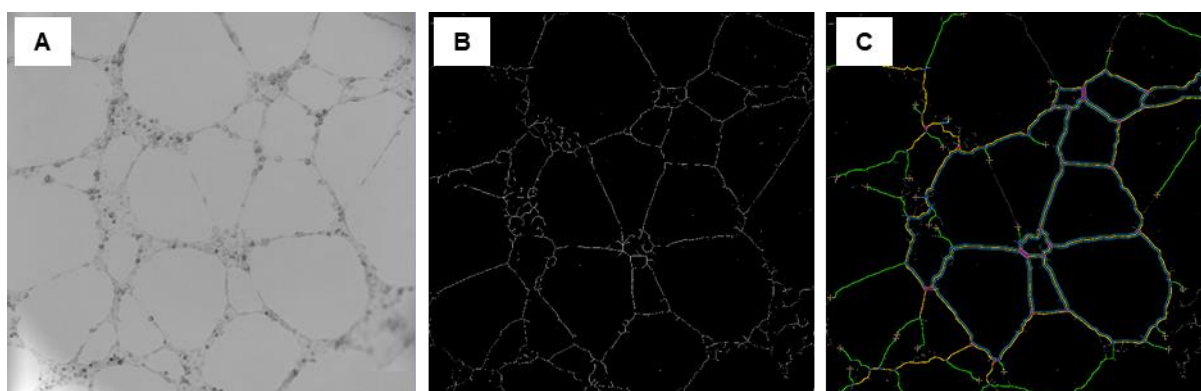


Figure 38. Analyse de la formation de tubules sur Matrigel. Pour chaque puits, 4 photos sont prises toutes les heures pendant 22 heures. Chaque photo est analysée séparément puis la moyenne de chaque paramètre pour les 4 photos est calculée. (A) Image en contraste de phase prise par le microscope IX83. (B) Segmentation de l'image par le logiciel Ilastik (bruit de fond en noir et tubules en blanc). (C) Analyse de l'image segmentée par le plugin Angiogenesis Analyzer du logiciel ImageJ. La longueur totale du réseau et le nombre de jonctions sont les paramètres utilisés pour évaluer la formation de tubules.

2. Analyses moléculaires, biochimiques et histologiques

2.1. Analyses moléculaires

2.1.1. Extraction des ARN totaux et rétro-transcription (RT)

La lyse des cellules et l'extraction des ARN totaux sont réalisées selon le protocole RelisaPrepTM RNA Cell Miniprep System de Promega. Après 2 rinçages au PBS, les cellules sont lysées par un tampon BL-T (Guanidine thiocyanate (4 M), Tris (0,01 M) pH 7,5 et 1-Thioglycérol (1%)). La concentration et la pureté des ARN extraits sont estimées par le spectrophotomètre Nanodrop à 260 nm. Les ARN totaux (500 ng) sont utilisés comme matrice

afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) grâce au kit Omniscript de Qiagen (tampon 1X, dNTP (0,5 mM), oligodT (1 μ M) et enzyme RT (4U). Le volume réactionnel final de 20 μ L est incubé 50 min à 37°C et 15 min à 70°C. L'ADNc est conservé à -20°C.

2.1.2. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les niveaux d'expression des transcrits d'intérêt sont quantifiés par qPCR grâce au kit Go Taq qPCR Master Mix de Promega. Les mesures sont réalisées par le LightCycler96 de Roche selon le programme d'amplification présenté ci-dessous (**Figure 39**). Les échantillons sont déposés en duplicat pour chaque gène étudié. Les séquences des amorces utilisées sont listées dans le tableau ci-dessous (**Figure 40, 41**). L'expression relative des transcrits est normalisée par le niveau d'expression du gène de ménage Hypoxanthine PhosphoRibosylTransférase (HPRT) murin ou du gène de ménage ARN ribosomique 18S (18S) humain, selon l'origine murine ou humaine des cellules. L'expression relative des transcrits est déterminée par la méthode $\Delta\Delta$ Ct.

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

Figure 39. Protocole d'amplification par qPCR (LightCycler96).

Gène (murin)	Sens (5'– 3')	Anti-sens (5'– 3')	T° de fusion
Acan	CAGAGTTAGTGGAGGGTGTGA	AGACCCTGGGAAGTTTGT	60°
Adamts4	GGCAAGGACTATGACGC	TCAGCCCAAGGTGAGTG	60°
Adamts5	TCAGCCACCATCACAGAA	CCAGGGCACACCGAGTA	60°
Angptl4	GGGACCTTAACTGTGCCAAG	GAATGGCTACAGGTACCAAACC	60°
Bmp2	AGATCTGTACCGCAGGCACT	GTTCTCCACGGCTTCTTC	60°
Bmp4	GAGGAGTTTCCATCACGAAGA	GCTCTGCCGAGGAGATCA	60°
Ccl2	GATGATCCCAATGAGTAGGCT	TTCTGATCTCATTTGGTTCCGA	60°
Ccl4	GCCCTCTCTCTCCTCTTGCT	GGAGGGTCAGAGCCCATT	60°

Ccr5	GACTGCCAACAGGGAAGAAC	CCCCAAGTTCTGCTGACTCT	60°
Chm1	AGAAGCAATTGAAGTCAACGAT	AGCGAGTTCTCTTCGTAGTTAG	60°
Col2a1	GGCAACAGCAGGTTACATA	ATGGGTGCGATGTCAATAAT	60°
Col10a1	GATGCCGCTTGTCAGTG	TAAAGATACCAGATCTTGGGTCG	60°
Csf1r	GCTACTGCTGTTGCTGCTCTT	TTGCCTTCGTATCTCTCGATG	60°
Cxcl12	TGAGAACATGCCTAGATTACCC	TCATGGCAAGATTCTGGCTTA	60°
Cxcr4	GTGGTGTTCATTCAGCATATAA	GCAGGCAAAGAAAGCTAGG	60°
Cxcr7	AGAAGATGGTACGCCGTGTT	ATCAGGCAGGGACACAAAGA	60°
Fgfb	CCTTGCTATGAAGGAAGATGGAC	AGTTTATACTGCCCAGTTCG	60°
Hprt	AGGACCTCTCGAAGTGT	ATTCAAATCCCTGAAGTACTCAT	60°
Ihh	CACCTTCAGTGATGTGCTTATTT	GGGCTGCTGGTTCTGTA	60°
Il-34	ACAAGAACCGGCTTCAGTACA	CCCTCATAAGGCACAGCAAT	60°
Mmp3	TGAAAATGAAGGGTCTTCCGG	GCAGAAGCTCCATACCAGCA	60°
Mmp13	GATGGCACTGCTGACATCAT	TGTAGCCTTTGGAAGTCTT	60°
Opg	ATCAGAGCCTCATCACCTT	CTTAGGTCCAACACTACAGAGGAAC	60°
Ostéocalcine	GGTGTCCCCACTTTTCCTCC	GACCACTCCAGCACAACTCC	60°
Ostéomoduline	TTCCAAGGAATTTGGAACATCT	TGTTAAATGGTGATGGTGTACTGG	60°
Ostérix	CCTCAGTTCTTCTCTTTGTC	AACGGCAAATAGGATTGGG	60°
Rankl	TGAAGACACACTACCTGACTCCTG	CCACAATGTGTTGCAGTCC	60°
Runx2	ATTCATCCTGACTCCCTCT	CTACCACACACAAACAATAAATAGC	60°
Snorc	TGCTCATCTCTGGGGTCCT	GGCAATTCAATAGGCTCGTT	60°
Sox9	AACGCACATCAAGACGG	GGCTGTAGTGAGGAAGGTT	60°
Sphk1	TCCATACCTGGTTCATGTGC	ACAGAAAACACGCCCTCT	60°
Tgfb1	GCGGTGCTCGCTTTGTA	CTGTGTGAGATGTCTTTGGTT	60°
Tnap	GAATCGGAACAACCTGACT	CCTGGTCCATCTCCACT	60°
Tsp1	GCTGGCAATGCACCTTCTAA	TAAAGGCCGAGTGCTGAC	60°
Vegfa	CTGCTGTGGACTTGTGTTG	ATGGGTTTGTCTGTTTCT	60°
Vegfc	GCACAGGTTACCTCAGCAAGA	GTAACATCCAGTTTAGACATGCAC	60°
Vegfr2	TTTGGCAAATACAACCCTCAGA	GCAGAAGATACTGTCACCACC	60°
Vegfr3	TGTCACCTTCGACTGGGATT	TGCTGGAGAGTTCTGTGTGG	60°

Figure 40. Séquences des amorces murines (sens et anti-sens) utilisées en qPCR.

Gène (humain)	Sens (5'– 3')	Anti-sens (5'– 3')	T° de fusion
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC	60°
Cxcr4	CTGTGAGCAGAGGGTCCAG	ATGAATGTCCACCTCGCTTT	60°
Vegfr2	TGAGCATGGAAGAGGATTCTG	CTCTTTCGCTTACTGTTCTGC	60°

Figure 41. Séquences des amorces humaines (sens et anti-sens) utilisées en qPCR.

2.2. Analyses biochimiques

2.2.1. Dosage protéique

Les concentrations de protéines totales présentes dans les milieux conditionnés de chondrocytes sont déterminées à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay, basée sur la méthode de Bradford. La réaction colorimétrique est mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. Le dosage est standardisé par rapport à une gamme d'albumine (Bovine Serum Albumine BSA).

2.2.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Les concentrations de protéines spécifiques présentes dans les milieux conditionnés de chondrocytes et dans les échantillons humains sont déterminées par ELISA. Le PlGF-2, VEGF-A, SDF-1 α (humain et murin), CCL4, PDGF-BB, RANK-L et IL-34 murins ont été dosés par les kits Quantikine® ELISA de R&D Systems. Le VEGF-C a été dosé par les kits RayBiotech et Cloud-Clone Corp.

2.2.3. Angiogenesis array

Un criblage de 53 protéines liées à l'angiogenèse a été réalisé à partir des milieux conditionnés de chondrocytes, avec le kit Proteome Profiler™ Mouse Angiogenesis Array de R&D Systems. La détection simultanée de multiples facteurs dans un échantillon donné repose sur une technique d'immunodétection de type « sandwich ». Les milieux conditionnés ont été mélangés avec un cocktail d'anticorps de détection biotinylés pendant 1h à température ambiante, puis incubés toute une nuit à 4°C sur des membranes de nitrocellulose sur lesquelles ont été fixées des anticorps de capture dirigés contre des protéines cibles spécifiques (un anticorps dirigé contre une protéine cible par paire de spot). Les protéines capturées sont visualisées par chimioluminescence. La quantité relative de chaque protéine est déterminée en

calculant le pourcentage de densité de pixel du spot d'intérêt par rapport à un spot contrôle. Un spot est considéré comme détectable lorsque son pourcentage de densité de pixel est $\geq 5\%$.

2.3. Analyses histologiques

2.3.1. Coloration Safranine-O/Fast Green et score OARSI

La coloration Safranine-O/Fast Green est une coloration histologique qui permet colorer en rouge les GAG et protéoglycanes (le cartilage) et en bleu/vert le collagène (l'os). Cette coloration effectuée sur les coupes de genoux de rat est essentielle pour déterminer le degré d'arthrose des animaux à l'issu du protocole expérimental. La société OARSI (OsteoArthritis Research Society International) a développé une méthode d'évaluation histologique de l'arthrose (score OARSI) basée sur 6 grades, qui reflètent la profondeur de la lésion du cartilage, et sur 4 stades, qui traduisent l'étendue des lésions arthrosiques sur la surface de l'articulation (**Figure 42**) (Pritzker et al. 2006).

Pour évaluer le degré d'arthrose des genoux de rats à l'issu du protocole expérimental, des coupes histologiques de pattes de rats sont chauffées à 60°C pendant 15 min puis déparaffinées dans 3 bains successifs de xylène pendant 3 min suivis de différents bains d'éthanol à des concentrations décroissantes (éthanol absolu, 95% et 70%) pour enfin terminer dans plusieurs bains d'eau distillée. Les coupes sont d'abord colorées à l'hématoxyline pendant 5 min, pour marquer les noyaux cellulaires, puis au Fast Green 0,02% pendant 1 min. Les coupes sont ensuite colorées à la Safranine-O 1% pendant 1h. Les coupes sont ensuite déshydratées avec différents bains d'éthanol à des concentrations croissantes (95% et 100%) puis plongées dans des bains de xylène avant d'être montées entre lame et lamelle en résine Eukitt®.

Pour chaque patte de rat, trois lames sont colorées et scorées. Ces trois lames représentent 3 profondeurs différentes de coupe dans l'échantillon (début, milieu et fin de zone de coupe). La moyenne des scores des trois lames est calculée pour évaluer le score OARSI de l'échantillon. Le score de chaque coupe a été déterminé à l'aveugle, par deux expérimentateurs différents.

A

Table III
OA cartilage histopathology grade assessment—advanced grading methodology

Grade (key feature)	Subgrade (optional)	Associated criteria (tissue reaction)
Grade 0: surface intact, cartilage intact	No subgrade	Intact, uninvolved cartilage
Grade 1: surface intact	1.0 Cells intact 1.5 Cell death	Matrix: superficial zone intact, edema and/or fibrillation Cells: proliferation (clusters), hypertrophy Reaction must be more than superficial fibrillation only
Grade 2: surface discontinuity	2.0 Fibrillation through superficial zone 2.5 Surface abrasion with matrix loss within superficial zone	As above + Discontinuity at superficial zone ± Cationic stain matrix depletion (Safranin O or Toluidine Blue) upper 1/3 of cartilage (mid zone) ± Disorientation of chondron columns
Grade 3: vertical fissures	3.0 Simple fissures 3.5 Branched/complex fissures	As above ± Cationic stain depletion (Safranin O or Toluidine Blue) into lower 2/3 of cartilage (deep zone) ± New collagen formation (polarized light microscopy, Picro Sirius Red stain)
Grade 4: erosion	4.0 Superficial zone delamination 4.5 Mid zone excavation	Cartilage matrix loss, cyst formation within cartilage matrix
Grade 5: denudation	5.0 Bone surface intact 5.5 Reparative tissue surface present	Surface is sclerotic bone or reparative tissue including fibrocartilage
Grade 6: deformation	6.0 Joint margin osteophytes 6.5 Joint margin and central osteophytes	Bone remodelling. Deformation of articular surface contour (more than osteophyte formation only) Includes: microfracture and repair

I. Grade = depth progression into cartilage.

B

Table IV
OA cartilage histopathology—stage assessment

Stage	% Involvement (surface, area, volume)
Stage 0	No OA activity seen
Stage 1	< 10%
Stage 2	10–25%
Stage 3	25–50%
Stage 4	> 50%

Stage = extent of joint involvement.

C

Table V
OA score—semi-quantitative method

Grade	Stage			
	S1	S2	S3	S4
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	16
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

Score = grade × stage.

Figure 42. Méthode d'analyse du score histologique OARSI adapté au rat. Ce score s'évalue sur les plateaux tibiaux et les condyles fémoraux, séparément. (A) Evaluation du « *grade* » de chaque compartiment. La nature des lésions du cartilage et de l'os est évaluée sur une échelle de 0 à 6. (B) Evaluation du « *stage* » des lésions. L'étendue des lésions est évaluée sur une échelle de 0 à 4. (C) Le score OARSI final représente le produit du « *grade* » et du « *stage* ». Ce score est compris entre 0 et 24. D'après (Pritzker et al. 2006)

2.3.2. Marquage TRAP

La mise en évidence des ostéoclastes se fait par la détection histochimique des phosphatases acides tartrates résistantes (TRAP). Les phosphatases possèdent une activité catalytique spécifique des liaisons esters phosphoriques et peuvent agir sur différents substrats en fonction des conditions employées (pH acide ou basique). La détection enzymatique des phosphatases acides s'effectue à pH acide en utilisant comme substrat le naphthol AS-TR (Sigma-Aldrich, N6125). La réaction est réalisée avec une concentration définie en acide tartrique, qui est un inhibiteur de la réaction enzymatique, et en substrat. L'activité phosphatase

acide des ostéoclastes étant insensible à cet inhibiteur, cela permet de visualiser de façon spécifique les ostéoclastes.

Après fixation des cellules, les lames Labtek sont incubées pendant 20 minutes à 37°C dans une solution (pH 5) composée : d'acétate de sodium anhydre, d'eau distillée, d'acide acétique (solution tampon acétate 0,1 M acide), de sodium nitrite, d'eau distillée, de pararosaniline (complexe se fixant au substrat), de naphthol AS-TR, de diméthylformamide (substrat de la réaction), de manganèse sulfate (stabilisateur) et d'acide tartrique (inhibiteur de la réaction). Une contre-coloration au vert de méthyle (1%) est ensuite effectuée. Les ostéoclastes sont ainsi colorés en rouge et observés directement en microscopie optique. Cinq champs par puits ont été comptés. Les cellules TRAP-positives et multinuclées (nombre de noyaux ≥ 3) sont considérées comme étant des ostéoclastes.

2.3.3. Marquage TUNEL

Le marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) a été conçu pour détecter les cellules apoptotiques qui subissent une dégradation importante de l'ADN au cours des dernières étapes de l'apoptose. Cette méthode se base sur la détection des cassures des brins d'ADN, par marquage des extrémités 3' – OH libres avec des nucléotides modifiés, au cours d'une réaction enzymatique.

Ce marquage a été effectué sur cellules fixées, selon le protocole *In Situ Cell Death Detection Kit*, Fluorescein de Roche (11 684 795 910). Les cellules apoptotiques ou les corps apoptotiques sont observés au microscope et comptés manuellement.

2.3.4. Immunohistochimie

Des coupes histologiques de genoux humains et murins sont chauffées à 60°C pendant 15 min puis déparaffinées dans 3 bains successifs de xylène pendant 3 min suivis de différents bains d'éthanol à des concentrations décroissantes (éthanol absolu, 95% et 70%) pour enfin terminer dans plusieurs bains d'eau distillée. Un démasquage des sites antigéniques est effectué, selon l'anticorps primaire utilisé. Les lames sont ensuite incubées avec une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (à 3% pendant 30 min pour les coupes humaines et à 6% pendant 1h pour les coupes murines) à température ambiante et à l'obscurité, afin de bloquer les peroxydases endogènes des tissus. Les lames sont incubées dans une solution de blocage pendant 1h (TBST, BSA 3%, Triton 0,2%) avant d'être incubées avec un anticorps primaire (dilué dans la solution de blocage) sur la nuit à 4°C. Un contrôle est réalisé, avec une

immunoglobuline du même isotype et à la même concentration finale que l'anticorps primaire étudié. Le lendemain, l'anticorps secondaire biotinylé (Vectastain® Universal Quick kit, Peroxydase, R.T.U., PK-7800) est incubé à température ambiante pendant 10 min. Le complexe peroxydase/streptavidine (Vectastain® Universal Quick kit, Peroxydase, R.T.U., PK-7800) est déposé sur les coupes, pendant 5 min. La solution de révélation de la peroxydase par le 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP), with Nickel, (3,3'-diaminobenzidine), SK-4100) est incubé sur les coupes jusqu'à l'obtention d'une coloration brune. La réaction est stoppée par des bains d'eau distillée. Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée pendant 30 secondes, rincée à l'eau courante puis abondamment lavée à l'eau distillée. Enfin, les coupes sont déshydratées avec différents bains d'éthanol à des concentrations croissantes (95% et 100%) puis plongées dans des bains de xylène avant d'être montées entre lame et lamelle en résine Eukitt® (**Figure 43, 44**).

Anticorps primaire	Fournisseur (référence)	Espèce/Isotype	Contrôle	Concentration finale	Conditions du démasquage
VEGF	R&D Systems (AF564)	Chèvre/Polyclonal	IgG chèvre	5 µg/mL	Trypsine/EDTA (20 min 37°C)
VEGFR3	Abcam (ab27278)	Lapin/Polyclonal	IgG lapin	2 µg/mL	Trypsine/EDTA (20 min 37°C)

Figure 43. Conditions expérimentales des immunohistochimies sur coupes murines.

Anticorps primaire	Fournisseur (référence)	Espèce/Isotype	Contrôle	Concentration finale	Conditions du démasquage
SDF-1	Abcam (ab9797)	Lapin/Polyclonal	IgG lapin	1 µg/mL	Chaleur (30 min 90°C) dans Citrate de sodium 10 mM, pH6
Runx2	Santa Cruz Biotechnologies (sc-101145)	Souris/Monoclonal	IgG2b souris	2 µg/mL	Chaleur (30 min 90°C) dans Tris 10 mM pH9, EDTA
CD31	Dako (M0823)	Souris/Monoclonal	IgG1 souris	12,8 µg/mL	Chaleur (30 min 90°C) dans Tris 10 mM pH9, EDTA 1mM, 0,05% Tween 20

Figure 44. Conditions expérimentales des immunohistochimies sur coupes humaines.

3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (version 5.0). Des tests de normalité sont préalablement effectués pour vérifier la distribution des données (tests Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino et Pearson, Shapiro-Wilk).

Des tests appariés ont été réalisés pour comparer deux variables dépendantes (chondrocytes différenciés issus de la même mise en culture). Les données sont jugées statistiquement significatives pour des valeurs de p inférieures à 0,05.

La heatmap a été réalisée à partir du langage de programmation R (version 4.1.1) et de l'interface Rstudio (version 1.4.1717). Les données issues du Proteome Profiler™ Mouse Angiogenesis Array (densité de pixel pour chaque protéine pour chaque type de milieu conditionné) ont été analysées en utilisant le package CRAN pheatmap 1.0.12. Un clustering hiérarchique est effectué par colonne (protéine) et par ligne (milieu conditionné) à l'aide d'une distance euclidienne et d'une méthode de WardD2. L'échelle représente la densité de pixel de chaque protéine dans les différents milieux conditionnés utilisés. Les protéines hautement exprimées sont en rouge et les protéines faiblement exprimées sont en bleu.

RESULTATS

1. Evaluation de l'impact de l'inhibition de l'angiogenèse dans le développement de l'arthrose post-traumatique

1.1. Evaluation histologique de la sévérité de l'arthrose

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de l'angiogenèse, par l'Aflibercept, dans la progression de l'arthrose chez le rat. L'arthrose est induite chirurgicalement, sur les pattes arrière droites de rats adultes, par déstabilisation du ménisque médial (DMM) et ménisectomie partielle. Le modèle d'arthrose par DMM est couramment utilisé dans des modèles murins (Kadri et al. 2008; Kamekura et al. 2005) et entraîne des lésions du cartilage et un remodelage pathologique de l'os sous-chondral (Iijima et al. 2014). La déstabilisation du ménisque médial induit une élévation du stress mécanique dans le compartiment médial, modifiant la distribution des contraintes dans toute l'articulation. Après DMM et ménisectomie partielle (DMM + ménisectomie), l'Aflibercept (Zaltrap®) est administré en intra-péritonéale pour une diffusion par voie systémique, jusqu'à l'articulation, une fois par semaine pendant 8 semaines.

La sévérité de l'arthrose est évaluée par un score histologique (score OARSI allant de 0 à 24), 8 semaines post-chirurgie. Chez les rats contrôle, la DMM + ménisectomie engendre une arthrose avancée, visible par une augmentation importante du score OARSI, passant d'une moyenne de 2,5 pour les plateaux tibiaux des pattes gauches à un score d'en moyenne 19,6 pour les plateaux tibiaux des pattes droites. De plus, parmi les 7 rats contrôle, 2 présentent un score maximal de 24 sur les plateaux tibiaux (**Figure 45 A**). Les atteintes des condyles fémoraux semblent moins sévères, puisque le score OARSI passe d'une moyenne de 1,4 pour les pattes gauches à un score d'en moyenne 13,3 pour les pattes opérées, et qu'aucun score n'atteint la valeur maximale (**Figure 45 B**). L'arthrose est marquée par une dégradation importante du cartilage articulaire, avec un amincissement de son épaisseur et/ou des zones totalement érodées laissant apparaître l'os sous-chondral. Celui-ci est le siège d'un profond remodelage. Des ostéophytes en marge de l'articulation sont également visibles (**Figure 45C**). La DMM + ménisectomie induit donc une arthrose sévère sur les plateaux tibiaux et une arthrose modérée sur les condyles fémoraux des rats contrôle.

Chez les rats injectés en Aflibercept, la DMM + ménisectomie conduit également à une augmentation du score OARSI, passant d'en moyenne 1,5 sur les pattes gauches à en moyenne 13,0 sur les pattes droites pour les plateaux tibiaux (**Figure 45 A**) et d'en moyenne 2,2 pour les pattes non opérées à en moyenne 9,1 pour les pattes opérées concernant les condyles fémoraux

(Figure 45 B). De plus, aucun score n'atteint la valeur maximale que ce soit pour les plateaux tibiaux que les condyles fémoraux. L'augmentation du score OARSI par la DMM + méniscectomie est donc plus faible lorsque les rats sont traités à l'Aflibercept, que lorsqu'ils sont traités par une solution contrôle de NaCl. Le cartilage articulaire est légèrement érodé dans sa couche superficielle, avec l'apparition de fibrillations et/ou de fissures mais n'est pas totalement dénudé. De plus, aucun remodelage osseux n'est observé dans l'os sous-chondral. Des ostéophytes sont néanmoins présents mais sont moins développés que chez les rats contrôle **(Figure 45 C).** Ainsi, l'Aflibercept limite les atteintes du cartilage, avec des lésions moins profondes et moins étendues, empêche le remodelage pathologique de l'os sous-chondral et réduit le développement des ostéophytes.

L'inhibition de l'angiogenèse par l'Aflibercept, qui agit comme un récepteur-leurre captant le VEGFA, le VEGFB et le PlGF et les empêchant de se fixer sur leurs récepteurs VEGFR, permet donc de ralentir la progression de l'arthrose chez le rat, suite à une déstabilisation du ménisque médial et une méniscectomie partielle, sans toutefois l'inhiber totalement.

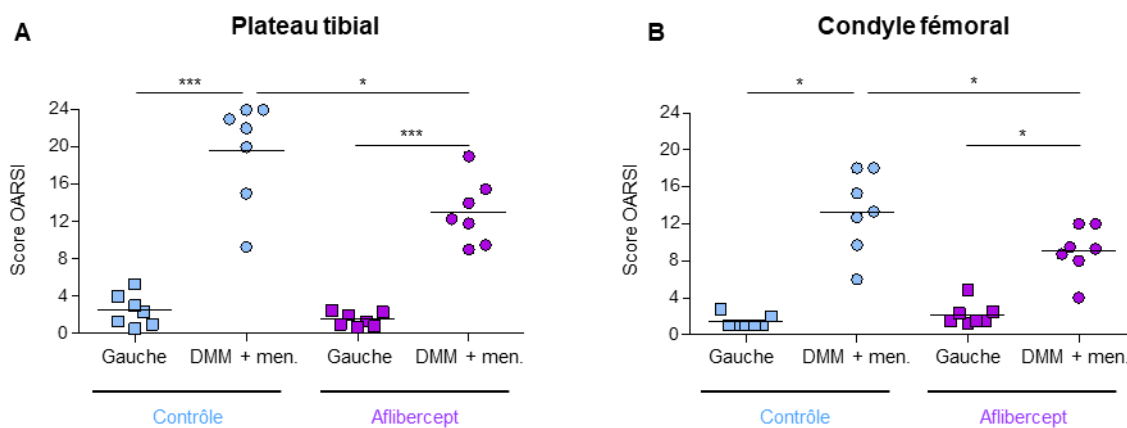
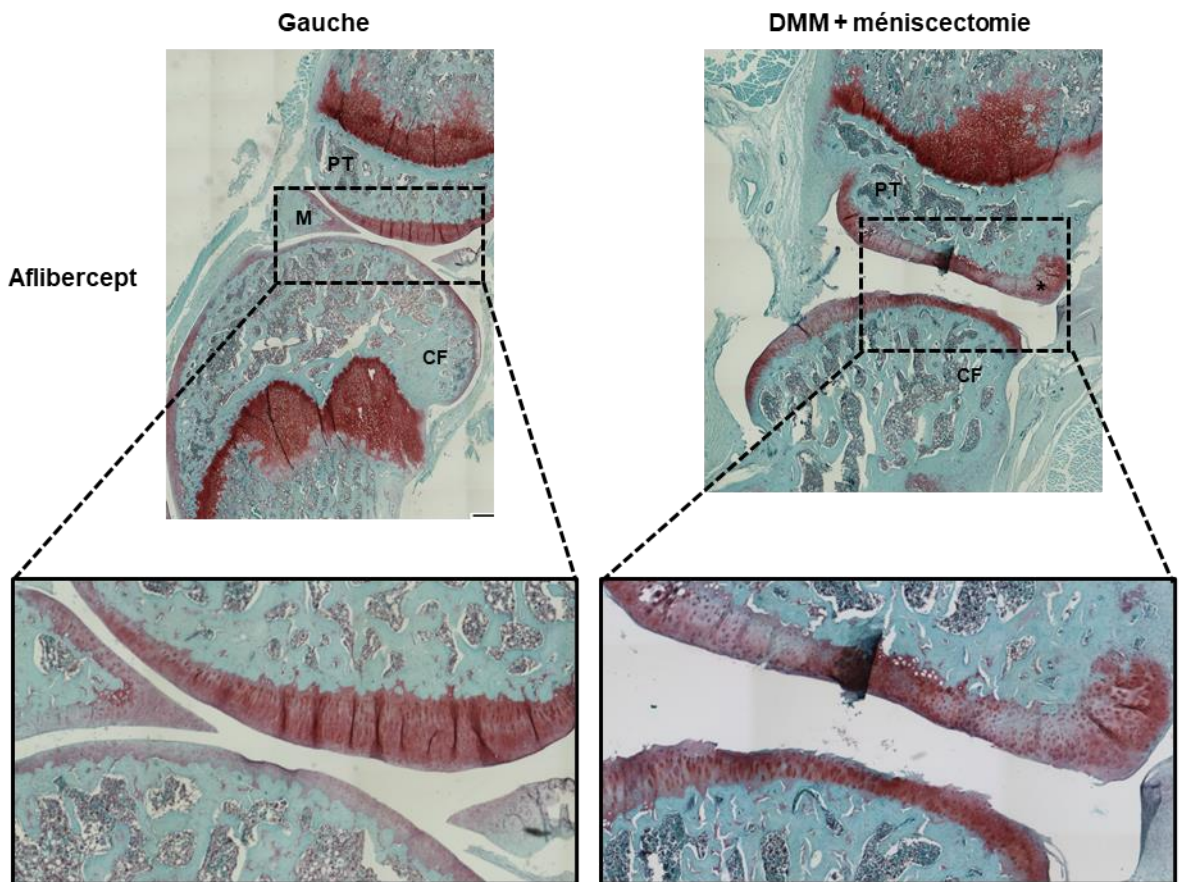
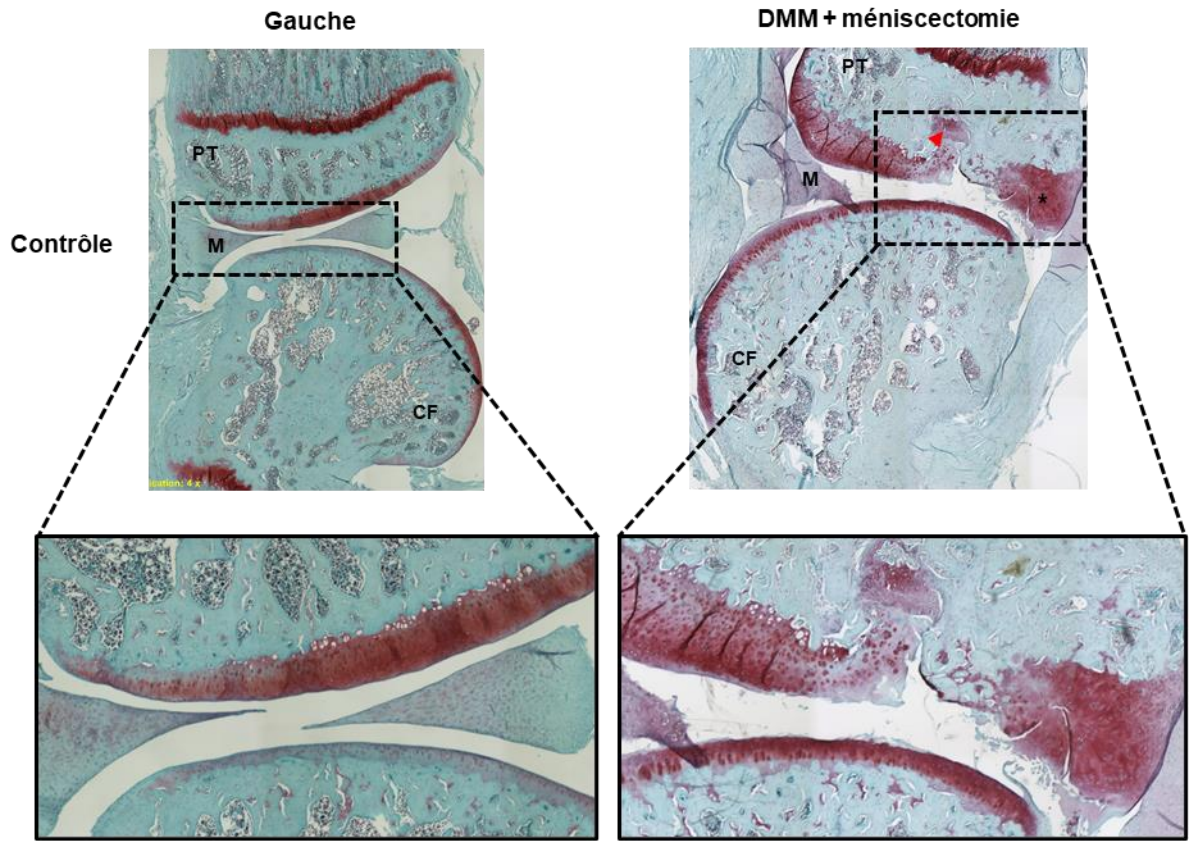


Figure 45. Evaluation du degré d'arthrose chez les rats traités à l'Aflibercept. (A) Score OARSI des plateaux tibiaux et (B) des condyles fémoraux des pattes gauches et droites des rats contrôles et traités à l'Aflibercept. La patte droite a subi une déstabilisation du ménisque médial (DMM) et une méniscectomie partielle (men.). La patte gauche est laissée intacte. Le score OARSI est compris entre 0 et 24. (C) Images représentatives des coupes histologiques colorées à la Safranine-O/Fast Green. PT : plateau tibial, CF : condyle fémoral, M : ménisque, * : ostéophyte, tête de flèche : remodelage osseux. (n=7) (Objectif x4)

C



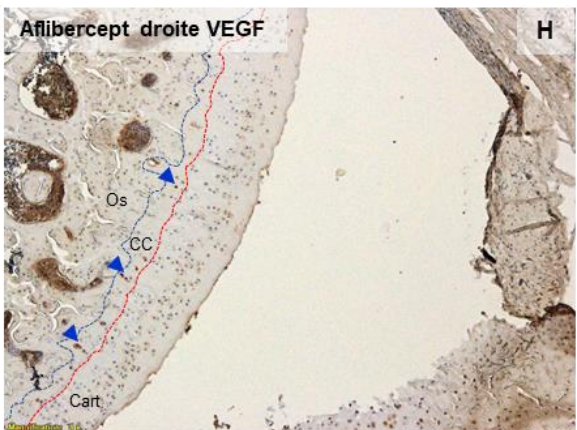
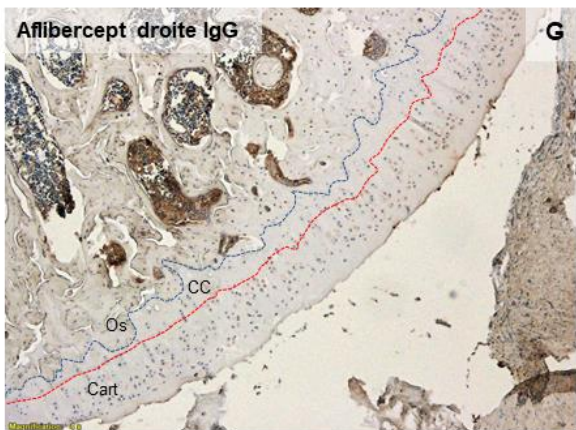
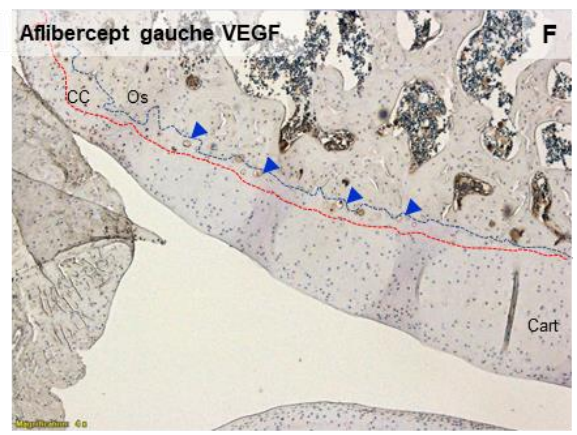
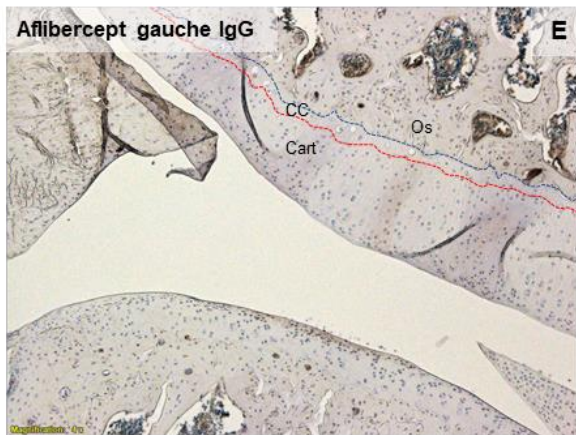
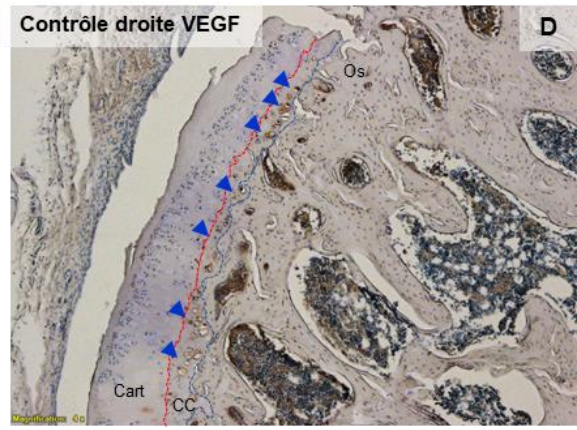
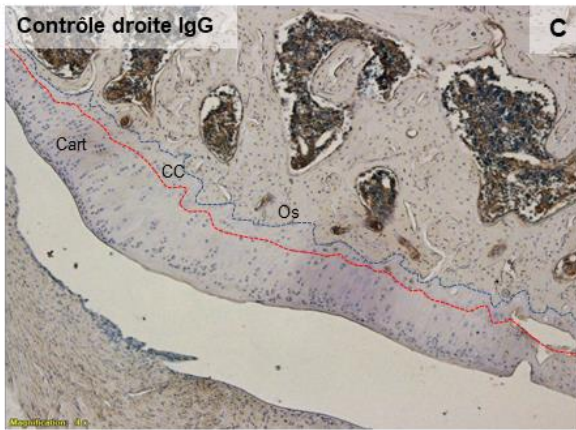
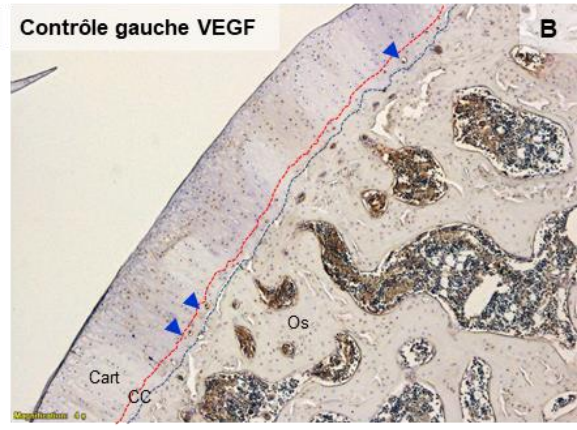
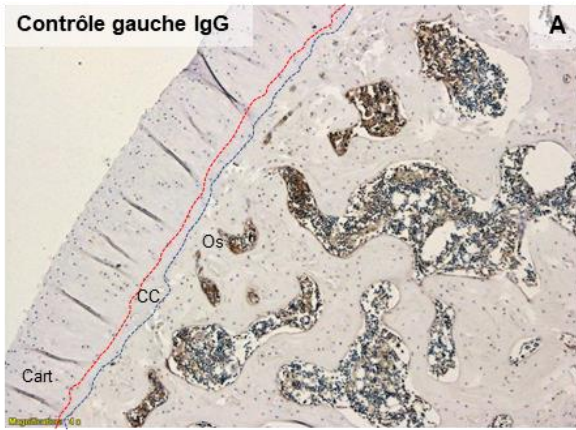
1.2. Implication des chondrocytes hypertrophiques dans l'inhibition de l'angiogenèse

Les chondrocytes hypertrophiques, présents dans le cartilage calcifié, produisent du VEGF, comme le montre l'immunomarquage du VEGF sur les coupes histologiques de rats traités ou non par l'Aflibercept (**Figure 46**). Les pattes droites opérées (DMM + méniscectomie) de rats contrôle montrent davantage de chondrocytes VEGF⁺ dans le cartilage calcifié que les pattes gauches non opérées des rats contrôle (**Figure 46 A- D**). Cette augmentation de la quantité de cellules VEGF⁺ entre les pattes opérées et non opérées n'est pas observée chez les rats traités à l'Aflibercept (**Figure 46 E- H**).

Les vaisseaux sanguins de la jonction ostéochondrale présentent un phénotype de vaisseaux de type H, contrairement aux vaisseaux de la diaphyse qui présentent un phénotype de vaisseaux de type L. Les vaisseaux H expriment fortement le VEGFR3, contrairement aux vaisseaux L. De plus, le récepteur au VEGFC est retrouvé en quantité importante dans la partie distale des vaisseaux H, au plus proche de la jonction ostéochondrale, tandis qu'il est peu présent dans les vaisseaux H en colonne (Langen et al. 2017). Nous avons donc détecté la présence de chenaux vasculaires par un immunomarquage de VEGFR3. Ainsi, des chenaux vasculaires, traversant la tidemark peuvent être observés sur les coupes histologiques des pattes arthrosiques des rats contrôle, tandis qu'aucun chenal vasculaire atteignant le cartilage articulaire n'est observé sur les pattes non arthrosiques des rats contrôle (**Figure 46 I, J**).

Lorsque les rats sont traités à l'Aflibercept, peu de vaisseaux VEGFR3⁺ traversant la tidemark sont observés (**Figure 46 L**). Notons que certains clusters de chondrocytes sont également VEGFR3⁺ au niveau du cartilage articulaire arthrosique des rats contrôle (**Figure 46 K**). Néanmoins, un comptage précis du nombre de cellules VEGF⁺ et des chenaux vasculaires VEGFR3⁺ est nécessaire pour confirmer l'inhibition de l'angiogenèse ostéochondrale par l'Aflibercept et l'implication des chondrocytes hypertrophiques dans l'angiogenèse du cartilage.

Ainsi, nous avons montré que l'Aflibercept limitait la sévérité de l'arthrose induite chirurgicalement dans un modèle de rat. Cependant, l'arthrose n'est pas totalement inhibée par l'Aflibercept, puisque les pattes opérées présentent un score OARSI significativement plus élevé que les pattes non opérées. Ainsi, le VEGF ne constituerait pas le seul médiateur impliqué dans l'angiogenèse et malgré son inhibition, d'autres facteurs pourraient intervenir et favoriser l'angiogenèse pathologique à la jonction ostéochondrale.



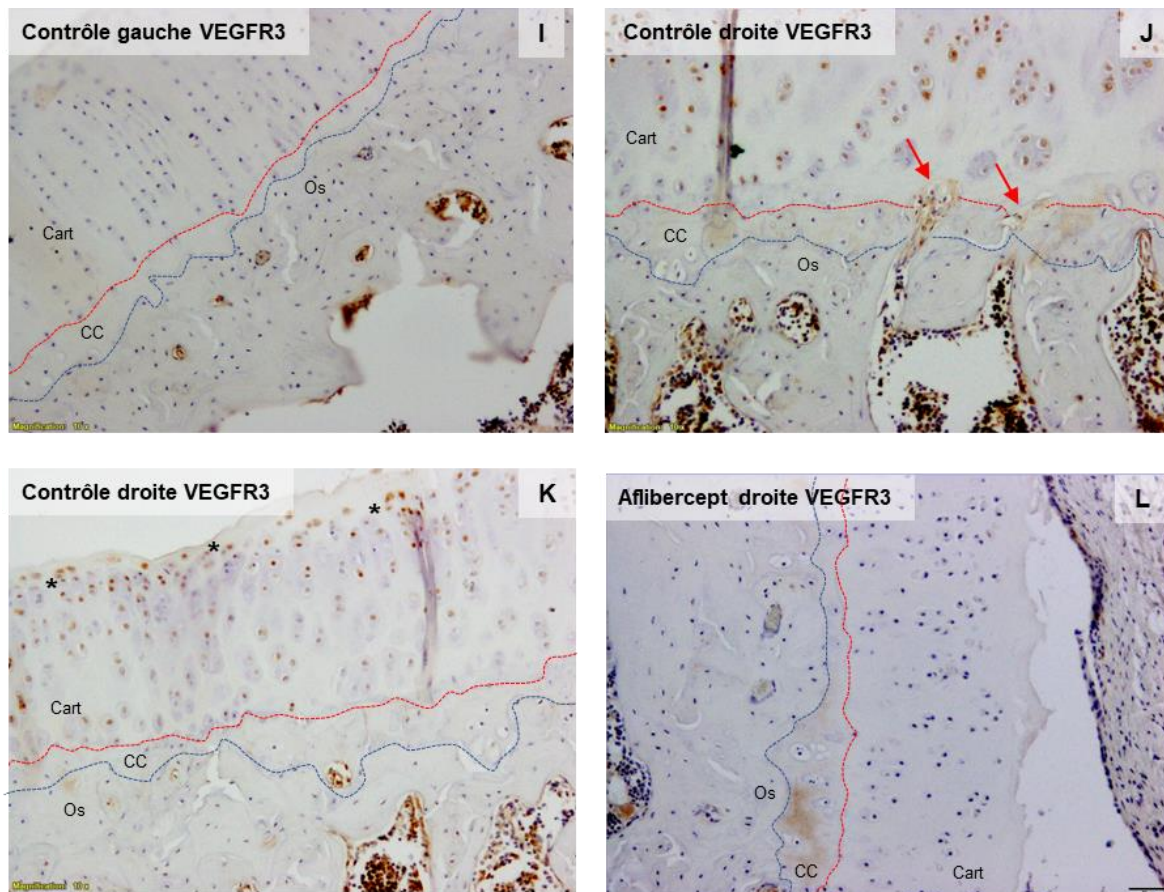


Figure 46. Expression de VEGF et de VEGFR3 à la jonction ostéocondrale des pattes de rats. Immunohistochimies de VEGF (A-H) et de VEGFR3 (I-L) sur des coupes de genoux gauche et opérés (DMM + ménisectomie) de rats traités ou non à l'Aflibercept. Les chondrocytes hypertrophiques sont positifs au VEGF (B, D, F et H). Aucun marquage n'est observé dans sur les coupes incubées avec un IgG contrôle (A, C, E et G) (Objectif x4). Les canaux vasculaires sont détectés par l'immunomarquage du VEGFR3 (I, J, K et L) (Objectif x10). Cart : cartilage ; CC : cartilage calcifié ; Os : os sous-chondral ; Tête de flèche : marquage positif pour VEGF, flèche : marquage positif pour VEGFR3 au niveau des canaux vasculaires. * : marquage positif pour VEGFR3 au niveau des chondrocytes ; ligne rouge : tidemark séparant le cartilage articulaire du cartilage calcifié ; ligne bleue : ligne cimentante séparant le cartilage calcifié de l'os sous-chondral.

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'angiogenèse ostéocondrale et d'étudier l'implication des chondrocytes de la jonction ostéocondrale dans la vascularisation pathologique du cartilage, nous avons utilisé un modèle murin de différenciation progressive de chondrocytes articulaires en chondrocytes hypertrophiques. Ce modèle *in vitro* permet d'investiguer le rôle des chondrocytes dans la physiopathologie de l'arthrose et d'identifier des potentielles cibles impliquées dans l'angiogenèse ostéocondrale, qui pourront être par la suite cribler sur le modèle *in vivo* d'arthrose.

2. Caractérisation moléculaire des chondrocytes hypertrophiques issus d'un nouveau modèle de différenciation progressive

2.1. Modèles *in vitro* de différenciation hypertrophique de chondrocytes : données bibliographiques

De nombreux modèles cellulaires de chondrocytes hypertrophiques ont été mis au point depuis plusieurs dizaines d'années. Ces modèles *in vitro* ont été développés pour pouvoir étudier le devenir des chondrocytes de la plaque de croissance, les mécanismes de la croissance osseuse et de la minéralisation du cartilage au cours de l'ossification endochondrale. Ces différents modèles de différenciation hypertrophique de chondrocytes, qu'ils soient issus de cultures primaires ou de lignées, spontanés ou induits par un stress inflammatoire, une structure en tridimensionnelle ou d'autres facteurs favorisant l'hypertrophie, ne suffisent cependant pas pour étudier la transition phénotypique des chondrocytes de la couche profonde du cartilage articulaire aux chondrocytes hypertrophiques du cartilage calcifié. En effet, bien que ces modèles aboutissent à l'obtention de chondrocytes hypertrophiques, selon différents critères de caractérisation, très peu passent par l'acquisition d'un phénotype transitoire pré-hypertrophique.

Les premiers modèles de chondrocytes hypertrophiques ont été développés à partir de culture primaire de chondrocytes de cartilage de croissance isolés des côtes de rats ou de lapins, ou isolés de l'épiphyse tibial de poulets. Shimomura *et al.* ont montré que les chondrocytes de la plaque de croissance, une fois cultivés puis transplantés dans la cavité intrapéritonéale de rats hôtes, possédaient un potentiel ostéogénique important, par rapport à des chondrocytes quiescents (Shimomura, Yoneda, et Suzuki 1975). Jikko *et al.* ont montré que les chondrocytes de la plaque de croissance se minéralisaient fortement *in vitro* en association avec la différenciation terminale des chondrocytes (Jikko et al. 1993). En plus de l'induction d'une matrice minéralisée, Wu *et al.* caractérisent le contenu protéique de la matrice extracellulaire et montrent que l'hypertrophie des chondrocytes est associée à une synthèse de collagène de type X (L. N. Wu et al. 1989). Ces premiers modèles de différenciation induite par l'ajout d'acide ascorbique dans les milieux de culture, ont permis à leurs auteurs d'obtenir des chondrocytes dont l'hypertrophie était principalement identifiée par la minéralisation des cultures cellulaires et la synthèse de collagène. Les chondrocytes isolés du cartilage de croissance sans distinction des différentes zones et donc des différents stades de différenciation existants ne sont pas compatibles avec une caractérisation précise des différents phénotypes de chondrocytes.

Un modèle d'hypertrophie obtenu à partir d'une lignée cellulaire chondrogénique murine, la lignée ATDC5 (Shukunami et al. 1997) issue d'un tératocarcinome (Atsumi et al. 1990) permet l'obtention de chondrocytes hypertrophiques sous forme de nodules, sans ajout d'acide ascorbique ou de β -glycérophosphate au milieu de culture. Ainsi, après induction d'une différenciation chondrogénique par un milieu de culture enrichi en insuline/transferrine/sodium sélénite (ITS), les chondrocytes acquièrent spontanément un phénotype hypertrophique, notamment grâce à une teneur en CO_2 passant de 5 à 3%. Les chondrocytes de la lignée ATDC5 initient la minéralisation de leur matrice sans apport de facteurs favorisant l'hypertrophie et font partie des modèles de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires de la différenciation hypertrophique et l'ossification endochondrale (G. Wang et al. 2004). Néanmoins, un modèle de différenciation hypertrophique basé sur de la culture primaire s'avère nécessaire pour pouvoir répondre à de nombreuses questions de physiopathologie.

D'autres modèles de différenciation se basent sur des cultures primaires de chondrocytes, soumis à des stress inflammatoires pour induire l'hypertrophie. Ainsi, l'IL-1 β ou le TNF- α sont utilisés pour induire l'expression de marqueurs de l'hypertrophie, comme la MMP-13, la phosphatase alcaline et le collagène de type X et l'inhibition d'expression de marqueurs chondrocytaires comme le collagène de type II ou l'agrécan (M. B. Goldring et al. 2011). Cependant, ces chondrocytes ne minéralisent pas leur matrice extracellulaire. Ainsi, s'ils acquièrent un phénotype décrit comme « *hypertrophic-like* », ils ne sont pas réellement considérés comme engagés dans la voie de l'hypertrophie.

Des modèles de cultures de chondrocytes plus complexes ont été établis, notamment des systèmes de culture en trois dimensions, afin de recréer un environnement plus conforme au microenvironnement des chondrocytes dans le cartilage. Les chondrocytes peuvent être cultivés en culot (Yahara et al. 2016), dans des gels d'agarose (Hunter, Holmyard, et Pritzker 1993), de collagène (Chaipinyo, Oakes, et van Damme 2002), des billes d'alginate (L. Pesesse et al. 2013) ou des matrices synthétiques appelées « *scaffold* » (Sun, Wang, et Kaplan 2011). Ces cultures tridimensionnelles présentent un avantage par rapport à la culture en monocouche, qui est de maintenir le phénotype différencié des chondrocytes en favorisant un contenu en collagène de type II et en GAG (T. Takahashi et al. 2007). En effet, la dédifférenciation des chondrocytes en culture conventionnelle, résultant en l'acquisition d'un phénotype « *fibroblast-like* », est un phénomène connu depuis de nombreuses années, qui rend la culture de chondrocytes plus complexe qu'avec un autre type cellulaire moins sujet à la perte de son phénotype différencié (Mayne et al. 1976). Néanmoins, bien que la culture 3D, en culot ou dans des billes d'alginate,

permette de redifférencier des chondrocytes dédifférenciés grâce à un important potentiel chondrogénique, la culture en monocouche reste plus efficace pour atteindre l'hypertrophie chondrocytaire (Caron et al. 2012).

Des modèles d'hypertrophie utilisant des cellules souches ont également été proposés. Des cellules souches mésenchymateuses en culot, isolées à partir de moelle osseuse de fémur de patients, sont préalablement différenciées en chondrocytes grâce à un milieu chondrogénique riche en acide ascorbique, dexaméthasone et TGF β , puis différenciées en chondrocytes hypertrophiques, grâce à de l'hormone T3 et du β -glycérophosphate (Mueller et Tuan 2008). Ces chondrocytes produisent une matrice extracellulaire minéralisée et expriment des marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire. Cependant, la présence de cellules présentant un phénotype « *fibrocartilage-like* » dans les cultures, visible par une expression en collagène de type I, indique une infiltration de cellules périphériques de type fibroblastique, entourant les culots cellulaires.

Enfin, un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes articulaires isolés à partir de têtes fémorales de rats a été mis au point il y a quelques années (Filip et al. 2015). Les chondrocytes cultivés en monocouche dans un milieu chondrogénique contenant de la transferrine et du sodium sélénite, sont différenciés en chondrocytes hypertrophiques grâce à l'ajout d'insuline et d'acide ascorbique dans le milieu de culture. Cependant, l'hypertrophie des chondrocytes n'a été étudiée que par qPCR et aucune donnée sur l'état de minéralisation n'est disponible (Filip et al. 2015).

Ces différents modèles ont contribué à la compréhension des mécanismes régulant la différenciation des chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale. Ils ont également permis d'étudier la différenciation hypertrophique des chondrocytes dans un contexte pathologique comme l'arthrose. Cependant, ces modèles présentent des limites et des inconvénients qui rendent leur utilisation incompatible avec une caractérisation moléculaire ou fonctionnelle précise des phénotypes de chondrocytes du cartilage. C'est pourquoi il apparaissait nécessaire de développer un nouveau modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes, afin d'étudier de manière plus précise les différents phénotypes chondrocytaires et ainsi pouvoir mettre en évidence des acteurs moléculaires impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale. Ce nouveau modèle de différenciation progressive de chondrocytes articulaires murins se base sur une caractérisation moléculaire précise des différents phénotypes de chondrocytes induits mais également sur l'acquisition d'une minéralisation de la matrice

extracellulaire au stade terminal de différenciation, indispensable pour identifier le phénotype hypertrophique.

Ce modèle a fait l'objet de nombreuses années de travail au sein de notre laboratoire de recherche. L'optimisation de son protocole expérimental a fait partie du travail de thèse de Sandy van Eegher et sa caractérisation, notamment de sa matrice extracellulaire est au cœur de projets de thèse actuel et à venir. A mon arrivée au laboratoire, je me suis familiarisée à ce modèle en contribuant à sa caractérisation, en réalisant des qPCR et des ELISA pour la finalisation de l'article scientifique présentant le modèle. J'ai par la suite appliqué ce modèle et réalisé de nombreuses cultures de chondrocytes hypertrophiques afin de le caractériser d'un point de vue fonctionnel et de mieux comprendre l'implication des différents phénotypes de chondrocytes dans le remodelage de la jonction ostéochondrale.

2.2. Etude du profil d'expression génique des chondrocytes issus d'un nouveau modèle de différenciation progressive

2.2.1. Validation de l'utilisation d'un nouveau modèle de différenciation de chondrocytes

L'article relatant le développement de ce nouveau modèle de différenciation de chondrocytes murins et sa caractérisation moléculaire a été publié cette année dans le journal « *Osteoarthritis & Cartilage* » (van Eegher et al. 2021). Ce modèle repose sur la culture de chondrocytes articulaires immatures, les iMAC, dans un milieu chondrogénique (milieu n°1) pendant 7 jours, selon un protocole préalablement mis au point par notre équipe (Gosset et al. 2008; Salvat et al. 2005) et sur la différenciation progressive des iMAC en chondrocytes pré-hypertrophiques (Prehyp) pendant 28 jours, grâce à un milieu de différenciation n°2, puis en chondrocytes hypertrophiques (Hyp), en continuant la culture pendant 42 jours, dans un milieu de différenciation n°3 (**Figure 47 A**). Ainsi, ce modèle permet d'obtenir trois phénotypes de chondrocytes en 77 jours de culture.

Ce modèle de différenciation progressive se base sur une analyse transcriptomique (**Figure 47 B-N**) ainsi que sur l'état de minéralisation de la matrice extracellulaire (**Figure 47 O-P**) des différents phénotypes de chondrocytes induits avec les trois milieux de culture. Les chondrocytes articulaires immatures présentent un phénotype caractéristique des chondrocytes articulaires, marqué par l'expression de marqueurs chondrocytaires comme Col2a1, Acan, Sox9 et Chm1 et par l'absence quasi-totale d'expression de marqueurs de l'hypertrophie

chondrocytaire, tels que Tnap, Runx2, ostérix, Col10a1, Mmp13 et ostéocalcine. Les iMAC montrent également une faible activité phosphatase alcaline et aucun signe de calcification de la matrice. La culture des iMAC dans les milieux de différenciation n°2 puis n°3 induit une diminution progressive de l'expression des marqueurs chondrocytaires Col2a1, Acan, Sox9 et Chm1. A l'inverse, l'expression en ARNm des marqueurs de l'hypertrophie Tnap, Runx2, ostérix, Mmp13 et ostéocalcine est stimulée par la culture avec le milieu de différenciation n°2. L'expression en ARNm de Runx2, Col10a1 et ostéocalcine augmente encore après culture des cellules dans le milieu de différenciation n°3. L'activité phosphatase alcaline suit le profil d'expression de la Tnap et est augmentée par la culture dans les milieux n°2 et n°3. Par contre, la calcification de la matrice extracellulaire n'a été observée qu'avec les cellules cultivées dans le milieu 3. Les cellules cultivées dans le milieu n°2 expriment à la fois des marqueurs chondrocytaires et des marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire et ne minéralisent pas leur matrice extracellulaire. Elles expriment également des marqueurs de chondrocytes pré-hypertrophiques comme Ihh, Snorc et ostéomoduline, et ont tendance à exprimer ces deux derniers marqueurs de manière plus importante que les iMAC et les chondrocytes obtenus après culture en milieu n°3.

Ainsi, ce modèle permet de différencier progressivement des iMAC en chondrocytes hypertrophiques avec le passage par un phénotype intermédiaire de chondrocytes pré-hypertrophiques. Nous nous intéressons particulièrement à la dernière étape de différenciation, le passage du phénotype pré-hypertrophique au phénotype hypertrophique.

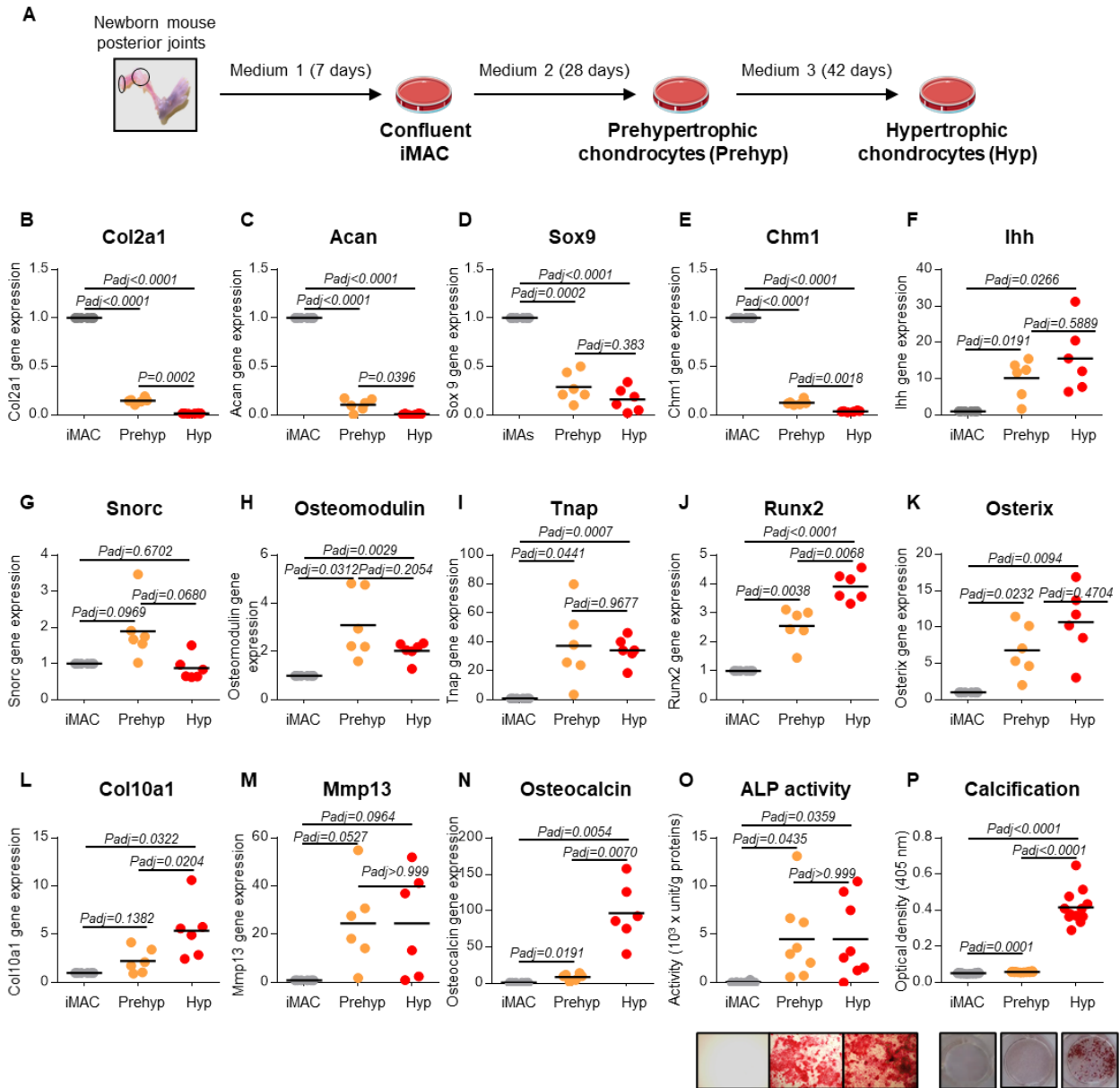


Figure 47. Caractérisation du profil d'expression génique de marqueurs chondrocytaires et de différenciation hypertrophique des chondrocytes issus du modèle de différenciation progressive. (A) Protocole expérimental du modèle de différenciation progressive. (B-E) Expression génique de marqueurs chondrocytaires. (F-H) Expression génique de marqueurs pré-hypertrophiques. (I-N) Expression génique de marqueurs de l'hypertrophie. L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression par rapport aux iMAC, dont l'expression est normalisée à 1 (n=6). (O) Mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (n=8) et images représentatives. (P) Quantification de la minéralisation des matrices extracellulaires de chondrocytes après coloration au rouge d'Alizarine (n=12) et images représentatives. D'après (van Eggher et al. 2021) (modifiés).

2.2.2. Expression génique de facteurs impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale

Afin d'approfondir la caractérisation du modèle de différenciation et plus particulièrement le passage du stade pré-hypertrophique au stade hypertrophique, les signatures transcriptomiques des chondrocytes pré-hypertrophiques et des chondrocytes hypertrophiques ont été explorées par des méthodes génomiques à haut débit.

En ne prenant en compte que les gènes différenciellement exprimés entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et les chondrocytes hypertrophiques, avec un « *fold change* » supérieur à 1,3 et une p-value inférieure à 0,05, cette analyse microarray a identifié 5308 gènes différenciellement exprimés entre les deux derniers stades de différenciation. Parmi ces gènes, 2338 étaient surexprimés par les chondrocytes pré-hypertrophiques et 2970 par les chondrocytes hypertrophiques (**Figure 48 A**). Une analyse globale ciblée sur les grandes fonctions et les pathologies liées l'arthrose montre que les chondrocytes hypertrophiques, contrairement aux chondrocytes pré-hypertrophiques, activent plusieurs grandes fonctions, comme celles liées à la différenciation osseuse, à l'angiogenèse et à la dégradation des tissus (**Figure 48 B**).

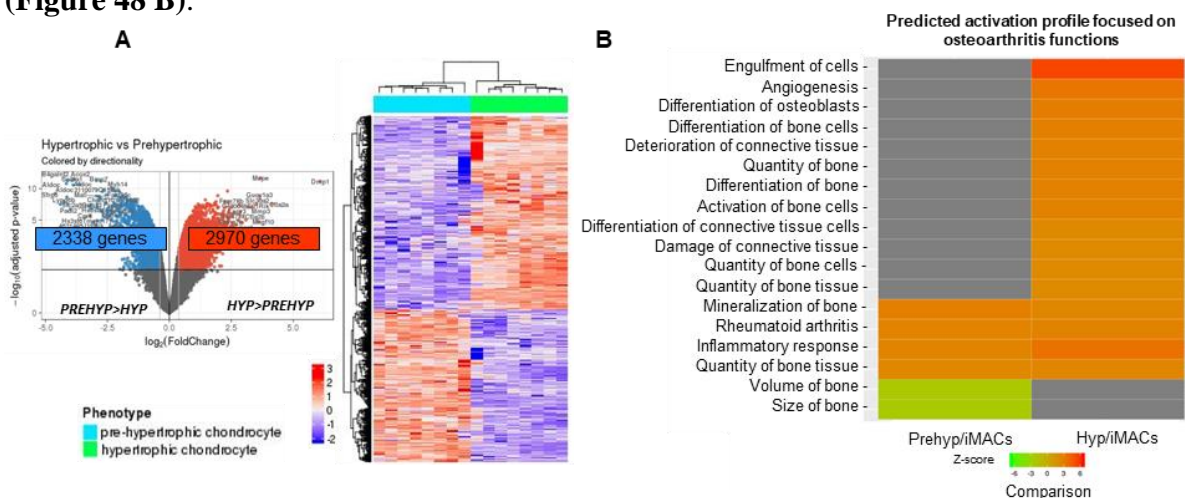


Figure 48. Caractérisation transcriptomique du génome entier des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques issus du modèle de différenciation progressive. Résultats de l'analyse des gènes différenciellement exprimés entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques (A) Vulcano plot des données du microarray. Chaque point représente un gène donné suivant sa p-value ($-\log_{10}$) et son « *fold change* » (\log_2) ($n=8$). (B) Fonctions ou pathologies liées à l'arthrose représentées dans le modèle de différenciation. Les fonctions dont le Z-score est inférieur à -2 sont prédites comme étant inhibées, tandis que les fonctions avec un Z-score supérieur à 2 sont prédites comme étant activées. D'après (van Eegher et al. 2021) (modifiés).

Les résultats apportés par l'analyse transcriptomique par microarray semblent montrer que la différenciation des chondrocytes pré-hypertrophiques en chondrocytes hypertrophiques induit une forte dérégulation transcriptionnelle, dont une augmentation des voies associées au remodelage osseux et à l'angiogénèse.

Ces données sont en adéquation avec des données obtenues par une analyse transcriptionnelle par qPCR. En effet, au cours de la dernière étape de différenciation de notre modèle, de nombreux gènes liés au remodelage de la jonction ostéochondrale sont surexprimés. Ainsi, le passage du stade pré-hypertrophique au stade hypertrophique s'accompagne d'une expression accrue de protéases matricielles (Mmp3) (**Figure 49 A**), de facteurs liés aux ostéoblastes (Bmp2 et Bmp4) (**Figure 49 B**), de facteurs liés aux ostéoclastes (ratio Rankl/Opg, Ccl2 et Ccl4) (**Figure 49 C**), de facteurs pro-angiogéniques (Vegfa, Vegfc, Cxcl12, Sphk1 et bFGF) (**Figure 49 D**) et d'une diminution de facteurs anti-angiogéniques (Chm1 et Angptl4) (**Figure 49 E**). Cependant, certains gènes ne sont pas dérégulés (Mmp13, Adamts4, Adamts5 et Tgfb1) entre le stade pré-hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes (**Figure 49 A**,

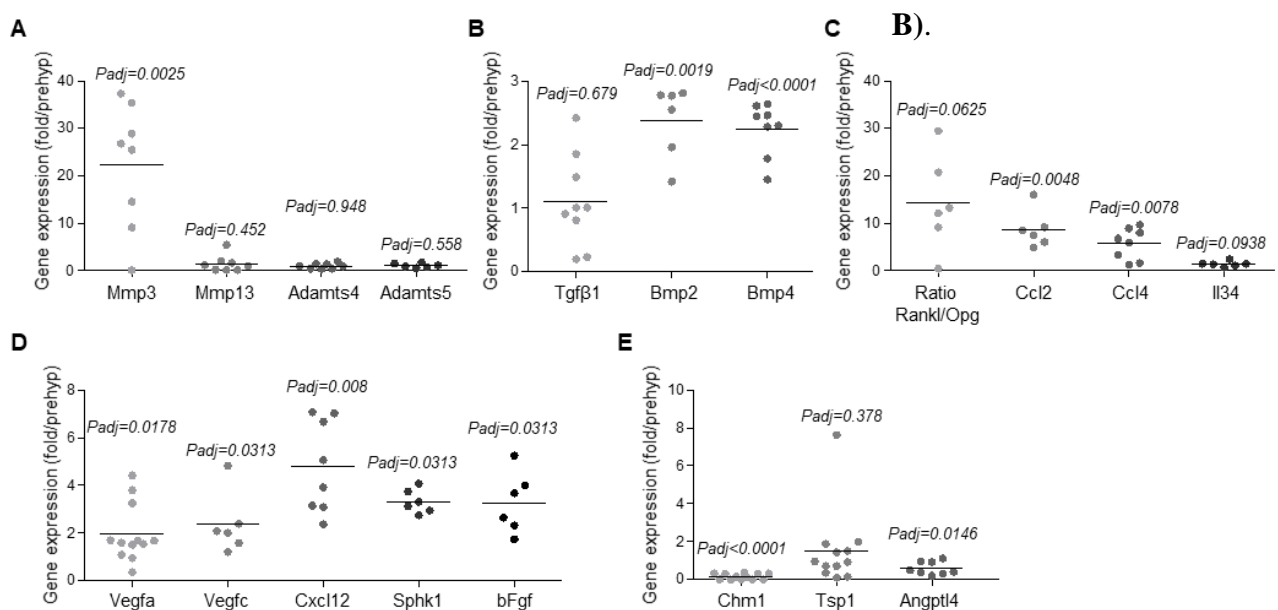


Figure 49. Expression génique de facteurs liés au remodelage de la jonction ostéochondrale. L'expression relative de chaque gène est exprimée comme l'induction d'expression par rapport aux chondrocyte pré-hypertrophiques, dont l'expression est normalisée à 1 (n=6 à 12). (A) Expression génique de protéases matricielles. (B) Expression génique de facteurs liés aux fonctions des ostéoblastes. (C) Expression génique de facteurs liés à l'activité des ostéoclastes. (D) Expression génique de facteurs pro-angiogéniques. (E) Expression génique de facteurs anti-angiogéniques. D'après (van Eegher et al. 2021) (modifiés).

En conclusion, ce modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes murins en culture primaire génère trois phénotypes distincts de chondrocytes, les iMAC, les chondrocytes pré-hypertrophiques et les chondrocytes hypertrophiques, que l'on peut comparer aux chondrocytes des zones superficielle et intermédiaire pour les chondrocytes iMAC, aux chondrocytes de la zone profonde du cartilage articulaire pour les chondrocytes pré-hypertrophiques et, pour les chondrocytes hypertrophiques, aux chondrocytes du cartilage calcifié et à ceux devenant hypertrophiques dans les cartilages arthrosiques. L'acquisition d'un phénotype intermédiaire, le stade pré-hypertrophique, dissemblable des phénotypes articulaire et hypertrophique, est novateur puisqu'il n'a jamais été décrit dans d'autres modèles *in vitro*. Ainsi, ce modèle récapitule l'expression séquentielle des gènes caractérisant la différenciation chondrocytaire puis hypertrophique.

De plus, l'expression de facteurs impliqués dans des processus de remodelage tissulaire varie selon le stade de différenciation des chondrocytes. Les chondrocytes hypertrophiques expriment davantage certains facteurs favorisant l'ostéoclastogenèse et l'angiogenèse, que les chondrocytes pré-hypertrophiques. Ainsi, la différenciation des chondrocytes pré-hypertrophiques en chondrocytes hypertrophiques pourrait conférer aux chondrocytes une activité angiogénique et ostéoclastogénique, leur donnant un rôle orchestrateur dans les remodelages tissulaires pathologiques qui ont lieu au cours de l'arthrose.

Un des objectifs de mon travail de thèse a donc été d'étudier le rôle biologique des chondrocytes hypertrophiques dans le remodelage de la jonction ostéochondrale en caractérisant d'un point de vue fonctionnel les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Plusieurs aspects du remodelage de la jonction ostéochondrale ont été étudiés, comme l'angiogenèse ostéochondrale et la résorption osseuse nécessaire à l'invasion vasculaire. Ce travail a consisté à comparer les capacités angiogénique et ostéoclastogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques afin de mieux comprendre leurs rôles dans le remodelage de la jonction ostéochondrale. Pour cela, j'ai réalisé des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques afin de stimuler d'autres types cellulaires avec des facteurs produits et sécrétés par les chondrocytes. Les matrices extracellulaires des chondrocytes ont également été utilisées afin d'étudier le rôle des facteurs produits par les chondrocytes mais stockés dans leur matrice.

3. Caractérisation fonctionnelle de la conséquence de la différenciation hypertrophique des chondrocytes pré-hypertrophiques

3.1. Stimulation de l'ostéoclastogenèse par les chondrocytes hypertrophiques

Les chondrocytes hypertrophiques présentent un profil génique suggérant qu'ils pourraient participer à la dégradation du cartilage mais également à la résorption osseuse observée à des stades précoces d'arthrose et nécessaire à l'invasion vasculaire.

Afin de déterminer l'implication potentielle des chondrocytes dans le processus de résorption osseuse induite par les ostéoclastes, nous nous sommes intéressés au rôle des chondrocytes dans la différenciation de monocytes en ostéoclastes. Les résultats présentés ci-dessous font suite à une collaboration que nous avons initiée avec le Dr Éric Hay de l'unité de recherche BIOSCAR – Biologie de l'os et du cartilage (U1132) de l'hôpital Lariboisière (Paris).

Au cours de ces expériences d'ostéoclastogenèse, des monocytes de la lignée murine RAW 264.7 ont été différenciés en ostéoclastes suite à une stimulation par du RANKL ou par des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinuclées caractérisées par une activité enzymatique des phosphatases acides tartrates résistantes (TRAP). L'évaluation de l'ostéoclastogenèse induite par les chondrocytes a donc été évaluée par un comptage des cellules multinuclées positives au marquage TRAP. Le facteur RANKL est utilisé ici comme contrôle positif de différenciation ostéoclastogénique et permet de différencier en moyenne 5,8% des monocytes, contre 0% si les monocytes ne sont pas stimulés avec du RANKL. Les milieux conditionnés de chondrocytes n'ont pas été supplémentés en RANKL mais avec 5% de SVF afin d'éviter la mortalité cellulaire. Les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques présentent une activité ostéoclastogénique comparable à celle du RANKL, avec 5,2% de monocytes différenciés en ostéoclastes. Les chondrocytes hypertrophiques possèdent également une activité ostéoclastogénique, cependant celle-ci est nettement supérieure à l'activité des chondrocytes pré-hypertrophiques, mais également à celle du RANKL, avec 9,3% de monocytes différenciés en ostéoclastes (**Figure 50 A, B**).

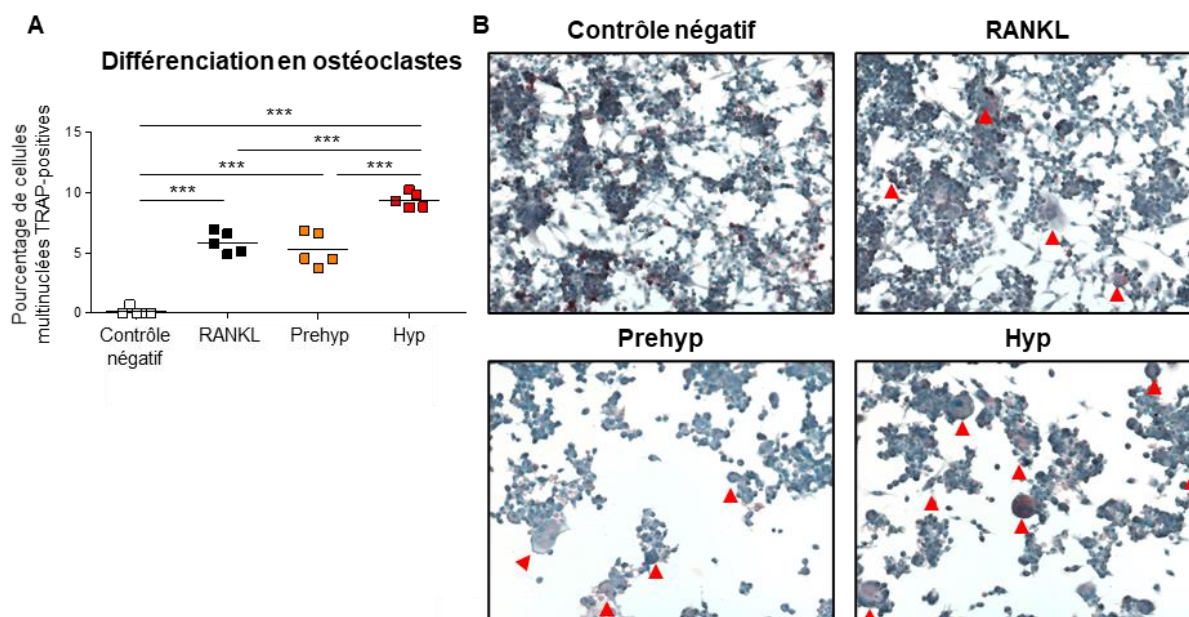


Figure 50. Différenciation de monocytes RAW 264.7 en ostéoclastes, suite à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes. (A) Pourcentage de cellules multinuclées TRAP-positives (ostéoclastes) suite à une stimulation par un contrôle négatif, du RANKL (100 ng/mL), ou des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. (n=5) (B) Images représentatives de la différenciation de monocytes en ostéoclastes. Les têtes de flèches rouge indiquent l'emplacement d'un ostéoclaste. 5 champs par puits ont été photographiés et comptés (objectif x20).

Pour conclure, nous observons une différence dans la réponse ostéoclastogénique des monocytes aux milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Les deux milieux conditionnés favorisent la différenciation des monocytes en ostéoclastes, néanmoins les monocytes se différencient davantage en ostéoclastes lorsqu'ils sont stimulés avec des milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques. L'effet des milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques est d'ailleurs 1,6 fois supérieur à l'effet induit par le RANKL, suggérant que les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques contiennent du RANKL en plus fortes concentrations et/ou d'autres facteurs supplémentaires, qui en combinaison ou non avec RANKL, seraient à l'origine des effets observés sur la différenciation ostéoclastogénique des monocytes.

Les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques produisent et sécrètent donc des médiateurs qui ont une action biologique, notamment dans la différenciation ostéoclastogénique. Avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes, cet effet ostéoclastogénique est renforcé. Ainsi, les chondrocytes hypertrophiques contribueraient

davantage à la résorption osseuse, nécessaire à la progression des chenaux vasculaires dans les matrices minéralisées, que les chondrocytes pré-hypertrophiques.

3.2. Régulation de l'angiogenèse par les chondrocytes hypertrophiques

3.2.1. Mécanismes de l'angiogenèse : données bibliographiques

La formation et le développement du système vasculaire constituent un processus complexe hautement régulé, ayant lieu au cours de l'embryogenèse mais également lors de la vie post-natale et adulte, qui résulte de plusieurs phénomènes successifs : la vasculogenèse et l'angiogenèse (Pepper 2000).

Au cours du développement embryonnaire, la formation du système cardiovasculaire débute par la vasculogenèse. Ce processus donne naissance à un réseau primitif de structures vasculaires par différenciation de cellules endothéliales *in situ*, à partir de précurseurs mésenchymateux, les angioblastes. Brièvement, des cellules souches mésenchymateuses dérivées du mésoderme se différencient en hémangioblastes, à l'origine des cellules souches hématopoïétiques et des angioblastes. Les angioblastes acquièrent par la suite un profil artériel ou veineux par des régulations d'expression de gènes et de facteurs hémodynamiques et s'organisent en vaisseaux sanguins primitifs intra ou extra-embryonnaire (E. A. V. Jones, le Noble, et Eichmann 2006).

L'angiogenèse désigne l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires nécessaires à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse permet de complexifier le réseau primitif et ainsi d'établir un réseau vasculaire mature et fonctionnel. Plusieurs types d'angiogenèse ont été décrits, comme l'angiogenèse par intussusception et l'angiogenèse par bourgeonnement ou « *sprouting angiogenesis* » (**Figure 51 A, B**) (Adams et Alitalo 2007; Treps et Gavard 2015). L'angiogenèse par bourgeonnement consiste en une succession d'étapes finement régulées d'activation, de migration et de prolifération des cellules endothéliales en réponse à des stimuli du microenvironnement, avec la mise en place d'un bourgeon vasculaire qui migre et s'étend dans une matrice extracellulaire interstitielle. Les différentes étapes de ce processus sont régulées par des signaux pro-angiogéniques et anti-angiogéniques qui garantissent la formation de vaisseaux fonctionnels. La molécule la plus importante dans le contrôle de la morphogenèse des vaisseaux sanguins est le VEGFA, qui fait partie d'une grande famille de molécules qui régulent l'angiogenèse, incluant le PlGF, le VEGFB, le VEGFC et le VEGFD.

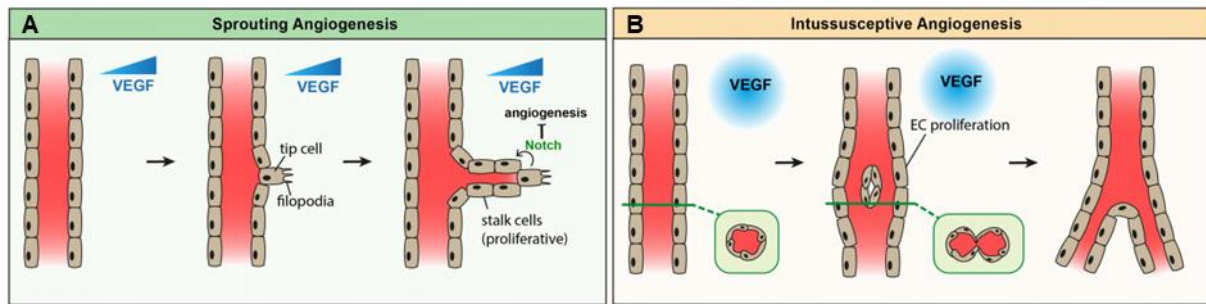


Figure 51. Comparaison des différents modes d'angiogenèse. (A) L'angiogenèse par bourgeonnement ou « *sprouting angiogenesis* » implique la formation d'une cellule spécifique, la « *tip cell* » présentant des filopodes, en réponse à un gradient de VEGFA. En amont, des « *stalk cells* » prolifèrent pour allonger le nouveau bourgeon vasculaire. La signalisation Notch dans la *tip cell* inhibe la formation d'autres *tip cells*. (B) L'angiogenèse par intussusception passe par la prolifération de cellules endothéliales, en réponse à des niveaux élevés de VEGFA, conduisant à la séparation d'un vaisseau en deux structures vasculaires. D'après (Hendriks et Ramasamy 2020)

a. Mécanismes de l'angiogenèse par bourgeonnement

La sélection des « *tip cells* » et des « *stalk cells* »

La première étape de l'angiogenèse correspond à l'activation et à la sélection de cellules endothéliales, qui assureront l'initiation de la formation d'un nouveau vaisseau sanguin (**Figure 52**).

Les péricytes sont des cellules périvasculaires, principalement localisées autour des microvaisseaux (capillaire, artériole, veinule), qui stabilisent les vaisseaux et contribuent à leur quiescence. Suite à un signal pro-angiogénique libéré par des cellules en hypoxie ou inflammatoires, les péricytes se détachent de la membrane basale qu'ils partagent avec les cellules endothéliales de la paroi vasculaire. En réponse à l'angiopoïétine-2 (Ang-2), les péricytes dégradent donc la membrane basale grâce à la production de MMP. Les cellules endothéliales perdent alors leurs jonctions adhérentes, augmentant ainsi la perméabilité vasculaire (**Figure 52 A**) (Carmeliet et Jain 2011). Afin de former un nouveau vaisseau, certaines cellules endothéliales de la paroi d'un vaisseau préexistant se différencient soit en « *tip cells* » ou cellules de front soit en « *stalk cells* » ou cellules de soutien. Les *tip cells* se situent à l'extrémité du bourgeon endothélial et vont diriger la croissance du bourgeon vers la source du signal angiogénique, assurer le guidage du nouveau vaisseau ainsi que son anastomose avec d'autres vaisseaux adjacents. Les *tip cells* sont caractérisées par la présence de nombreux filopodes et par un phénotype migratoire. Les *stalk cells* sont présentes en amont du front de migration où elles assurent l'allongement et la stabilisation du vaisseau en

formation. Elles se caractérisent par un phénotype prolifératif et possèdent moins de filopodes que les *tip cells*. Les *stalk cells* assurent la formation de jonctions matures entre les cellules endothéliales du vaisseau, le dépôt d'une lame basale et la formation d'une lumière.

Les voies Notch et VEGF sont essentielles pour l'acquisition et le maintien des phénotypes des *tip cells* et des *stalk cells* (Phng et Gerhardt 2009). La stimulation du récepteur VEGFR2 par le VEGF à la surface des *tip cells* conduit à l'augmentation de la transcription du gène codant Dll4 (Delta-like ligand 4) par les *tip cells*. La protéine Dll4, un ligand de la voie Notch, présente à la surface des *tip cells* va alors interagir avec son récepteur Notch1 présent à la surface des *stalk cells* adjacentes. L'activation de la voie Notch dans les *stalk cells* entraîne l'augmentation de l'expression du récepteur VEGFR1 qui séquestre le VEGF environnant et la diminution de l'expression du VEGFR2 à la surface des *stalk cells*, empêchant ainsi la migration et le bourgeonnement des *stalk cells* (Jakobsson et al. 2010). Ce mécanisme permet donc que seules les *tip cells* puissent répondre au signal pro-angiogénique et empêche une ramification anarchique des vaisseaux en formation.

[La migration et le guidage cellulaire](#)

Suite à leur activation et sélection, les *tip cells* vont assurer le guidage du vaisseau en migrant dans la matrice extracellulaire environnante selon un gradient de VEGF vers le front hypoxique (**Figure 52 B**) (Gerhardt et al. 2003). Les *tip cells* acquièrent de nombreuses protrusions membranaires de type filopodes qui sont hautement dynamiques et qui sont impliquées dans la migration des cellules, tandis que les *stalk cells* assurent l'élongation du bourgeon endothélial. Les *tip cells* expriment à leur surface des récepteurs à des molécules de guidage cellulaire, comme les sémaphorines, les éphrines et les nétrines, qui induisent les mécanismes d'attraction ou de répulsion similaires à ceux impliqués dans la croissance axonale. La fixation de Nétrine-1 sur son récepteur UNC5B présent à la surface des *tip cells* conduit à un signal répulsif, tout comme la fixation de Sémaphorine-3 sur le récepteur Plexine D1 (Adams et Eichmann 2010; Larrivée et al. 2009).

L'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire environnante est indispensable pour la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Senger et Davis 2011). L'adhérence des cellules endothéliales, par un réseau d'intégrines présentes à leur surface, à la matrice extracellulaire est nécessaire pour l'activation des voies de signalisation Erk/MAP kinase impliquées dans la prolifération et l'angiogenèse (Short, Talbot, et Juliano 1998). L'adhérence à la matrice participe également à la survie des cellules

endothéliales, en inhibant leur apoptose (Aoudjit et Vuori 2001). La migration des cellules endothéliales est également dépendante de leur adhérence à une matrice et notamment de ses constituants (Perruzzi et al. 2003).

La fusion des bourgeons et la formation de la lumière

Suite à la prolifération des *stalk cells*, à l'élongation du bourgeon vasculaire et au guidage par les tip cells, deux bourgeons vasculaires vont entrer en contact par les filopodes de leurs tip cells, fusionner ensemble par anastomose et former un vaisseau connecté (**Figure 52 C**). Cette interaction entraîne la formation de la lumière du vaisseau. Plusieurs mécanismes permettent l'élaboration de la lumière du vaisseau, comme la formation et la fusion de larges vacuoles par pinocytose (Kamei et al. 2006). L'adhérence cellulaire à la matrice est également nécessaire pour la formation de la lumière du vaisseau, puisque la vacuolisation des cellules endothéliales repose sur une interaction entre intégrine $\beta 1$ et matrice extracellulaire (Zovein et al. 2010). L'expansion de la lumière se fait ensuite mécaniquement par la rétractation du cytosquelette.

La maturation et le flux sanguin

La dernière étape du processus d'angiogenèse par bourgeonnement est la maturation du vaisseau et l'établissement d'un flux sanguin (**Figure 52 D**). La maturation du vaisseau permet le rétablissement d'une barrière endothéliale. La voie de signalisation de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et de son récepteur Tie2 induit le renforcement des jonctions entre les cellules endothéliales ainsi que leur quiescence (Gavard, Patel, et Gutkind 2008). Un gradient de PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor-B) et de TGF- $\beta 1$ induit parallèlement le recrutement de péricytes, ainsi que le dépôt d'une nouvelle lame basale, assurant ainsi la maturation finale d'un vaisseau fonctionnel. Les cellules endothéliales et les péricytes interagissent ensemble et inhibent mutuellement leur prolifération et migration afin de stabiliser le vaisseau (Chiaverina et al. 2019).

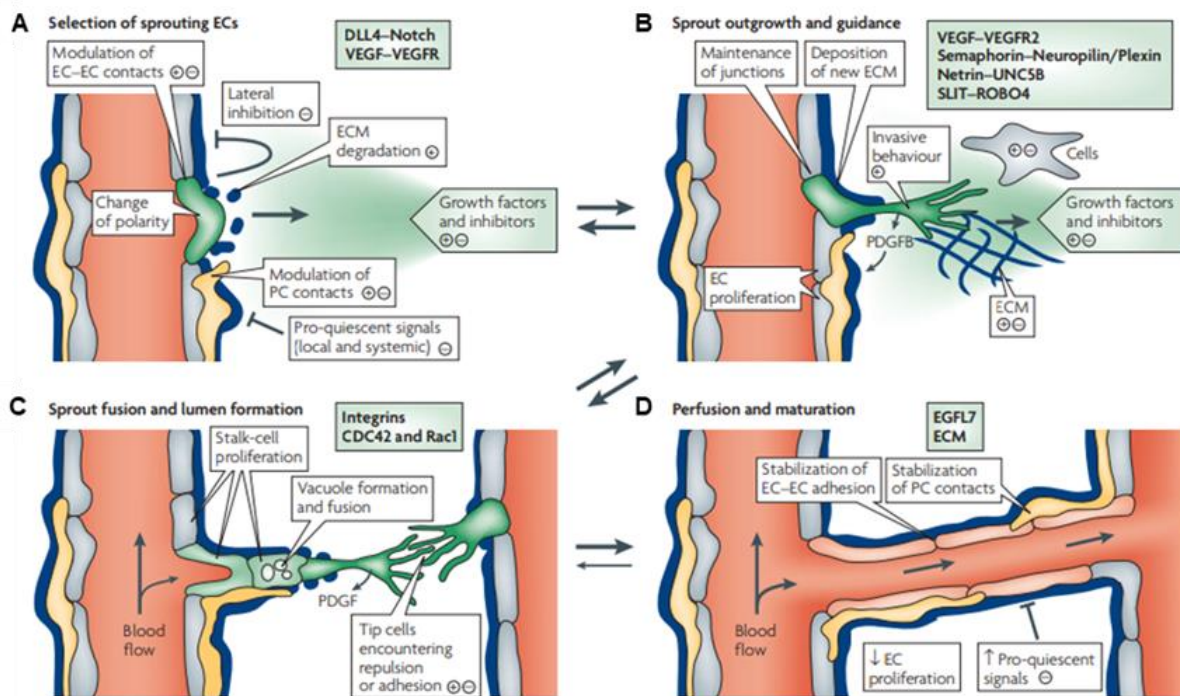


Figure 52. Schéma des principales étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. (A) En réponse à des variations locales en facteurs de croissance, les cellules endothéliales sont activées et se différencient en « tip cells » ou en « stalk cells ». Les cellules endothéliales se dissocient de leur lame basale et des cellules murales. (B) Après dégradation de la matrice extracellulaire interstitielle, les tip cells migrent selon le gradient de concentration des facteurs de croissance dans le microenvironnement. Le vaisseau néoformé ne stabilise après dépôt d'une lame basale et le recrutement de péricytes. (C) La lumière du vaisseau se forme et celui-ci s'anastomose avec un autre vaisseau. (D) La perfusion du vaisseau néoformé par le flux sanguin contribue à sa stabilité. D'après (Adams et Alitalo 2007)

b. L'angiogenèse de l'os

L'angiogenèse joue un rôle prépondérant dans la régulation du développement osseux puisqu'elle est couplée à l'ostéogenèse (Hendriks et Ramasamy 2020; Kusumbe, Ramasamy, et Adams 2014; Ernestina Schipani et al. 2009) et à la chondrogenèse (Gerber et al. 1999).

Plusieurs éléments indiquent un mécanisme de croissance des vaisseaux sanguins propre au tissu osseux (**Figure 53**). Une étude utilisant de la microscopie électronique à balayage de « *corrosion cast* » (moulage vasculaire) décrit des vaisseaux possédant des bourgeons non différenciés ainsi que des vaisseaux se divisant en deux lors de l'invasion vasculaire du cartilage articulaire, suggérant que deux formes d'angiogenèse, l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par intussusception, sont utilisées dans le développement osseux (Skawina et al. 1994). Les études menées par Trueta et Morgan ont révélé la présence de structures tubulaires disposées en colonne avec des boucles interconnectées dans la région métaphysaire des os longs

(Trueta et Morgan 1960). Des techniques d'imagerie à haute résolution des vaisseaux H de la métaphyse indiquent la présence de structures en colonne formant un renflement à leur extrémité que l'on pourrait qualifier de « protrusions bourgeonnantes », qui participent à la croissance des vaisseaux (Ramasamy et al. 2014). A l'instar des vaisseaux formés lors de l'angiogenèse par bourgeonnement, ces protrusions présentent une lumière, un flux sanguin actif et des filopodes qui projettent jusqu'à la matrice calcifiée du cartilage entourant les chondrocytes hypertrophiques (Ramasamy et al. 2016). La croissance de ces vaisseaux sanguins se fait par anastomose de deux protrusions pour former une nouvelle boucle. Des ostéoclastes spécifiques, les VAO (vessel-associated osteoclast), ne présentant pas d'activité de résorption, sont associés aux vaisseaux et sont impliquées dans l'anastomose des vaisseaux H au cours de l'angiogenèse du tissu osseux (Romeo et al. 2019).

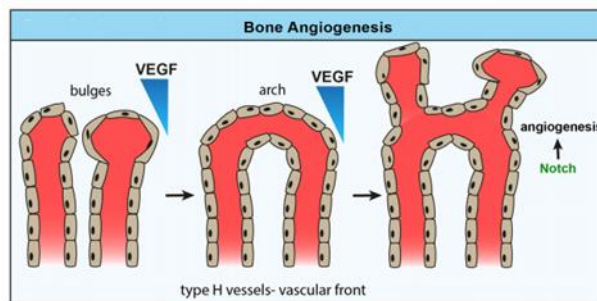


Figure 53. L'angiogenèse du tissu osseux. L'angiogenèse des vaisseaux H de l'os a lieu suite à l'anastomose de structures en colonne avec un renflement à leur extrémité, formant ainsi une arche. Les cellules endothéliales prolifèrent pour former des nouvelles protrusions, en direction d'un gradient de VEGFA. D'après (Hendriks et Ramasamy 2020)

Afin d'évaluer les capacités angiogéniques des chondrocytes, différents tests fonctionnels d'angiogenèse *in vitro* ont été mis au point. Les propriétés angiogéniques des matrices extracellulaires de chondrocytes ou plutôt des facteurs produits par les chondrocytes et stockés dans leur matrice extracellulaire, ont été examinés par un test d'adhérence de cellules endothéliales sur des matrices extracellulaires de chondrocytes en culture. Le rôle des facteurs produits et sécrétés par les chondrocytes a été déterminé grâce à différents tests fonctionnels, utilisant des milieux conditionnés de chondrocytes. Des tests de prolifération, de migration et de formation de tubules sur Matrigel de cellules endothéliales, en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes permettent de comparer les capacités angiogéniques de différents phénotypes chondrocytaires et ainsi d'évaluer l'implication des cellules du cartilage dans la vascularisation de la jonction ostéocondrale.

3.2.2. Rôles des facteurs stockés dans la matrice extracellulaire des chondrocytes

Le cartilage articulaire mature est un tissu dépourvu de vaisseaux sanguins, qui résiste à l'invasion de vaisseaux présents à proximité, dans le cartilage calcifié et provenant de l'os sous-chondral. Ces propriétés avasculaires seraient maintenues dans le cartilage grâce à la présence de nombreux facteurs qui limitent la prolifération, la migration ou la formation de vaisseaux, au sein de la matrice du cartilage. Néanmoins, des vaisseaux sanguins provenant de l'os sous-chondral pénètrent le cartilage calcifié en condition physiologique. Le cartilage calcifié serait donc permissif à l'invasion vasculaire alors que le cartilage articulaire résisterait à cette invasion vasculaire. Au cours de l'arthrose, certains vaisseaux sanguins dépassent la tidemark et participent à la dégradation du cartilage. Cette vascularisation du cartilage est pathologique et résulterait d'une perte de la résistance à l'invasion vasculaire.

Ainsi, les cellules endothéliales tapissant les parois des vaisseaux présents au niveau des chenaux vasculaires pourraient être au contact de la matrice du cartilage. Des zones de contact directs entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire soulignent la proximité que pourraient entretenir les vaisseaux sanguins et la matrice extracellulaire du cartilage. Le cartilage articulaire et le cartilage calcifié sont des tissus qui permettent le passage de molécules au travers de leur matrice vers les tissus environnants. Les facteurs angiogéniques et angiostatiques pourraient également être ancrés dans la matrice et jouer un rôle localement. De plus, la matrice péricellulaire des chondrocytes est composée de collagène de type VI, de protéoglycanes à héparane sulfate comme les perlécans ainsi que de glycoprotéines de type laminines, qui pourraient constituer une matrice d'ancrage des cellules endothéliales. En effet, les perlécans sont des constituants des lames basales et des matrices extracellulaires des cellules endothéliales, qui participent à l'angiogenèse en favorisant l'adhérence, la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Jakobsson et al. 2006; Segev, Nili, et Strauss 2004).

Afin d'étudier l'interaction cellule/matrice entre les cellules endothéliales et les matrices extracellulaires de chondrocytes, un test fonctionnel d'adhérence a été mis au point. Ce test a pour but d'évaluer la capacité d'adhérence de cellules endothéliales directement aux matrices extracellulaires de chondrocytes et de mettre en avant des facteurs contenus dans les matrices de chondrocytes qui pourraient avoir un rôle biologique dans la vascularisation de la jonction ostéochondrale.

a. Mise au point de la technique d'adhérence

La technique d'adhérence a demandé une optimisation afin de pouvoir répondre aux différentes particularités que présente notre modèle de différenciation chondrocytaire.

Dans un premier temps, notre modèle de différenciation hypertrophique a été mis en place dans certaines conditions de culture qu'il fallait respecter, notamment pour obtenir des chondrocytes bien différenciés avec un phénotype hypertrophique qui minéralise correctement sa matrice extracellulaire. Ainsi, les chondrocytes iMAC sontensemencés dans des puits d'une plaque 12 puits (surface de 3,8 cm²) et différenciés séquentiellement en chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, sans interruption ou repiquage possible. Les chondrocytes aux phénotypes d'intérêt (pré-hypertrophique et hypertrophique) sont donc obtenus en deux temps, à 6 semaines d'intervalle. La technique d'adhérence se réalisant sur cellules vivantes, il a donc fallu évaluer l'adhérence des cellules endothéliales sur les matrices pré-hypertrophiques puis l'adhérence des cellules endothéliales sur les matrices hypertrophiques et enfin comparer les résultats obtenus pour chacun des phénotypes chondrocytaires. C'est pourquoi une gamme d'adhérence de cellules endothéliales a été réalisée dans des puits laissés vides dans chaque plaque de culture utilisée pour la réalisation de cette technique. Cette gamme d'adhérence permet de quantifier le pourcentage d'adhérence des cellules endothéliales aux matrices chondrocytaires, par rapport à l'adhérence de ces mêmes cellules à un support habituel de culture et dans les mêmes conditions. Les pourcentages d'adhérence sont ensuite comparés entre eux pour évaluer les capacités de chaque type de matrice dans l'adhérence de cellules endothéliales.

Dans un second temps, pour pouvoir évaluer l'adhérence d'un type cellulaire sur autre type cellulaire, dont les caractéristiques morphologiques sont pourtant hautement dissemblables lorsque cultivés séparément, la distinction entre les deux doit se faire facilement une fois les cellules mises en contact. Ainsi, afin de distinguer les cellules endothéliales des chondrocytes dans les puits de culture, les cellules endothéliales ont été préalablement rendues fluorescentes par un marquage à la calcéine. Ce colorant cellulaire est classiquement utilisé pour déterminer la viabilité cellulaire. Dans les cellules vivantes, la calcéine-AM non fluorescente est convertie en calcéine fluorescente verte, après hydrolyse d'ester acétoxyméthyle par des estérases intracellulaires. La présence de cellules HUVEC adhérentes à leur support est donc détectable par microscopie ou par spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 535 nm/485 nm.

Des cellules HUVEC en culture sont incubées avec de la calcéine-AM (1 μ M) pendant 1h à 37°C (**Figure 54 A**). Un nombre croissant de cellules HUVEC fluorescentes est ensemencé dans des plaques de culture 12 puits et incubé à 37°C pendant 2h, 4h et 24h. Les cellules non adhérentes sont enlevées des puits par tapotage et rinçage. L'adhérence des cellules au support en plastique a été déterminée par fluorescence. La détection de la fluorescence des cellules pour déterminer le nombre de cellules adhérentes au puits est une technique valide, comme en témoignent les courbes d'étalonnage présentant un coefficient de Spearman autour de 1. On observe que les cellules HUVEC présentent une fluorescence qui diminue en intensité avec le temps d'incubation. Leur fluorescence est maximale à 2h d'incubation, puis elle décroît après 4h et 24h d'incubation. Néanmoins, malgré une baisse d'intensité de fluorescence, le nombre de cellules est toujours quantifiable après 4h et 24h d'adhérence (**Figure 54 B**). Des HUVEC fluorescentes (25000 cellules/puits) ont été ensemencées sur des matrices de chondrocytes et incubées pendant 2h, 4h et 24h à 37°C. Le pourcentage d'adhérence des HUVEC aux matrices est évalué et après 2h d'incubation 27% des cellules se sont fixées à la matrice chondrocytaire. Le pourcentage d'adhérence augmente après 4h d'adhérence pour atteindre 55% puis décroît à 42% après 24h d'adhérence (**Figure 54 C**).

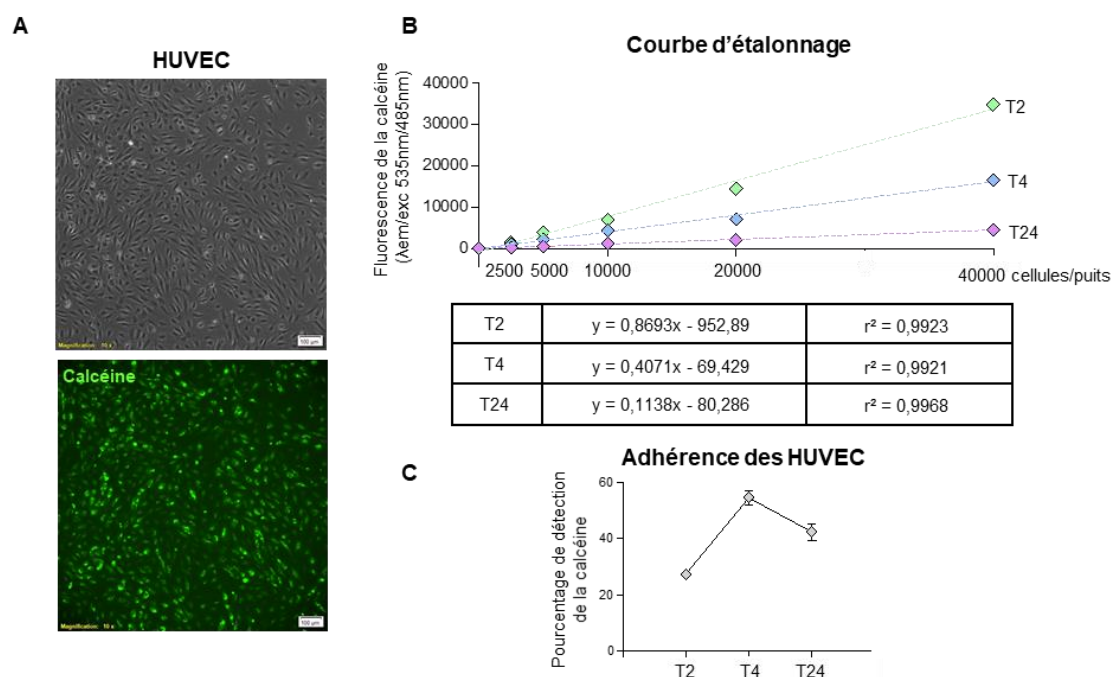


Figure 54. Mise au point de la technique d'adhérence de cellules endothéliales. (A) Cellules HUVEC en culture après incubation avec la calcéine-AM (1 μ m) (objectif x10). (B) Courbe d'étalonnage de la fluorescence des cellules endothéliales en fonction de la densité cellulaire d'ensemencement après 2h, 4h et 24h d'incubation. (C) Pourcentage d'adhérence de cellules endothéliales à une matrice chondrocytaire après 2h, 4h et 24h d'incubation. (n=3)

Ainsi, pour les expériences d'adhérence de cellules endothéliales sur matrices extracellulaires de chondrocytes, les cellules HUVEC fluorescentes sontensemencées (25000 cellules/puits) sur les chondrocytes en culture puis incubées pendant 4h. Les cellules non adhérentes sont détachées et la détection de la fluorescence des HUVEC est effectuée par spectrophotométrie. L'auto-fluorescence des chondrocytes est retranchée à la fluorescence des HUVEC.

b. Evaluation de l'adhérence de cellules endothéliales aux matrices de chondrocytes

L'adhérence de cellules endothéliales sur deux types de matrices a été évaluée, les matrices des chondrocytes pré-hypertrophiques et des chondrocytes hypertrophiques. Après 4h d'adhérence, en moyenne 61% des cellules HUVECensemencées ont adhéré aux matrices pré-hypertrophiques, contre 87% en moyenne aux matrices de chondrocytes hypertrophiques (Figure 55 A, B).

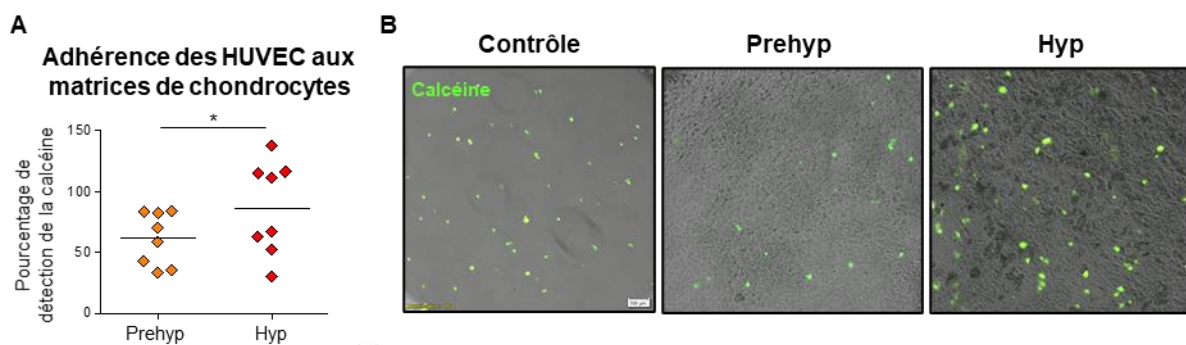


Figure 55. Adhérence de cellules endothéliales sur des matrices extracellulaires de chondrocytes. (A) Pourcentage d'adhérence de cellules endothéliales aux matrices de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques après 4h d'incubation. (n=8) (B) Images représentatives de l'adhérence des cellules endothéliales au support habituel de culture et aux matrices de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. (Objectif x10).

Pour conclure, nous observons une différence dans l'adhérence des cellules endothéliales selon le type de matrice utilisée comme support. Les cellules endothéliales sont capables d'adhérer aux deux types de matrices de chondrocytes, néanmoins elle adh rent davantage lorsqu'elles ont des matrices hypertrophiques comme support. L'adhérence des cellules HUVEC est 1,4 fois supérieure aux matrices hypertrophiques qu'aux matrices pré-hypertrophiques, suggérant que les matrices hypertrophiques contiennent plus de facteurs qui favoriseraient cette adhérence et/ou moins de facteurs qui empêcheraient cette adhérence, que

les matrices pré-hypertrophiques. Les matrices diffèrent également par leur état de minéralisation, les matrices de chondrocytes hypertrophiques sont minéralisées, contrairement aux matrices des chondrocytes pré-hypertrophiques, ce qui pourrait expliquer l'adhérence plus importante aux matrices hypertrophiques.

3.2.3. Rôles des facteurs sécrétés par les chondrocytes

Le cartilage articulaire et le cartilage calcifié sont en étroite relation avec l'os sous-chondral, avec qui ils interagissent, par le biais de différents vecteurs de communication décrits précédemment. Les chondrocytes pourraient donc produire des molécules qui transiteraient jusqu'à l'os sous-chondral et stimuleraient l'angiogenèse ostéochondrale. Plusieurs tests fonctionnels d'angiogenèse *in vitro* ont donc été mis au point afin d'évaluer et de comparer l'activité angiogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Ces différents tests fonctionnels miment *in vitro* les grandes étapes du processus d'angiogenèse. Ces tests sont communément utilisés pour démontrer le rôle pro-angiogénique de molécules candidates (Stryker et al. 2019).

a. Prolifération de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes

Une des premières étapes du processus d'angiogenèse est la prolifération des cellules endothéliales, en réponse à un signal pro-angiogénique. Pour modéliser cette étape, un test de prolifération de cellules endothéliales, en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes a été effectué.

Nous avons évalué deux aspects, un aspect pro-angiogénique des chondrocytes hypertrophiques mais également l'aspect anti-angiogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques. Ainsi, le test de prolifération a été effectué dans deux conditions expérimentales différentes. La première a consisté à utiliser des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, avec une faible quantité de sérum et sans ajout de facteurs de croissance afin de visualiser les capacités pro-angiogéniques des chondrocytes et de les comparer selon le phénotype chondrocytaire. Ainsi, les milieux conditionnés ont été supplémentés extemporanément avec 2% de SVF. L'ajout de sérum à faible dose reste néanmoins indispensable pour éviter une mortalité des cellules endothéliales. La deuxième condition expérimentale vise à mettre en évidence une capacité anti-angiogénique des milieux conditionnés. Ces derniers ont donc été supplémentés extemporanément avec 2% de

mix complémentaire, qui est utilisé pour cultiver les cellules endothéliales. Ce mix contient 2% de sérum mais également des facteurs de croissance (Epidermal Growth factor, Basic Fibroblast Growth Factor, Insulin-like Growth Factor, VEGF) qui favorisent la prolifération cellulaire.

La prolifération des cellules endothéliales est évaluée après 48h de stimulation par les milieux conditionnés de chondrocytes, par incorporation de l'EdU, sur les 4 dernières heures de l'expérimentation. Un comptage des cellules totales (marquées au DAPI) et des cellules prolifératives (marquées à l'EdU) est effectué (**Figure 56 D**).

En condition basale de faible prolifération, c'est-à-dire sans ajout de facteurs de croissance, lorsque les cellules endothéliales HUVEC sont stimulées avec des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, on observe une augmentation du nombre total de cellules avec les deux types de milieux, par rapport au contrôle négatif (**Figure 56 A, gauche**). Les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques semblent entraîner une légère augmentation du nombre total de cellules par rapport aux milieux conditionnés pré-hypertrophiques ($p=0,0645$). Cette tendance se confirme si on observe le nombre de cellules prolifératives. En effet, les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et le contrôle négatif présentent des taux semblables de cellules EdU⁺. En revanche, les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques induisent une augmentation du nombre de cellules prolifératives, par rapport au contrôle négatif mais également par rapport aux milieux conditionnés pré-hypertrophiques (**Figure 56 B, gauche**).

En condition basale de forte prolifération, c'est-à-dire avec ajout de facteurs de croissance, les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques présentent un important taux de prolifération, par rapport à la condition basale de faible prolifération. On constate que les deux types de milieux conditionnés entraînent une augmentation du nombre de cellules totales plus modérée qu'avec le contrôle positif (**Figure 56 A, droite**). De plus, lorsque l'on s'intéresse aux cellules prolifératives, l'augmentation de la prolifération est encore plus modérée. Ainsi, les milieux conditionnés pré-hypertrophiques et hypertrophiques présentent une certaine capacité d'inhibition de la prolifération, par rapport au contrôle positif. Une différence significative entre les deux types de milieux conditionnés est observée, avec une capacité d'inhibition de la prolifération plus marquée pour les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques que pour ceux des chondrocytes hypertrophiques (**Figure 56 B, droite**). Cette différence dans le nombre de cellules prolifératives ne s'explique pas par une mortalité accrue des cellules endothéliales, puisque les

milieux conditionnés pré-hypertrophiques et hypertrophiques entraînent le même nombre de corps apoptotiques dans chacune des conditions expérimentales (**Figure 56 C**).

Pour conclure, ce premier test fonctionnel démontre un rôle complexe des chondrocytes dans la prolifération de cellules endothéliales. Les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques induisent tous deux une augmentation du nombre total de cellules mais seuls les chondrocytes hypertrophiques entraînent une augmentation du nombre de cellules prolifératives. Le nombre de cellules totales reflète la prolifération cellulaire sur les 48h d'expérimentation, tandis que le nombre de cellules prolifératives n'a été évalué que sur la période d'incorporation de l'EdU, c'est-à-dire, les 4 dernières heures de prolifération. Les chondrocytes hypertrophiques présenteraient donc un effet plus marqué à long terme, avec des cellules qui seraient davantage engagées dans un processus de division et de prolifération cellulaire lorsqu'elles sont stimulées par ces milieux de chondrocytes hypertrophiques, plutôt que par les milieux de chondrocytes pré-hypertrophiques. Les chondrocytes hypertrophiques sécrètent donc des facteurs angiogéniques dont l'action serait plus longue ou plus forte que les facteurs sécrétés par les chondrocytes pré-hypertrophiques.

Les chondrocytes présentent également une capacité anti-angiogénique, puisqu'ils induisent une diminution du nombre total de cellules, comparé au milieu positif. La différence du nombre de cellules prolifératives entre nos deux types de milieux conditionnés indique que les chondrocytes pré-hypertrophiques possèdent une capacité d'inhibition de l'angiogenèse plus importante que les chondrocytes hypertrophiques.

Dans l'ensemble, ce premier test fonctionnel de prolifération de cellules endothéliales montre que les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques présentent des capacités angiogéniques différentes selon les conditions expérimentales, avec un rôle pro-angiogénique des chondrocytes hypertrophiques et un rôle davantage anti-angiogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques. Ces premiers résultats sont en faveur de notre hypothèse de déséquilibre de la balance angiogénique avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Cependant, ce test doit être complété par d'autres tests fonctionnels qui modélisent d'autres étapes du processus d'angiogenèse, comme la migration cellulaire ou la formation de tubules, afin d'obtenir des informations sur d'autres aspects du processus d'angiogenèse, que la prolifération des cellules.

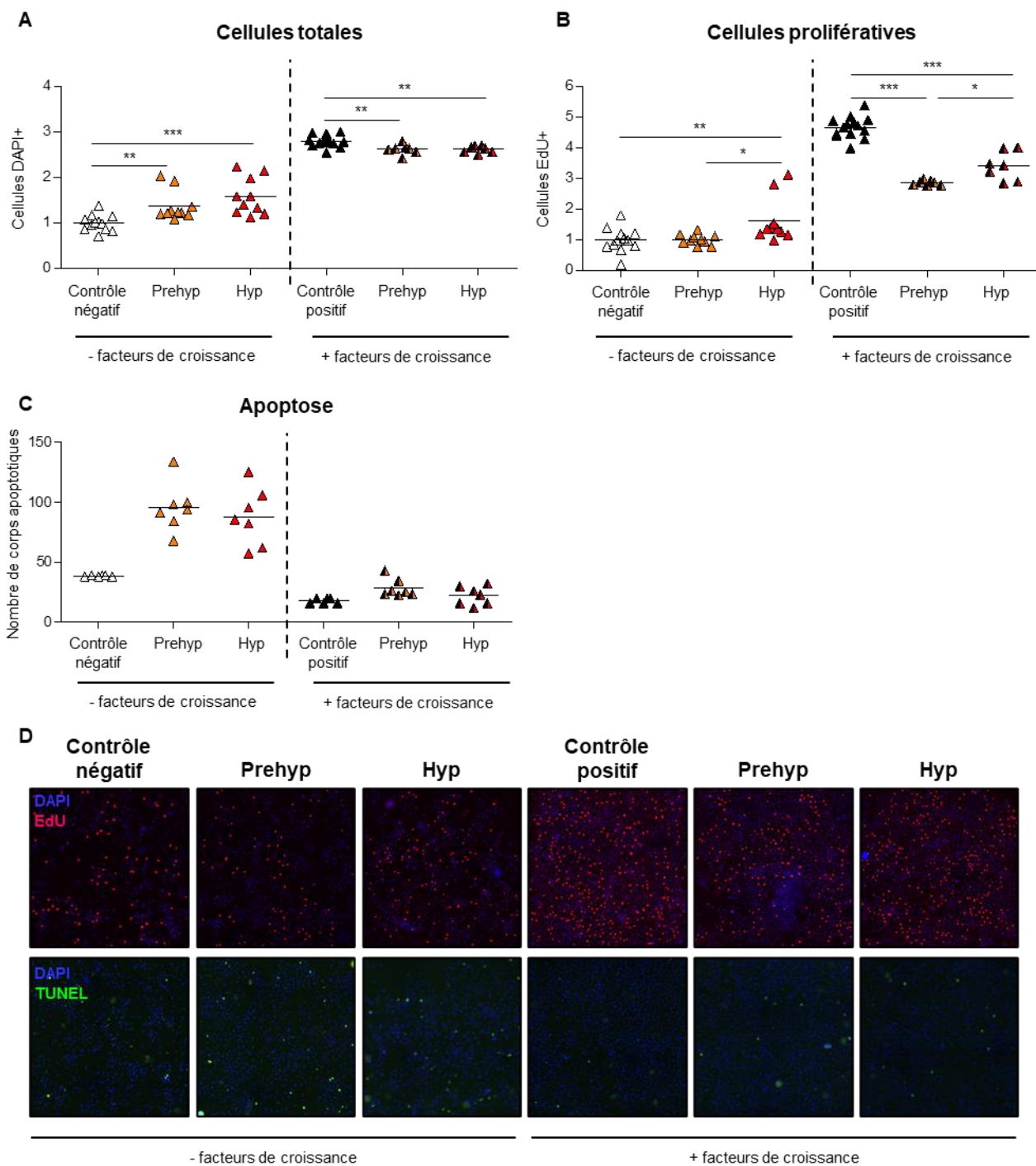


Figure 56. Prolifération et mortalité de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes. (A) Comptage des cellules totales DAPI⁺ et (B) des cellules prolifératives EdU⁺, suite à 48h de prolifération en réponse à une stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, supplémenté ou non en facteurs de croissance. Le nombre de cellules dans chaque condition est rapporté à la moyenne du contrôle négatif (n=10 pour les conditions sans facteurs de croissance) (n=7 pour les conditions avec facteurs de croissance). (C) Nombre de corps apoptotiques TUNEL⁺ (n=7). (D) Images représentative des cellules endothéliales suite à 48h de prolifération et après marquage DAPI, EdU et TUNEL. (Objectif x10).

b. Migration de cellules endothéliales en réponse à une stimulation par les milieux conditionnés de chondrocytes

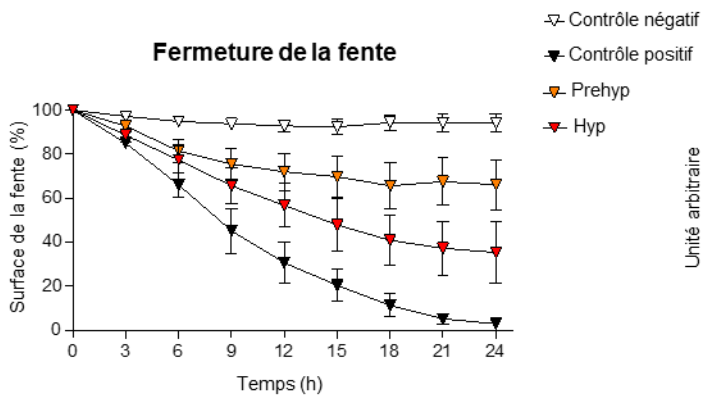
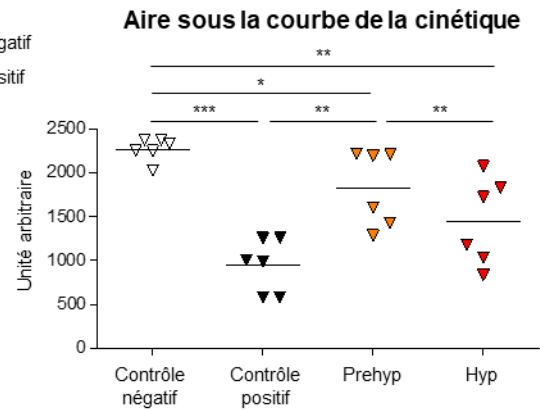
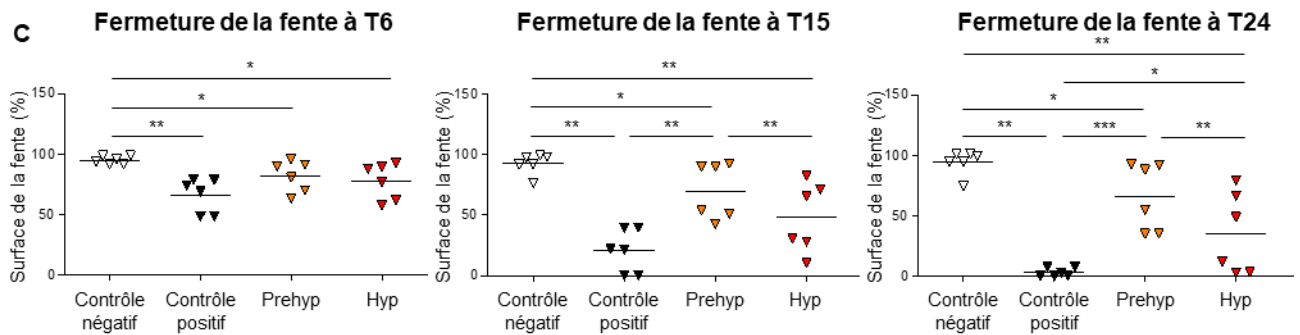
La migration des cellules endothéliales en réponse à un signal pro-angiogénique fait partie des étapes clés du processus d'angiogenèse. Pour modéliser cette étape, un test de migration de cellules endothéliales, de type « *wound healing* » également appelé « *scratch assay* » a été élaboré pour déterminer si les chondrocytes produisent et sécrètent des facteurs stimulants ou non la migration de cellules endothéliales.

Dans ce test fonctionnel, une fente est réalisée mécaniquement dans une monocouche de cellules endothéliales. Cette fente est assimilée à une blessure, puisqu'elle est effectuée en grattant la surface du tapis cellulaire et donc arrache une partie des cellules de leur support. En réponse à cette blessure et sous l'action de facteurs pro-angiogéniques, les cellules endothéliales vont proliférer et migrer pour « cicatriser » la blessure, c'est-à-dire combler la zone acellulaire. Ainsi, des phénomènes de prolifération cellulaire sont entrepris, il est donc nécessaire d'exclure ces phénomènes prolifératifs afin de n'observer que la migration cellulaire. Dans ce test de migration cellulaire, de la mitomycine C est incubée avec les cellules endothéliales avant la réalisation de la fente acellulaire afin de bloquer la prolifération cellulaire. Après avoir réalisé une fente au centre de chaque puits, les cellules endothéliales sont stimulées avec les milieux conditionnés de chondrocytes. Les milieux conditionnés ne sont pas supplémentés en sérum, car l'ajout de sérum entraîne une forte migration des cellules endothéliales (résultats non montrés). La migration est observée par microscopie pendant une période de 24h. Des photographies de la colonisation de la fente au cours du temps sont prises (**Figure 57 A**) et la surface de la fente est calculée (**Figure 57 B**). L'aire sous la courbe de la cinétique de fermeture de la fente permet d'analyser la migration des cellules sur 24h d'une manière globale (**Figure 57 C**). Trois temps ont été sélectionnés afin de déterminer la capacité de migration à un stade précoce, intermédiaire et avancé de la migration.

Lorsque les cellules sont stimulées avec un milieu basal sans sérum ni facteurs de croissance (contrôle négatif), les cellules endothéliales ne migrent pas pour combler la zone acellulaire et la surface de la fente est maintenue à 100% de la surface initiale. Lorsque les cellules sont stimulées avec un milieu basal supplémenté en sérum et en facteurs de croissance (contrôle positif), la migration des cellules endothéliales est optimale puisque la fermeture de la fente s'initie très rapidement et que la surface de la fente diminue progressivement avec le temps pour être totalement refermée au bout de 24h (**Figure 57 D**). Lorsque les cellules

endothéliales sont stimulées avec les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, on observe des niveaux intermédiaires de migration. Les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques permettent la migration de cellules endothéliales au travers de la zone acellulaire, néanmoins, la fente ne se referme pas totalement et cela quel que soit le milieu conditionné de chondrocytes pré-hypertrophiques utilisés (**Figure 57 D**). En effet, près de 70% de la fente demeure non colonisée par les cellules endothéliales au bout de 24h. Lorsque les cellules endothéliales sont stimulées avec des milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques, on constate une migration plus importante qu'avec les milieux conditionnés pré-hypertrophiques. L'aire sous la courbe de la cinétique de fermeture de la fente plus faible avec les milieux hypertrophiques qu'avec les milieux pré-hypertrophiques, indiquant un effet globalement différent de nos deux types de milieux. Six heures après avoir effectué la fente, on n'observe pas de différence entre les milieux conditionnés de chondrocytes, mais la différence s'observe à 15h et 24h de migration. Ainsi, la migration induite par les chondrocytes hypertrophiques est nettement plus importante que celle induite par les chondrocytes pré-hypertrophiques. Notamment, on constate que trois milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques sur six entraînent une fermeture quasi-totale de la fente au bout de 24h de migration.

Pour conclure, les cellules endothéliales répondent à la stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes en migrant à travers une zone acellulaire, mais cette réponse est plus importante lorsque les cellules sont stimulées par des milieux de chondrocytes hypertrophiques. Ces milieux sont capables de refermer totalement la fente ou de fermer près de 50% de sa surface alors que les milieux pré-hypertrophiques ne comblent jamais l'espace vide de cellules. Ainsi, les chondrocytes hypertrophiques pourraient sécréter un plus grand nombre de médiateurs ayant un rôle dans la migration, ou en plus forte quantité. A l'inverse, les chondrocytes pré-hypertrophiques pourraient sécréter moins de facteurs impliqués dans la migration cellulaire, ou en quantité plus faible. Notons qu'une absence de migration à travers la zone acellulaire, comme c'est le cas avec le contrôle négatif, ne signifie pas que les cellules sont inertes. Les cellules effectuent des mouvements et ne sont pas statiques, néanmoins ces mouvements se font dans un périmètre très restreint.

A**B****C**

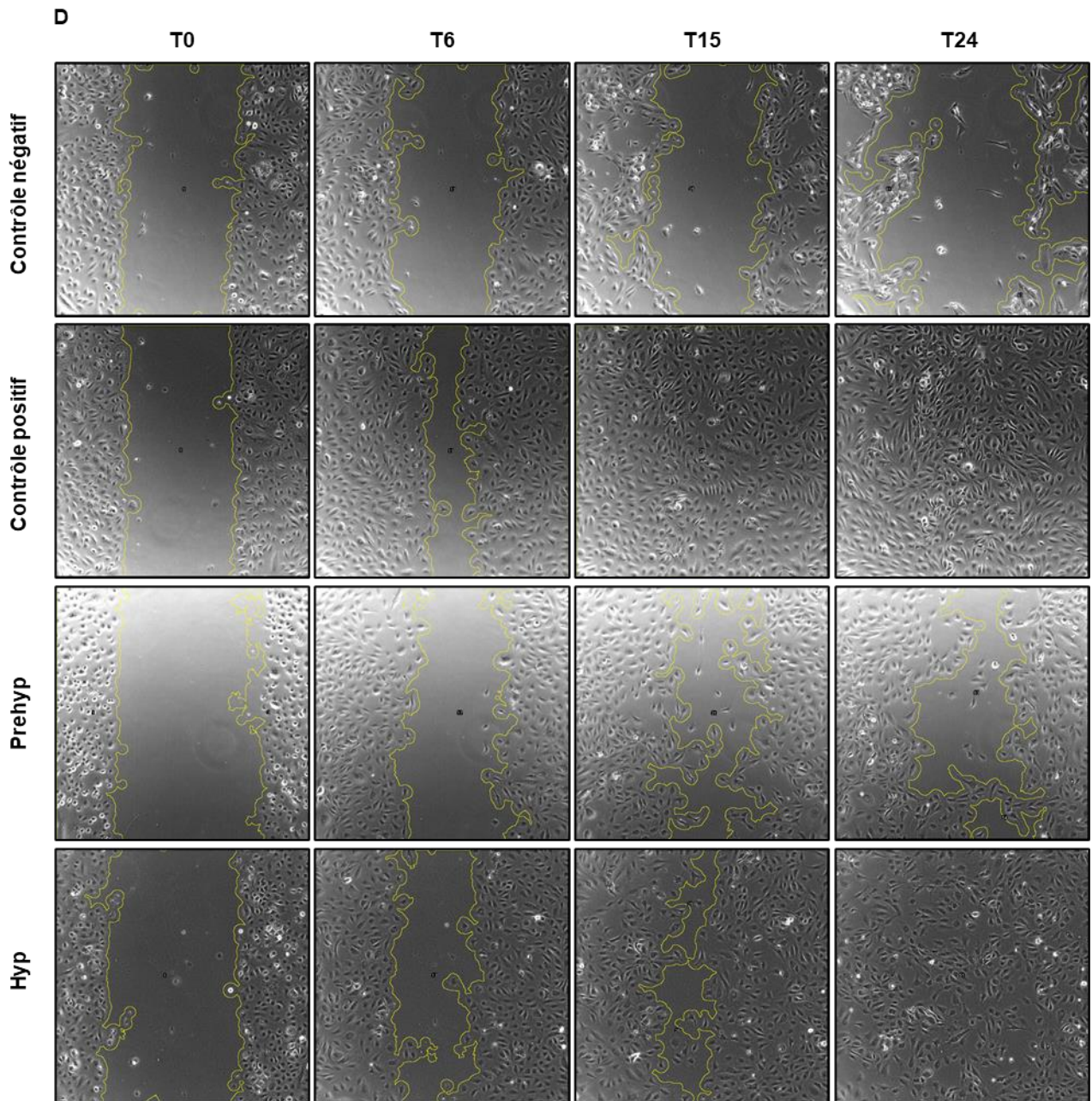


Figure 57. Migration de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes. (A) Images représentatives de la fermeture de la fente à 0h, 6h, 15h et 24h de migration. (Objectif x10). (B) Cinétique de la fermeture de la zone acellulaire (fente) en réponse à une stimulation de 24h par des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Les valeurs sont représentées en pourcentage de la surface de la fente à T0. (C) Aire sous la courbe de la cinétique de fermeture de la fente (n=5). (D) Fermeture de la fente après 6h, 15h et 24h de migration des cellules endothéliales.

c. Formation de tubules sur Matrigel des cellules endothéliales en réponse à une stimulation par les milieux conditionnés de chondrocytes

Le test de formation de tubules permet d'étudier l'étape critique de la formation et de l'allongement des bourgeons vasculaires à l'origine des nouveaux vaisseaux sanguins. La capacité des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques à promouvoir la tubulogenèse a donc été évaluée grâce à ce test fonctionnel en deux dimensions.

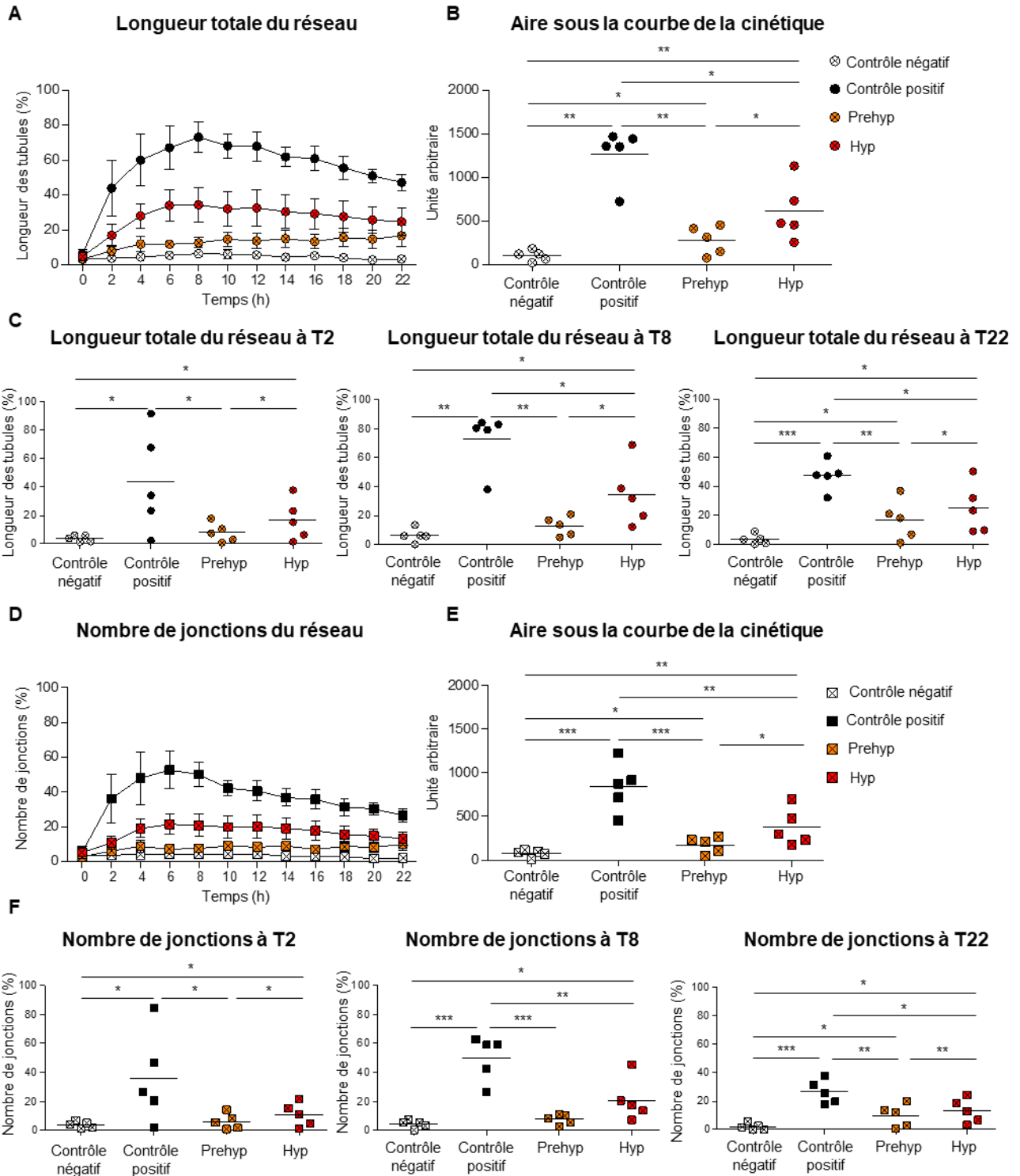
La tubulogenèse relie des vaisseaux sanguins nouvellement formés au réseau vasculaire préexistant, au travers d'une matrice extracellulaire. Ainsi, pour modéliser ce processus *in vitro*, les cellules endothéliales sont placées sur une matrice de membrane basale commerciale, le Matrigel®. Cette préparation est issue du sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), une tumeur riche en protéines de matrice extracellulaire. Ses principaux composants sont la laminine, le collagène de type IV, l'entactine et des protéoglycanes à héparane sulfate. Une fois polymérisé, le Matrigel sert de substrat aux cellules endothéliales, qui pourront ensuite former des tubules plus ou moins ramifiés en présence de cytokines ou de facteurs de croissance.

Dans ce test fonctionnel, les cellules endothéliales sont suspendues dans une solution de stimulation puis déposées sur une matrice polymérisée de Matrigel. Les milieux conditionnés de chondrocytes testés ne sont pas supplémentés en sérum, car l'ajout de sérum entraîne une formation de tubules très importante. La tubulogenèse est observée par microscopie pendant une période de 22h. Des photographies de la formation de tubules au cours du temps sont prises (**Figure 58 G**) et la longueur totale du réseau ainsi que le nombre de jonctions formées est analysé (**Figure 58 A, D**). L'aire sous la courbe des cinétiques permet d'analyser la tubulogenèse sur 22h d'une manière globale (**Figure 58 B, E**). Trois temps ont été sectionnés afin de déterminer la capacité de formation de tubules à un stade précoce, intermédiaire et avancé de la tubulogenèse.

Lorsque les cellules sont stimulées avec un milieu basal sans sérum ni facteurs de croissance (contrôle négatif), les cellules endothéliales ne forment aucun tubule, seulement quelques segments très courts. La longueur totale du réseau et le nombre de jonctions ne dépassent pas respectivement en moyenne 7% et 5% du réseau induit par le contrôle positif. Le contrôle positif, un milieu basal supplémenté en sérum et en facteurs de croissance, induit une forte tubulogenèse au cours du temps, avec un pic maximal à 8h pour la longueur totale du réseau et 6h pour le nombre de jonctions. Ces tubules se forment rapidement puisque dès 2h d'expérimentation, on observe la formation de petits segments ramifiés. Après 6 à 8h

d'expérimentation, les tubules induits par le contrôle positif se fragmentent petit à petit, entraînant une diminution progressive de la longueur totale du réseau et du nombre de jonctions. Des niveaux intermédiaires de tubulogenèse sont observés après stimulation avec les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Les milieux conditionnés pré-hypertrophiques induisent une faible tubulogenèse, avec une longueur totale du réseau et un nombre de jonction qui ne deviennent statistiquement différents du contrôle négatif qu'au bout de 22h d'expérimentation. Les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques permettent la formation de tubules plus longs et plus ramifiés que les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques, et cela dès 2h d'expérimentation.

Pour conclure, les cellules endothéliales répondent à la stimulation par des milieux conditionnés de chondrocytes en formant des tubules plus ou moins denses et ramifiés au sein de la matrice de Matrigel, et les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques présentent une capacité angiogénique supérieure aux milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques.



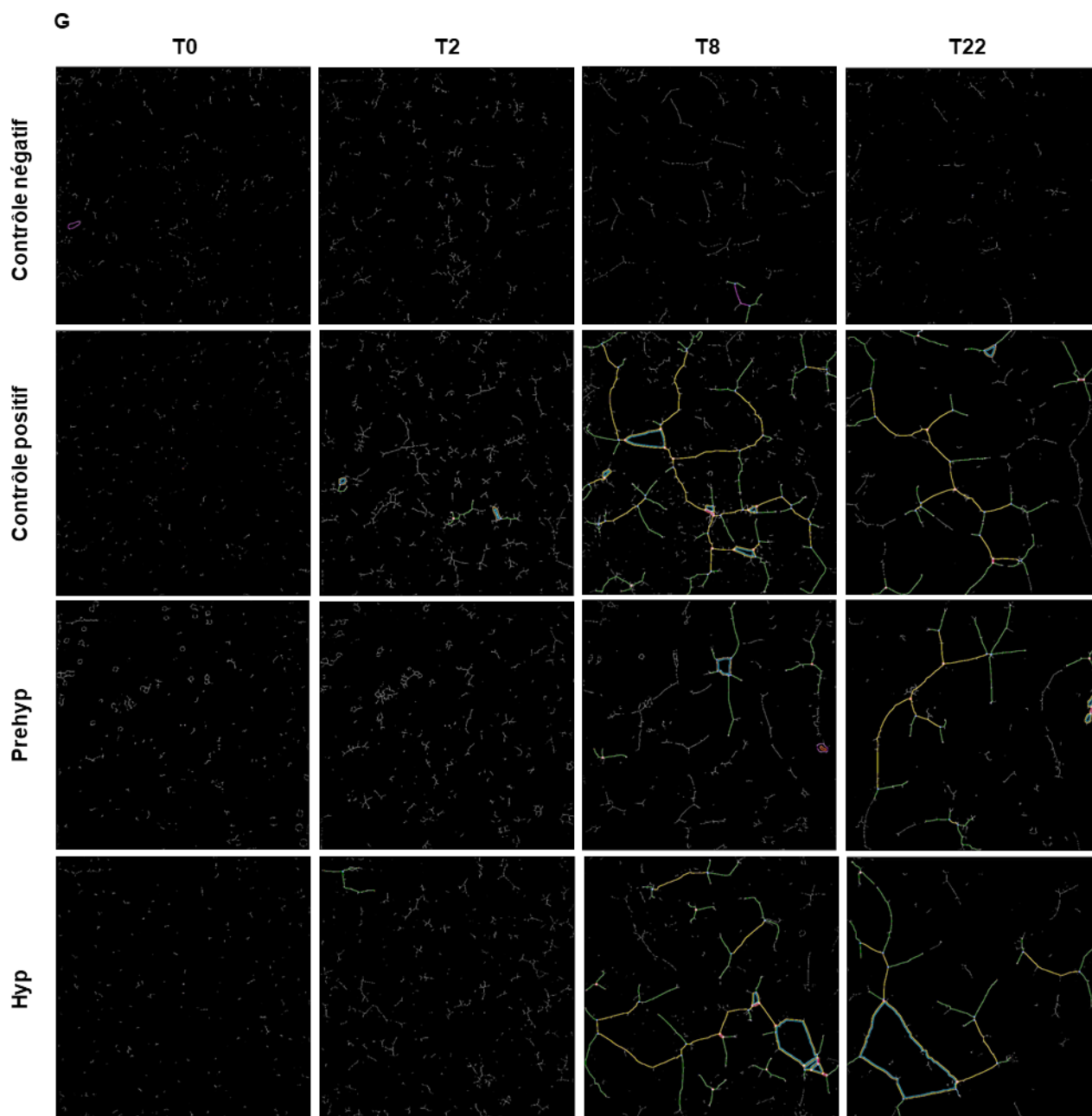


Figure 58. Formation de tubules sur Matrigel ou angiogenèse en 2 dimensions de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes. (A) Images représentatives de la formation du réseau de tubules à 0h, 2h, 8h et 22h. (Objectif x10). (B) Cinétique de la longueur totale du réseau de tubules en réponse à une stimulation de 24h par des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Les valeurs sont représentées en pourcentage de la longueur maximale de tubules formés. (C) Aire sous la courbe de la cinétique de longueur totale du réseau (D) Longueur totale du réseau de tubules à 2h, 8h et 22h. (E) Cinétique du nombre de jonctions du réseau de tubules. Les valeurs sont représentées en pourcentage du nombre maximal de jonctions formées (F) Aire sous la courbe de la cinétique de nombre de jonctions du réseau (G) Nombre de jonctions du réseau de tubules à 2h, 8h et 22h. (n=5).

Ces résultats confirment notre hypothèse selon laquelle les chondrocytes acquièrent un potentiel de remodelage ostéoclastogénique et angiogénique au cours de leur différenciation hypertrophique et qu'ils présentent des propriétés pro-ostéoclastogéniques et pro-angiogéniques associées au phénotype hypertrophique. Ainsi, les chondrocytes hypertrophiques stimulent davantage la différenciation de monocytes en ostéoclastes que les chondrocytes pré-hypertrophiques. Les cellules endothéliales adhèrent davantage aux matrices extracellulaires de chondrocytes hypertrophiques qu'aux matrices pré-hypertrophiques. Les chondrocytes hypertrophiques stimulent la prolifération de cellules endothéliales mais présentent également une action inhibitrice de la prolifération, qui reste cependant moins forte que l'action inhibitrice des chondrocytes pré-hypertrophiques. Enfin, les chondrocytes hypertrophiques favorisent la migration de cellules endothéliales et la formation de tubules denses et ramifiés.

Le passage du stade pré-hypertrophique au stade hypertrophique est associée à l'acquisition de fonctions pro-ostéoclastogénique et pro-angiogéniques, indiquant que les chondrocytes hypertrophiques pourraient être impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale observé au cours de l'arthrose et ainsi participer à la progression de la pathologie.

Cependant, les facteurs moléculaires responsables des effets observés sur les monocytes et les cellules endothéliales ne sont pas encore identifiés. Les chondrocytes expriment différemment plusieurs gènes impliqués dans le remodelage et pourraient donc produire à des taux variables des facteurs ostéoclastogéniques, pro-angiogéniques et anti-angiogéniques, à l'origine des effets observés. Un des objectifs de ma thèse a été d'identifier et de mettre en évidence ces facteurs impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale.

4. Identification des facteurs impliqués dans les effets observés dans l'ostéoclastogenèse et l'angiogenèse

La caractérisation moléculaire des chondrocytes issus du modèle de différenciation progressive a montré une dérégulation transcriptionnelle au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Ainsi, au cours de la dernière étape de différenciation de notre modèle, de nombreux gènes impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale sont surexprimés, notamment des protéases matricielles (Mmp3), des facteurs liés aux ostéoblastes (Bmp2 et Bmp4), des facteurs liés aux ostéoclastes (ratio Rankl/Opg, Ccl2 et Ccl4), de facteurs pro-angiogéniques (Vegfa, Vegfc, Cxcl12, Sphk1 et bFGF).

Afin d'identifier des cibles moléculaires impliquées dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale et plus particulièrement dans la vascularisation du cartilage, une étude du sécrétome des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques a été effectuée.

4.1. Etude du sécrétome des chondrocytes issus d'un modèle de différenciation progressive de chondrocytes murins

Des milieux conditionnés ont donc été sélectionnés pour une étude du sécrétome des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, à l'aide d'un « *Proteome Profiler Angiogenesis Array* ». Cette méthode semi-quantitative permet de cibler simultanément 53 protéines liées à l'angiogenèse, avec un rôle pro-angiogénique ou anti-angiogénique, dans différents échantillons et ainsi de mettre en évidence de potentielles cibles impliquées dans l'angiogenèse ostéochondrale.

Parmi les 53 protéines ciblées, seules 14 protéines ont été détectées dans les milieux conditionnés de chondrocytes. Les milieux conditionnés de chondrocyte pré-hypertrophiques et hypertrophiques contiennent les mêmes protéines mais à des niveaux variables de détection (**Figure 59 A, B, C**). Certaines protéines sont décrites comme ayant un rôle pro-angiogénique, comme IGFBP-2 (Azar et al. 2011), CXCL12 (également appelé SDF-1) (Deshane et al. 2007), ostéopontine (J. Dai et al. 2020), NOV (Lin et al. 2003), pentraxine-3 (Presta et al. 2018), MMP-3 (Rundhaug 2005), VEGF (Carmeliet 2005) et MCP-1 (Hong, Ryu, et Han 2005). D'autres en revanche sont décrites comme ayant un rôle anti-angiogénique, comme serpine E1 (PAI-1) (J. Wu et al. 2015), thrombospondine-2 (P. Bornstein 2001), serpine F1 (PEDF) (Cai et al. 2006), endostatine (collagène de type XVIII) (Thomas Pufe, Petersen, et al. 2004) et TIMP-1 (Reed et

al. 2003). IGFBP-3 est décrit comme ayant à la fois un rôle pro-angiogénique et anti-angiogénique (Bach 2015).

On constate que les 4 protéines présentes en plus grande quantité dans les milieux pré-hypertrophiques sont les mêmes que dans les milieux hypertrophiques : IGFBP-2, SDF-1/CXCL12, serpine E1 (également appelé PAI-1) et ostéopontine. De même, les 3 protéines présentes en plus faible quantité sont les mêmes dans les 2 types de milieux : endostatine, TIMP-1 et MCP-1 (également appelé Ccl2). De manière intéressante, le VEGF ne fait pas partie des protéines présentes en plus forte quantité dans l'un ou l'autre des milieux conditionnés (**Figure 59 A, B**). On observe une diminution de la quantité de IGFBP-2, serpine E1 (PAI-1), pentraxine-3 et serpine F1 (PEDF), ainsi qu'une augmentation de la quantité de SDF-1, ostéopontine, MMP-3 et IGFBP-3 avec la différenciation hypertrophique (**Figure 59 C**). Néanmoins, ces différences ne semblent pas importantes.

Une représentation « *heat map* » avec un clustering hiérarchique a été réalisée afin de mettre en évidence des liens possibles entre les différentes protéines ciblées et les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques utilisés. Ainsi, pour chaque protéine présente dans les différents milieux (pré-hypertrophique ou hypertrophique, issus de 3 cultures), un code couleur est attribué selon le niveau de quantification de la protéine d'intérêt. Cette représentation met en avant un certain degré de similarité entre les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques des cultures 1 et 2, ainsi qu'entre les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques 1 et 2 (**Figure 59 D**). Il est donc possible de différencier nos deux types de milieux conditionnés en fonction de leur contenu en protéines liées à l'angiogenèse. Les milieux pré-hypertrophiques et hypertrophiques présentent donc une signature spécifique. Néanmoins, les milieux conditionnés issus de la culture 3 ne semblent pas répondre de la même manière et ne se classe pas avec les autres milieux conditionnés.

Cette étude du sécrétome par *Proteome Array* est une méthode semi-quantitative qui doit être complétée par une étude plus fine, notamment par des techniques plus précises, comme l'ELISA. En effet, cette méthode ne met pas en avant de réelles différences entre les milieux pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

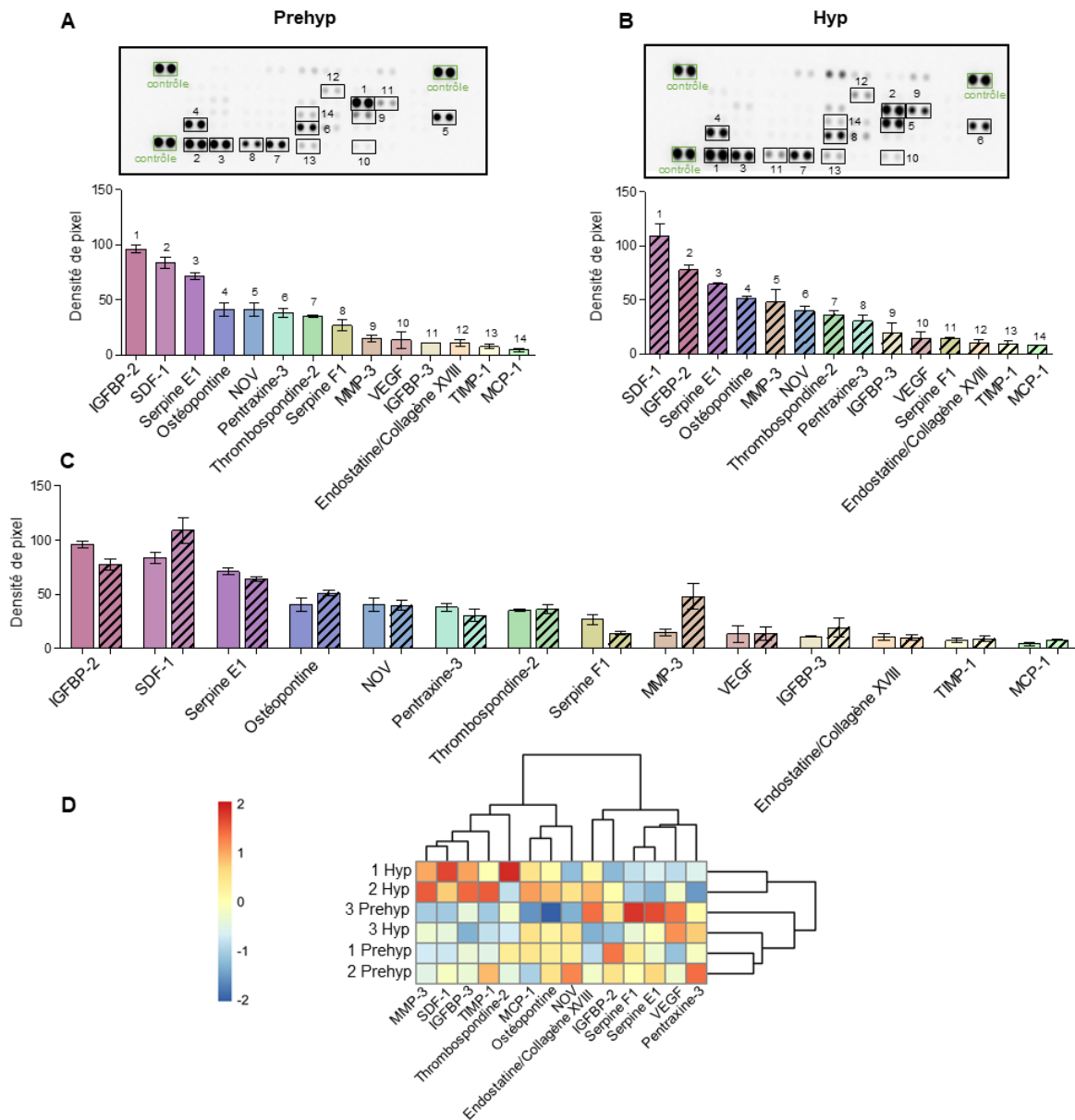


Figure 59. Criblage de protéines liées à l'angiogenèse sécrétées par les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Criblage de 53 protéines liées à l'angiogenèse par immunodétection. La quantité de chaque protéine est déterminée en calculant le pourcentage de densité de pixel du spot d'intérêt par rapport à un spot contrôle. Un spot est considéré comme détectable lorsque son pourcentage de densité de pixel est $\geq 5\%$. Sur 53 protéines ciblées, seules 14 sont détectées dans tous les échantillons. (A) Histogramme des protéines présentes dans les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et (B) hypertrophiques et images des membranes de nitrocellulose utilisées pour la détection des protéines. (C) Comparaison des quantifications des protéines présentes dans les milieux conditionnés de chondrocytes. (D) « Heat map » codée à l'aide du logiciel Rstudio, représentant les protéines présentes dans les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques issus de 3 cultures. Le clustering hiérarchique est effectué par colonne (protéine) et par ligne (milieu conditionné). (n=3)

Nous avons donc détecté la présence de plusieurs facteurs pro-angiogéniques et pro-ostéoclastogéniques par ELISA, afin d'obtenir une quantification plus précise des protéines dérégulées au cours de la différenciation hypertrophique (**Figure 60 A, B**).

Le *Proteome Array* montrait que le VEGF était une des protéines pro-angiogéniques présentes en plus faible quantité, néanmoins une forte concentration de VEGFA a été décelée dans les milieux pré-hypertrophiques et hypertrophiques, avec respectivement en moyenne 2,5 pg/μg de protéines et 3,2 pg/μg de protéines. Certains milieux conditionnés présentent de très fortes concentrations pouvant atteindre jusque 9,2 pg/μg et 12,1 pg/μg dans les milieux pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Cependant, il ne semble pas avoir une augmentation de la sécrétion de VEGFA avec la différenciation hypertrophique.

Les résultats du *Proteome Array* sont confirmés pour la protéine SDF-1. Nous retrouvons SDF-1 en grande quantité dans les milieux conditionnés de chondrocytes, avec en moyenne 1,9 pg/μg de protéines pour les milieux pré-hypertrophiques et 4,7 pg/μg de protéines pour les milieux hypertrophiques. Nous observons également une sécrétion accrue de SDF-1 dans les milieux hypertrophiques, avec 2,5 fois plus de SDF-1 dans les milieux conditionnés hypertrophiques que les milieux conditionnés pré-hypertrophiques. Notons que CD26 (ou Dipeptidyl peptidase-4 DPPIV), une enzyme qui clive et inactive SDF-1, n'est pas détectée dans les milieux conditionnés pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

La protéine PlGF fait partie des 53 protéines ciblées par le proteome array, cependant elle n'était pas détectable dans nos milieux conditionnés. Nous retrouvons des résultats similaires par ELISA puisque les quantités de PlGF mesurées dans les milieux conditionnés sont très faibles, en moyenne 0,06 pg/μg de protéines dans les deux types de milieux.

Les concentrations d'autres protéines liées à l'angiogenèse ont été mesurées dans les milieux conditionnés, comme le VEGFC et le PDGF-BB, mais les concentrations de ces protéines sont pratiquement indétectables (résultats non montrés).

Enfin, nous nous sommes également intéressés à des facteurs impliqués dans la fonction des ostéoclastes, qui n'étaient pas ciblés par le Proteome Array. Bien qu'une augmentation importante de l'expression de Rankl et notamment du ratio Rankl/Opg était observée, RANKL n'a pu être décelé dans les milieux conditionnés de chondrocytes (résultats non montrés). Nous n'avons pas constaté d'augmentation de la sécrétion d'IL-34 avec la différenciation hypertrophique, en revanche, la sécrétion de CCL4 augmente d'un facteur 5 avec la

différenciation des chondrocytes, puisqu'on détecte en moyenne 0,9 pg/μg de protéines dans les milieux pré-hypertrophiques et 5,0 pg/μg de protéines dans les milieux hypertrophiques.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats indique que bien que la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'angiogenèse soit différente entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et les chondrocytes hypertrophiques, peu de molécules analysées se trouvent en concentration différente dans les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques.

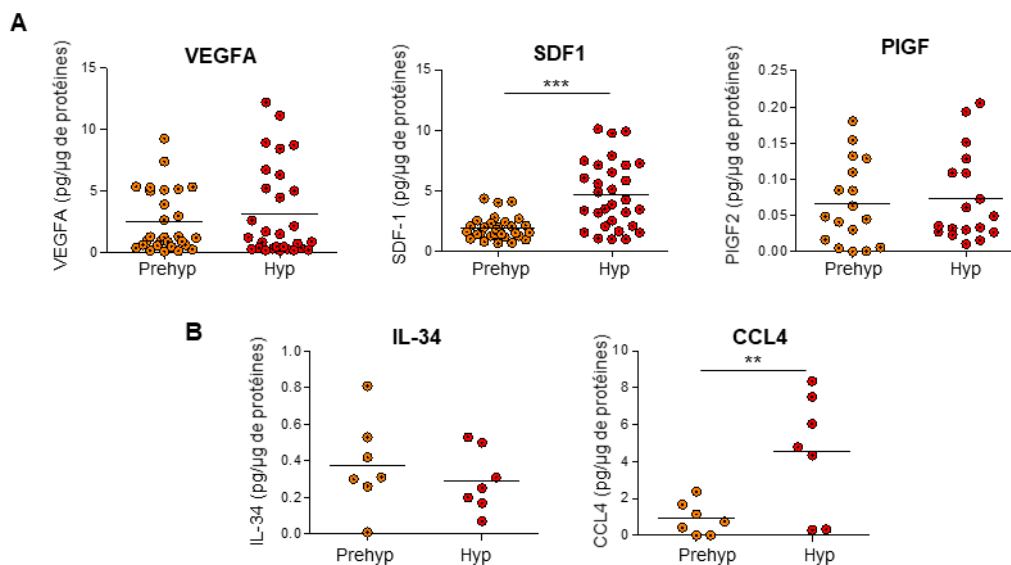


Figure 60. Expression protéique de facteurs liés au remodelage de la jonction ostéochondrale par les chondrocytes issus du modèle de différenciation. Dosage de protéines par ELISA à partir des milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. La quantité de facteurs dosés (pg) en rapportée à la quantité de protéines totales de chaque échantillon (μg). (A) Expression de facteurs liés à l'angiogenèse : VEGFA (n=28-29), SDF-1 (n=30) et PIGF (n=17-18). (B) Expression de facteurs liés à l'ostéoclastogénèse : IL-34 (n=7) et CCL4 (n=7).

Néanmoins, nous avons identifié une cible potentielle, le facteur SDF-1, qui est retrouvé en plus grande quantité dans les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques que dans les milieux pré-hypertrophiques, et cela avec deux techniques de détection. SDF-1 pourrait être impliqué dans le remodelage de la jonction ostéochondrale et a été décrit pour avoir des effets pro-angiogénique mais également pro-ostéoclastogénique. De plus, les monocytes et cellules endothéliales stimulées par les milieux conditionnés de chondrocytes expriment le récepteur CXCR4 de SDF-1 (résultat non montré). L'autre récepteur de SDF-1, CXCR7, n'étant pas exprimés par ces deux types cellulaires (résultats non montrés).

4.2. Mise en évidence du rôle de SDF-1 dans le remodelage de la jonction ostéochondrale

4.2.1. L'axe SDF-1/CXCR4 dans l'arthrose : données bibliographiques

Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), également connu sous le nom de CXC motif chemokine ligand 12 (CXCL12) est un membre de la famille des chimiokine CXC. SDF-1 est une cytokine de 10 kDa impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques de nombreux tissus et cellules. SDF-1 et ses récepteurs sont largement distribués dans l'organisme, faisant de SDF-1 une molécule pléiotrope. SDF-1 est notamment synthétisé par les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les chondrocytes.

Il existe 6 isoformes de SDF-1 chez l'homme, SDF-1 α étant la principale. SDF-1 reconnaît 2 récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs CXC chemokine receptor type 4 et 7 : CXCR4 et CXCR7. Les rôles biologiques de SDF-1 seraient principalement assurés par l'activation de CXCR4, qui régule notamment les voies de signalisation PI3K/Akt, ERK1/2, β -arrestine, JAK/STAT et NF- κ B. CXCR7 est quant à lui principalement impliqué dans la régulation de la concentration extracellulaire de SDF-1 en internalisant le complexe CXCR7/SDF-1 pour qu'il soit dégradé par la voie β -arrestine (**Figure 61**). CXCR4 a été décrit pour la première fois en 1996, lorsqu'il est identifié en tant que cofacteur permettant la fusion du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) avec ses cellules cibles (Y. Feng et al. 1996).

SDF-1 est principalement connu pour son rôle dans le maintien des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques dans la moelle osseuse et le recrutement de cellules souches mésenchymateuses lors d'une blessure mais ce facteur participe également au développement embryonnaire et à l'ossification endochondrale ainsi qu'au métabolisme des chondrocytes en régulant la prolifération et la mort des chondrocytes (Bragg et al. 2019; J. Li et al. 2021).

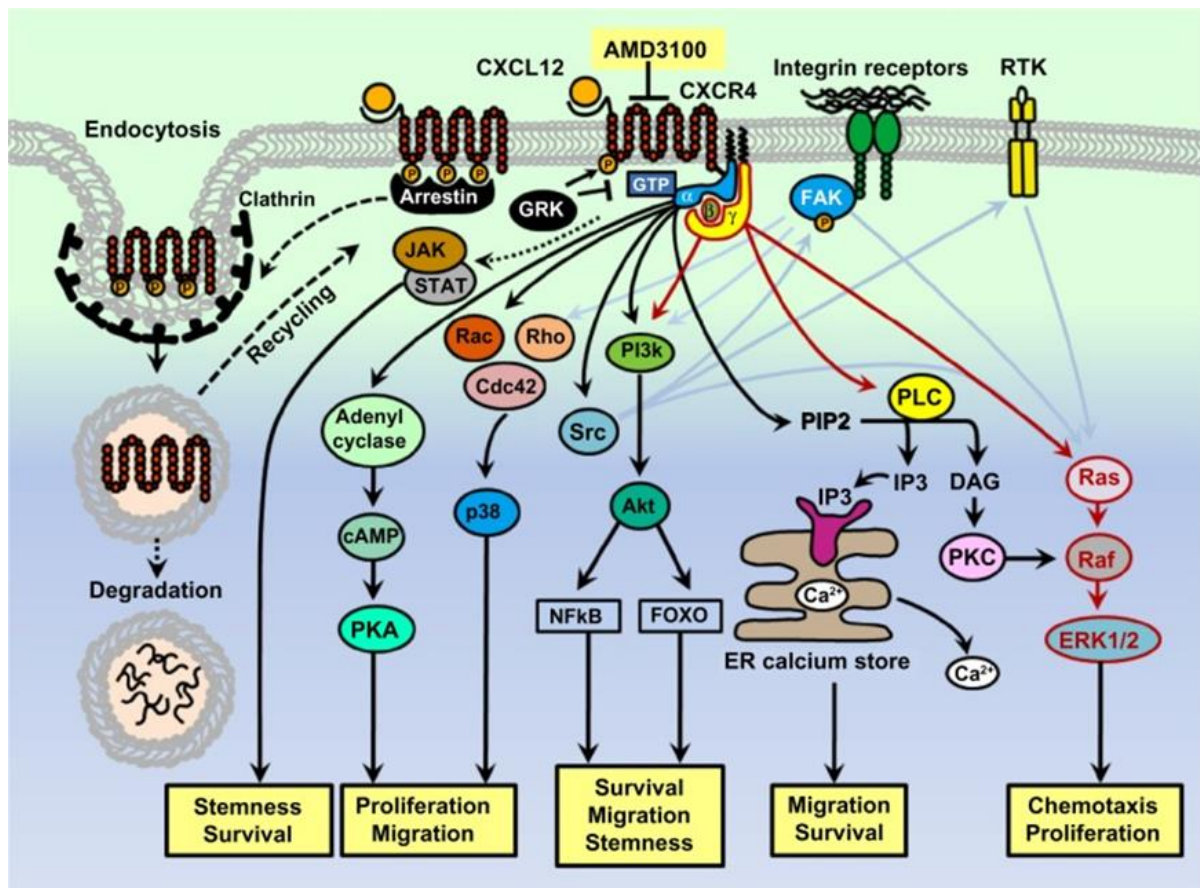


Figure 61. Schéma des différentes voies de signalisation impliquant l'axe SDF-1/CXCR4. La liaison de SDF-1 (CXCL12) à son récepteur CXCR4 entraîne l'activation de différentes voies de signalisation, conduisant à la survie, la prolifération cellulaire, le chimiotactisme, l'augmentation de calcium intracellulaire et la transcription de gènes. D'après (Cojoc et al. 2013)

a. SDF-1 et ossification endochondrale

Il a été démontré que SDF-1 jouait de multiples rôles au cours de l'embryogenèse, en participant notamment à la lymphopoïèse, au maintien de la niche hématopoïétique, à la formation du septum ventriculaire du cœur, à la migration des neurones du cervelet et de l'hippocampe, à la structure du système vasculaire intestinal et à la migration des cellules musculaires squelettiques des membres (García-Andrés et Torres 2010).

Au cours de l'ossification endochondrale, SDF-1 régule la différenciation chondrogénique induite par BMP-2 et favorise la prolifération et la maturation des chondrocytes (Guang, Boskey, et Zhu 2012; G.-W. Kim et al. 2015). L'axe SDF-1/CXCR4 jouerait également un rôle clé dans l'hypertrophie des chondrocytes de la plaque de croissance et la transition d'un tissu cartilagineux vers un tissu osseux (L. Wei et al. 2010). Le récepteur CXCR4 est

principalement exprimé par les chondrocytes hypertrophiques, tandis que SDF-1 est exprimé dans la moelle osseuse adjacente. Wei *et al.* ont démontrés que la transfection de CXCR4 dans des chondrocytes pré-hypertrophiques augmentait l'expression de marqueurs de l'hypertrophie, Runx2, MMP-13 et collagène de type X, en réponse au SDF-1. Ces résultats suggèrent que SDF-1, produit par les cellules de la moelle osseuse, diffuse jusqu'à la plaque de croissance où il favorise la différenciation hypertrophique et donc la croissance osseuse (L. Wei et al. 2010). Murata *et al.* confirment ces résultats et montrent que les embryons de souris SDF-1^{-/-} présentent des humérus plus court que les embryons de souris wild-type, notamment dû à une zone hypertrophique réduite chez les souris SDF-1^{-/-}. En analysant le cytosquelette d'actine, ils ont pu montrer que celui-ci était interrompu chez les souris SDF-1^{-/-}. L'ajout de SDF-1 restaure la fonctionnalité cellulaire indiquant que SDF-1 pourrait réguler la polymérisation de l'actine et stimuler la croissance osseuse via l'hypertrophie des chondrocytes (K. Murata et al. 2012).

b. SDF-1 et métabolisme des chondrocytes

Dans des études *ex vivo*, Kim *et al.* ont démontré que SDF-1 favorisait l'expression de cycline D1 par la voie Erk1/2 et NF- κ B et donc la prolifération des chondrocytes (G.-W. Kim et al. 2015). Cependant, d'autres travaux ont montré que l'inhibition de SDF-1, via la transfection de MiR-31 dans une lignée de chondrocytes humains, accélérât la prolifération des chondrocytes (Y. Dai et al. 2019).

SDF-1 régule également différents processus de mort cellulaire, la nécrose, l'apoptose et l'autophagie, bien que les mécanismes précis par lesquels il agit ne sont pas encore totalement élucidés. Wei *et al.* ont montré que des concentrations élevées de SDF-1 (≥ 200 ng/mL) conduisaient à la mort des chondrocytes, via l'activation de la voie MAPK/p38, en promouvant la libération d'HMGB1 (High Mobility Group Box Chromatin Protein 1), un marqueur de nécrose cellulaire (L. Wei et al. 2006). Gao *et al.* ont prouvé que SDF-1 favorisait l'apoptose des cellules terminales de la plaque de croissance, en utilisant un antagoniste de CXCR4, le peptide T140, qui en inhibant l'axe SDF-1/CXCR4 diminue l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, et augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Gao et al. 2020).

c. SDF1 et ostéoclastogénèse

SDF-1 régule également les étapes initiales de l'ostéoclastogénèse (**Figure 62**). L'équipe d'Osdoby a démontré que SDF-1 augmentait la survie et la migration des cellules de la lignée RAW264.7, via une augmentation de la production de MMP-9 (Wright et al. 2005; Yu et al. 2003). Des études similaires ont montré qu'en présence de SDF-1, M-CSF et RANKL stimulaient la production de MMP-9, TRAP, RANK et cathepsine K par les ostéoclastes et augmentaient leur capacité de résorption (Zannettino et al. 2005). Contrairement à d'autres chimiokines qui exercent leurs effets sur des ostéoclastes matures, SDF-1 semble être nécessaire durant les phases précoces de l'ostéoclastogénèse. En effet, l'expression de CXCR4 par les précurseurs monocytaires diminue progressivement au cours de la maturation des ostéoclastes (Grassi et al. 2003; Zannettino et al. 2005).

Le rôle de SDF-1 dans le remodelage osseux pathologique a été démontré dans la polyarthrite rhumatoïde. Les études de Grassi *et al.* ont révélé que des taux élevés de SDF-1 dans les tissus synoviaux et osseux étaient corrélés à une perte osseuse causée par un recrutement accru et une activation des ostéoclastes aux sites inflammatoires (Grassi et al. 2004).

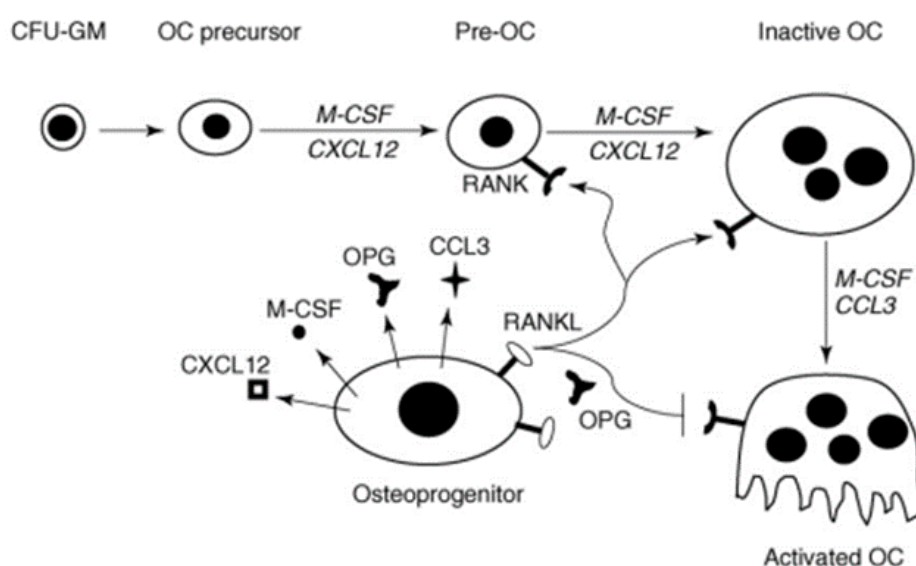


Figure 62. Schéma de la différenciation et de l'activation ostéoclastogénique de précurseurs monocytaires. Les cellules osseuses produisent plusieurs cytokines, dont M-CSF et RANKL qui stimulent la différenciation de cellules progénitrices en ostéoclastes et assurent leur maturation en ostéoclastes fonctionnels. SDF1 (CXCL12) agit à différents stades précoces de la différenciation ostéoclastogénique. D'après (Gronthos et Zannettino 2007)

d. SDF-1 et arthrose

Dans l'articulation arthrosique, de grandes quantités de SDF-1 se retrouvent dans le liquide synovial. La concentration de SDF-1 dans le liquide synovial de patients arthrosiques (≥ 200 ng/mL) est 3 fois plus élevée que celle d'individus sains (≤ 100 ng/mL) (Kanbe, Takagishi, et Chen 2002). De plus, ces fortes concentrations sont corrélées à la sévérité de l'arthrose radiologique (Xu et al. 2012). SDF-1 est produit par les synoviocytes fibroblastiques de la membrane synoviale et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 sont exprimés à la surface des chondrocytes (S. W. Jones et al. 2006; Kanbe, Takagishi, et Chen 2002; L. Wei et al. 2010). En se liant à CXCR4 sur les chondrocytes, SDF-1 active la signalisation Erk ce qui résulte à l'augmentation de l'expression de MMP-13, qui contribue à la dégradation de la matrice du cartilage (Chiu et al. 2007).

SDF-1 participe également aux processus arthrosiques impliquant l'os sous-chondral. Des quantités élevées de SDF-1 sont également retrouvées dans l'os sous-chondral de patients arthrosiques (Y. Chen et al. 2017). Lisignoli *et al.* ont démontré que SDF-1 induit la prolifération d'ostéoblastes chez les patients arthrosiques ainsi qu'une augmentation du collagène de type I (Lisignoli et al. 2006), conduisant à une densité osseuse accrue, une augmentation du métabolisme de l'os sous-chondral et la formation d'ostéophytes (P. Li et al. 2016). En isolant des cellules de moelle osseuse murines, Goto *et al.* ont étudié l'axe SDF-1/CXCR4 en présence de RANKL et de M-CSF. Ils ont constaté qu'en éliminant les cellules CXCR4⁺/CD45⁻ en présence de RANKL, l'ostéoclastogénèse était fortement affectée (Goto et al. 2016).

e. Stratégies thérapeutiques ciblant SDF-1 dans l'arthrose

L'axe SDF-1/CXCR4 et son rôle dans l'arthrose, ainsi que d'autres pathologies de l'articulation, font l'objet de nombreuses recherches. Après avoir montré l'augmentation de CXCR4 et de SDF-1 dans l'arthrose, de nombreuses études ont étudié les effets de l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 dans l'apparition de la pathologie. Parmi les inhibiteurs, l'AMD3100 et le T140 sont les plus couramment utilisés. Ces deux inhibiteurs ont été approuvés pour une utilisation chez l'homme dans le traitement du VIH et du cancer, le T140 faisant également partie du traitement des pathologies inflammatoires chroniques. Après induction d'une arthrose post-traumatique chez la souris par transection du ligament croisé antérieur (ACLT), Dong *et al.* ont administré de l'AMD3100 via une mini-pompe osmotique délivrant une dose de 180 μ g d'AMD3100 par jour. En utilisant des techniques de μ -CT, ils ont constaté que le traitement

par l'AMD ralentissait la progression de la perte osseuse chez les souris ACLT (Y. Dong et al. 2016). Wei *et al.* ont montré des résultats similaires chez le cochon d'inde Hartley, où l'AMD3100 améliorait considérablement les dommages du cartilage ainsi que les niveaux de SDF-1, GAG, MMP et IL-1 β dans le liquide synovial (Fangyuan Wei et al. 2012). De plus, les souris ACLT traitées à l'AMD3100 ont montré une réduction du nombre de cellules CXCR4+ et TRAP+ présentes dans l'os sous-chondral et une atténuation de la dégradation du cartilage, notamment par une réduction de l'expression de MMP-13 (Y. Dong et al. 2016). Thomas *et al.* ont démontré par immunohistochimie que l'expression de MMP-13, après DMM chez les souris traitées à l'AMD3100, diminuait significativement par rapport aux souris DMM traitées au PBS (Thomas et al. 2015). Un autre inhibiteur de CXCR4, le peptide T140, exerce les mêmes effets protecteurs. L'administration de T140 par mini-pompe osmotique diminue l'expression de MMP-3, MMP-9 et MMP-13 et augmente l'expression de collagène de type II et d'agrécan (K. Wang et al. 2017).

L'équipe de Cui s'est également intéressée à l'axe SDF-1/CXCR4 dans les interactions entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral dans un contexte arthrosique (Qin et al. 2019). Qin *et al.* ont rapporté que l'augmentation de SDF-1 dans l'os sous-chondral de souris arthrosiques induisait une détérioration osseuse due à un recrutement accru de cellules souches mésenchymateuses et d'ostéoclastes. Cette détérioration fait suite à une résorption osseuse excessive, visible par un élargissement de la cavité de la moelle osseuse. Ils suggèrent que SDF-1 transite du l'os sous-chondral jusqu'au cartilage articulaire, où il entraîne une dégradation de la matrice du cartilage. Ces différents effets sont annulés suite à l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100 administré via une pompe osmotique, aussi bien de manière systémique que localement dans l'os sous-chondral, chez la souris et le rat (Qin et al. 2019). Plus récemment, l'équipe de Cui a étudié le rôle de l'axe SDF-1/CXCR4 dans le remodelage de l'os sous-chondral arthrosique en s'intéressant particulièrement aux vaisseaux. Ainsi, Qin *et al.* ont mis en évidence l'implication de SDF-1 dans l'angiogenèse pathologique de l'os sous-chondral, via la formation de vaisseaux H (**Figure 63**) (Qin et al. 2021).

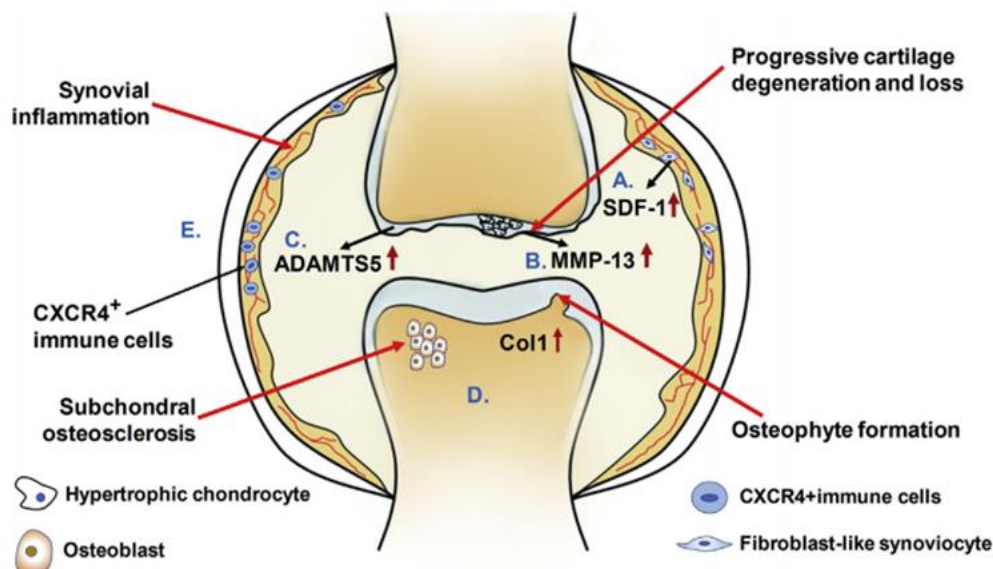


Figure 63. Schéma des différents événements pathologiques régulés par SDF-1 dans l'arthrose. (A) Les synoviocytes fibroblastiques libèrent du SDF-1 dans la cavité articulaire. De fortes concentrations de SDF-1 peuvent entraîner la mort des chondrocytes. (B) SDF-1 favorise la différenciation hypertrophique des chondrocytes et augmente la production de MMP-13, qui dégrade le collagène de la matrice extracellulaire du cartilage. (C) SDF-1 régule la signalisation de Runx2 des chondrocytes, conduisant à une augmentation de l'activité d'enzymes cataboliques comme l'ADAMTS-5. (D) SDF-1 favorise la prolifération des ostéoblastes et participe à la sclérose de l'os et à la formation d'ostéophyte, par une augmentation de l'expression de collagène de type 1. (E) SDF-1 recrute des cellules immunitaires périphériques CXCR4+ à la membrane synoviale, conduisant à une inflammation. D'après (J. Li et al. 2021).

4.2.2. Mise en évidence de la présence de SDF-1 dans des tissus humains arthrosiques

Nous nous sommes intéressés à l'expression de SDF-1 dans l'arthrose humaine. Pour cela nous avons accès grâce à notre Biobanque BioJoint à des tissus humains (os, cartilage, membrane synoviale, tissu adipeux intra-articulaire) provenant de patients arthrosiques.

Les tissus osseux et cartilagineux provenant de plateaux tibiaux et de condyles fémoraux de patients arthrosiques libèrent du SDF-1. En moyenne, 115,0 pg/mL de SDF-1 est retrouvé dans les milieux conditionnés d'os et 411,3 pg/mL de SDF-1 dans les milieux conditionnés de cartilage, soit 3,5 fois plus (**Figure 64**).

Ainsi, le cartilage de patients arthrosiques est une source majeure de SDF-1, plus importante que le tissu osseux arthrosique, et pourrait contribuer à la progression de la pathologie.

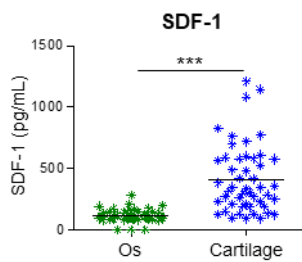


Figure 64. Expression protéique de SDF-1 dans des tissus humains arthrosiques. Dosage par ELISA de SDF-1 dans de l'os et du cartilage issus des condyles fémoraux et des plateaux tibiaux de patients arthrosiques. (n=41-49)

Dans le cartilage, SDF-1 est détecté en surface (**Figure 65 B, C, E**), au sein d'agrégats de chondrocytes (**Figure 65 B, C**) et en profondeur dans les chenaux vasculaires du cartilage calcifié et atteignant la tidemark (**Figure 65 A, B**). Les chenaux vasculaires contiennent des vaisseaux, repérés par l'immunomarquage positif pour CD31 (**Figure 65 G**), et des ostéoblastes, qui expriment le facteur de transcription Runx2 (**Figure 65 I**). Certains chondrocytes du cartilage calcifié montrent une immunoréactivité pour SDF-1 (**Figure 65 A, astérix**).

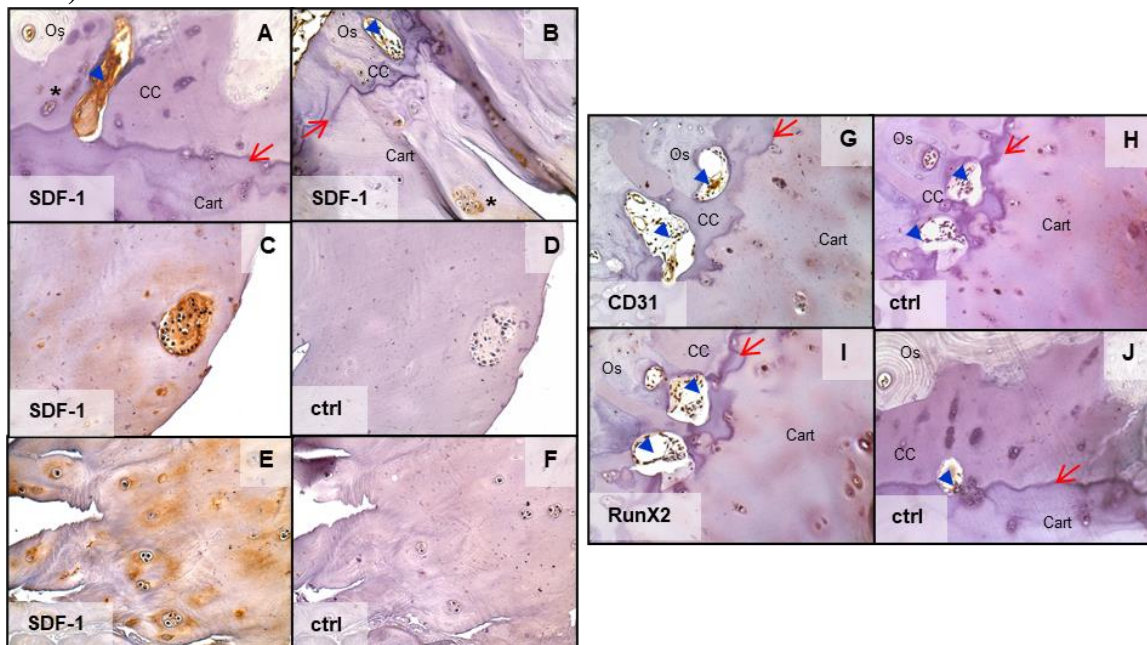


Figure 65. Expression de SDF-1 dans des tissus humains arthrosiques. Immunohistochimies de SDF-1 sur des coupes d'os et de cartilage de patients arthrosiques. SDF-1 est localisé en surface (B, C, E), dans les chenaux vasculaires (A) ainsi que dans les clusters de chondrocytes (B, C). Les vaisseaux sont détectés par un marquage positif CD31 (G) et les ostéoblastes par un marquage positif Runx2 (I). Aucun marquage n'est observé dans les lames contrôles (D, F, H, J). Cart : cartilage ; CC : cartilage calcifié ; Os : os sous-chondral. Tête de flèche : chenaux vasculaires, flèche : tidemark. (Objectif x200)

Ainsi, le cartilage arthrosique libère de grandes quantités de SDF-1 qui pourrait diffuser jusqu'à l'os sous-chondral, agir au niveau des vaisseaux de la jonction ostéochondrale et promouvoir l'angiogenèse ostéochondrale. Les chondrocytes hypertrophiques, qui produisent du SDF-1, pourraient ainsi être des acteurs majeurs de la vascularisation pathologique du cartilage au cours de l'arthrose.

4.3. Evaluation de l'impact de l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 sur l'angiogenèse

Qin *et al.* ont récemment révélé l'implication de l'axe SDF-1/CXCR4 dans l'angiogenèse ostéochondrale dans un contexte arthrosique. Après avoir montré que SDF-1 favorisait la prolifération, la migration et la tubulogenèse de cellules endothéliales HUVEC, et que ces effets étaient inhibés par l'AMD3100, ils ont démontré que l'AMD3100 diminuait significativement le nombre de vaisseaux CD31^{hi}Emcn^{hi}, jusqu'à un niveau comparable aux souris non arthrosiques (Qin et al. 2021).

Ainsi, SDF-1 se révèle être une cible prometteuse dans l'étude de l'angiogenèse ostéochondrale au cours de l'arthrose. Nous avons donc étudié l'impact de l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4, par l'AMD3100, dans l'activité angiogénique assurée par les chondrocytes hypertrophiques.

4.3.1. Effets de l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 dans l'activité angiogénique des chondrocytes

a. Inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 et migration cellulaire

Le test fonctionnel de migration de cellules endothéliales ou « *scratch assay* » a été effectué en incubant les cellules endothéliales avec de l'AMD3100 pendant 1h à 37°C, avant la réalisation de la fente.

On retrouve des résultats similaires aux résultats précédents avec les milieux conditionnés de chondrocytes. Le milieu basal supplémenté en facteurs de croissance (contrôle positif) stimule la migration des cellules endothéliales et permet une fermeture progressive de la fente. Au bout de 24h, 82% de la fente est colonisée par des cellules endothéliales. Le milieu basal sans sérum ni facteurs de croissance (contrôle négatif) ne permet pas la fermeture de la fente, puisque la surface de la fente ne descend jamais en dessous de 100%. En revanche, celle-ci a tendance à s'élargir légèrement au cours de l'expérimentation. Les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques stimulent la migration de cellules endothéliales, puisque la surface de la fente diminue progressivement, passant de 82% à 43% de la surface initiale, à 6h et 15h de migration (**Figure 66 A, B, C**).

L'AMD3100 ne semble pas affecter la migration des cellules endothéliales en réponse à la stimulation par les milieux contrôle négatif et positif. En effet, les courbes de cinétique de

fermeture de la fente se superposent pratiquement (**Figure 66 A**). En revanche, l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100 semble affecter la migration des cellules endothéliales en réponse à la stimulation par les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques. En effet, la migration cellulaire est totalement inhibée, et atteint des niveaux comparables au contrôle négatif. Ces premiers résultats demandent cependant à être complétés.

Ainsi, les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques ne présentent plus d'effet migratoire sur les cellules endothéliales lorsque l'axe SDF-1/CXCR4 est inhibé. Les chondrocytes hypertrophiques exercent donc leur effet pro-angiogénique et plus particulièrement leur effet migratoire via la sécrétion de SDF-1.

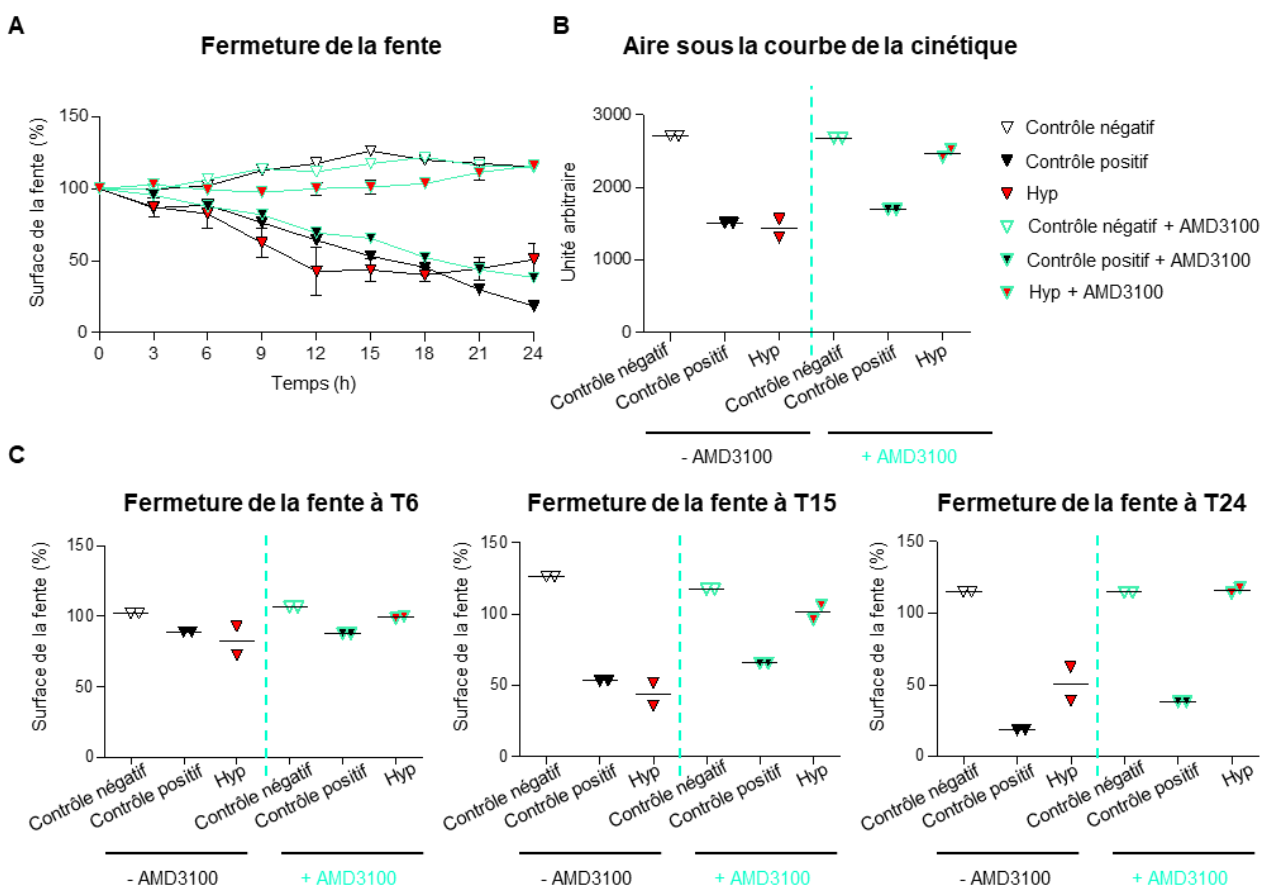


Figure 66. Migration de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques, après inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4. (A) Cinétique de la fermeture de la zone acellulaire (fente) en réponse à une stimulation de 24h par des milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques, avec ou sans inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100. Les valeurs sont représentées en pourcentage de la surface de la fente à T0. (B) Aire sous la courbe de la cinétique de fermeture de la fente. (C) Fermeture de la fente après 6h, 15h et 24h de migration des cellules endothéliales (n=2)

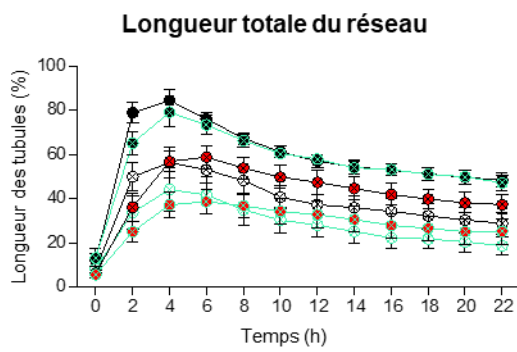
b. Inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 et formation de tubules sur Matrigel

Le test fonctionnel de formation de tubules ou angiogenèse en deux dimensions a été effectué en incubant les cellules endothéliales avec de l'AMD3100 pendant 1h à 37°C, avant utilisation.

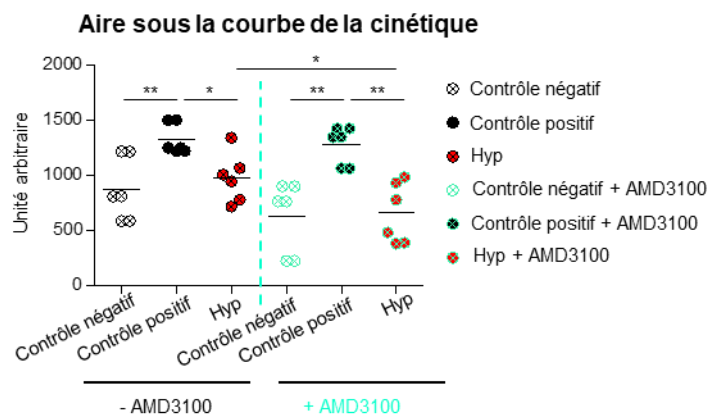
Dans cette série d'expériences, nous retrouvons une induction de la formation de tubules grâce à la stimulation par un milieu basal supplémenté en sérum et en facteurs de croissance (contrôle positif), avec un pic de tubules qui apparaît plus tôt que lors de la précédente série d'expériences avec les milieux conditionnés (4h contre 8h). Le milieu positif entraîne une tubulogenèse (longueur totale et nombre de jonctions du réseau) plus importante que le milieu basal seul (contrôle négatif), que ce soit à 6h, 15h ou 22h. Cependant, le contrôle négatif entraîne une tubulogenèse qui n'était pas observée auparavant (**Figure 67 A, B, C**). Les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques induisent également une tubulogenèse, avec un pic entre 6 et 8h. Néanmoins, pas de différence significative n'est observée avec le contrôle négatif. Sur l'ensemble de la cinétique de tubulogenèse, l'AMD3100 n'affecte pas la formation de tubules des cellules endothéliales, que l'on analyse la longueur totale ou le nombre de jonctions du réseau, en réponse à une stimulation par le contrôle négatif ou positif. En revanche, la tubulogenèse induite par les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques est significativement réduite lorsque l'axe SDF-1/CXCR4 est inhibé (**Figure 67 B, E**). En effet, lorsque l'on analyse la longueur totale du réseau, on observe une diminution de la taille du réseau de tubules après stimulation par les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques sous l'effet de l'AMD3100 à 8h et 22h (**Figure 67 C**). La diminution de la tubulogenèse induite par les chondrocytes hypertrophiques est observée à 2h, 8h et 22h sous l'effet de l'AMD3100, lorsque l'on analyse le nombre de jonctions du réseau (**Figure 67 F**). Une différence sur la longueur totale du réseau et le nombre de jonctions est observée à 2h entre le contrôle positif avec et sans inhibition de CXCR4, mais cette différence disparaît à 8h et 22h. En revanche, une différence sur le nombre de jonctions est observée à 2h, 8h et 22h, entre le contrôle négatif avec et sans inhibition de CXCR4 (**Figure 67 C, F**).

Pour conclure, malgré une tubulogenèse basale élevée, les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques ne présentent plus d'effet angiogénique lorsque l'axe SDF-1/CXCR4 est inhibé. Les chondrocytes hypertrophiques exercent donc leur effet pro-angiogénique inducteur de structures tubulaires, principalement via la sécrétion de SDF-1.

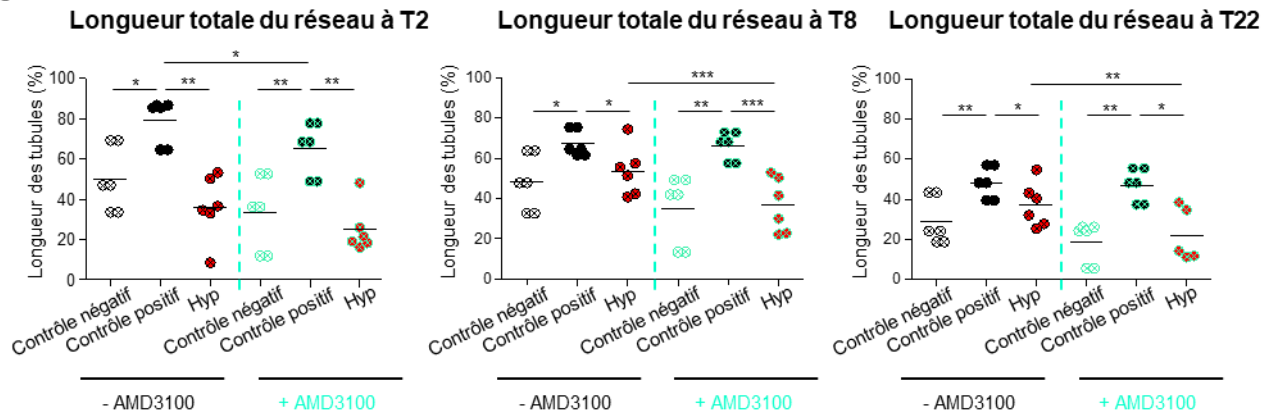
A



B



C



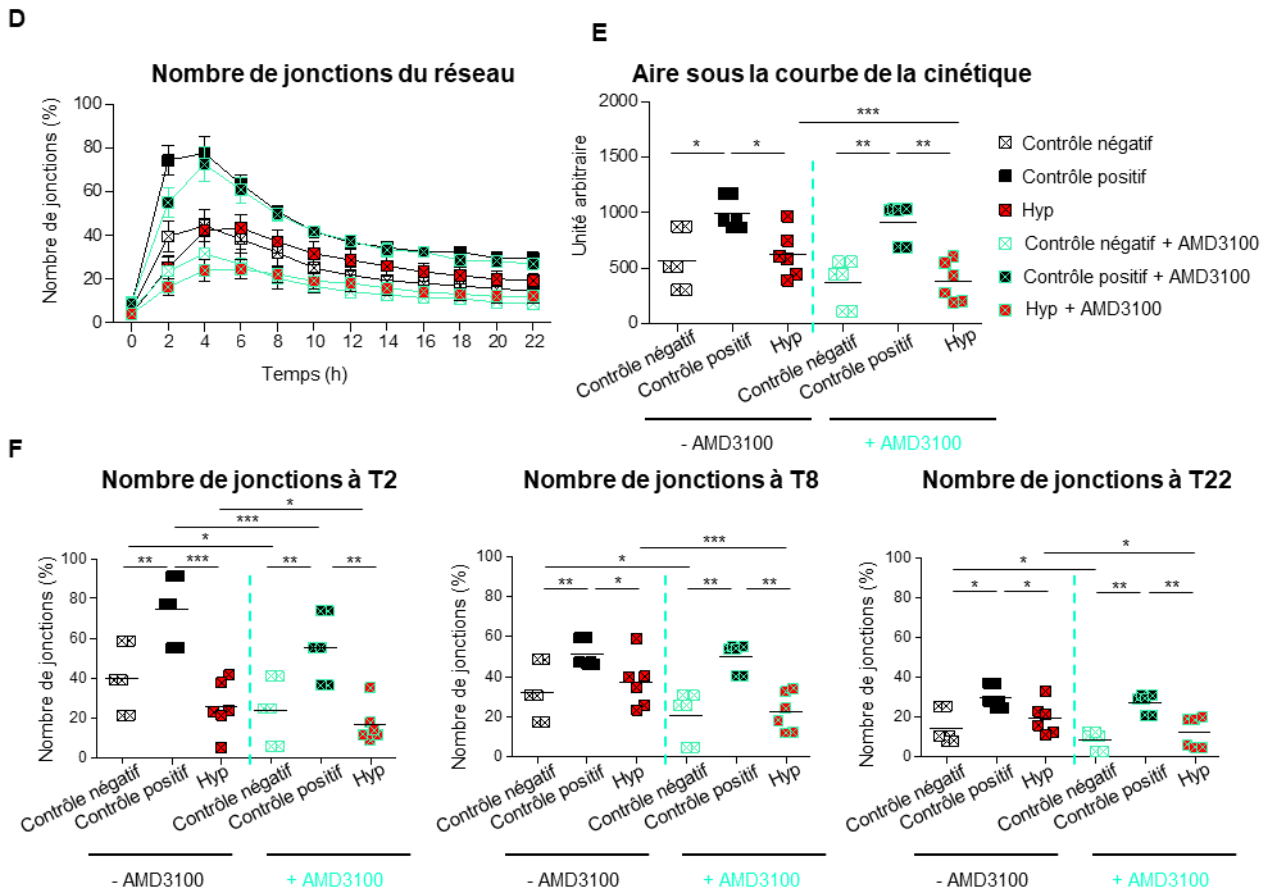


Figure 67. Formation de tubules sur Matrigel ou angiogénèse en 2 dimensions de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes, après inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4. (A) Cinétique de la longueur totale du réseau de tubules en réponse à une stimulation de 24h par des milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques, avec ou sans inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4. Les valeurs sont représentées en pourcentage de la longueur maximale de tubules formés. (B) Aire sous la courbe de la cinétique. (C) Longueur totale du réseau de tubules à 2h, 8h et 22h. (D) Cinétique du nombre de jonctions du réseau de tubules. Les valeurs sont représentées en pourcentage du nombre maximal de jonctions formées (E) Aire sous la courbe de la cinétique de nombre de jonctions du réseau (F) Nombre de jonctions du réseau de tubules à 2h, 8h et 22h. (n=6)

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse permet de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques régissant l'angiogenèse ostéochondrale au cours de l'arthrose.

Notre équipe a mis au point un nouveau modèle de différenciation progressive de chondrocytes articulaires en chondrocytes hypertrophiques, qui peut être utilisé pour investiguer les facteurs régulant la différenciation hypertrophique des chondrocytes ou bien les conséquences de la différenciation hypertrophique sur des processus physiologiques ou pathologiques.

Grâce à ce modèle cellulaire, nous avons pu approfondir la caractérisation de la transition phénotypique des chondrocytes pré-hypertrophiques en chondrocytes hypertrophiques et étudier les conséquences de cette différenciation sur la transcription de gènes cibles et sur différents processus qui ont lieu à la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose, l'angiogenèse et l'ostéoclastogenèse. Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre en avant le rôle des chondrocytes hypertrophiques dans les événements pathologiques qui ont lieu à l'interface os/cartilage.

Pour résumer, ce travail a montré que :

- La différenciation des chondrocytes pré-hypertrophiques en chondrocytes hypertrophiques est associée à une dérégulation transcriptionnelle, favorisant le remodelage osseux et l'angiogenèse.
- Les chondrocytes hypertrophiques possèdent un potentiel angiogénique et ostéoclastogénique que l'on a détaillé à l'aide tests fonctionnels *in vitro*.
- Les chondrocytes hypertrophiques sécrètent des facteurs qui favorisent davantage la différenciation de monocytes en ostéoclastes que les facteurs sécrétés par les chondrocytes pré-hypertrophiques.
- Les cellules endothéliales adhèrent mieux aux matrices extracellulaires de chondrocytes hypertrophiques qu'aux matrices pré-hypertrophiques.

- Les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques sécrètent des facteurs qui limitent la prolifération de cellules endothéliales, mais que cette limitation est moins forte pour les chondrocytes hypertrophiques.

- Les chondrocytes hypertrophiques sécrètent des facteurs qui favorisent davantage la prolifération de cellules endothéliales que les facteurs libérés par les chondrocytes pré-hypertrophiques.

- Les chondrocytes hypertrophiques sécrètent des facteurs qui favorisent la migration de cellules endothéliales.

- Les chondrocytes sécrètent des facteurs qui favorisent la tubulogenèse de cellules endothéliales.

- Les chondrocytes sécrètent des facteurs pro-angiogéniques et pro-ostéoclastogéniques, comme SDF-1 qui constitue notre cible d'intérêt

- SDF-1 est libéré en grande quantité par le cartilage arthrosique et qu'il est produit par les chondrocytes du cartilage et du cartilage calcifié arthrosique, et qu'on le retrouve au niveau des chenaux vasculaires.

- Les chondrocytes hypertrophiques assurent leur effet pro-angiogénique via la sécrétion de SDF-1.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'angiogenèse ostéochondrale comme cible thérapeutique de l'arthrose

Le cartilage articulaire est un tissu non innervé et non vascularisé, contrairement à la grande majorité des tissus de l'organisme, grâce à une capacité de résistance à l'invasion de vaisseaux présents dans l'os sous-chondral et le cartilage calcifié, à l'état physiologique. Cette résistance à l'angiogenèse est possible par la présence de plusieurs facteurs anti-angiogéniques associés à la matrice extracellulaire du cartilage articulaire. Au cours de l'arthrose, le cartilage perd cette faculté de résistance à l'angiogenèse et des chenaux vasculaires traversant la tidemark pour « envahir » le cartilage articulaire peuvent être observés. Ainsi, des chenaux vasculaires, absents dans le cartilage articulaire sain, progressent de l'os sous-chondral jusqu'au cartilage articulaire. Le terme « d'invasion vasculaire » sous-entend que le cartilage deviendrait le siège d'une vascularisation qui se propagerait dans toute la matrice du cartilage articulaire. Cependant, le nombre de vaisseaux arrivant au cartilage reste limité. En effet, en moyenne 10-20 vaisseaux/mm² sont observés à la jonction ostéochondrale dans des modèles animaux d'arthrose (Qian et al. 2021; M. Saito et al. 2012). Chez les patients arthrosiques, le nombre de vaisseaux à la jonction ostéochondrale est inférieur à 10/mm (Fransès et al. 2010; Walsh et al. 2007a). Néanmoins, le nombre de vaisseaux traversant la tidemark est corrélé à la sévérité de la pathologie (Walsh et al. 2007a). Ainsi, il serait plus juste de parler de « pénétration vasculaire » que de réelle invasion de vaisseaux sanguins.

Nous avons montré que l'injection systémique d'Aflibercept dans un modèle de rat arthrosique limitait la sévérité de l'arthrose, en limitant les lésions du cartilage, le remodelage de l'os sous-chondral et le développement d'ostéophytes. L'Aflibercept (Zaltrap®), également connu sous le nom de VEGF-TRAP, est utilisé en 2^{ème} ligne du traitement du cancer colorectal métastatique résistant, en association avec des chimiothérapies. L'Aflibercept est une protéine de fusion recombinante de 115 kDa qui se compose d'une partie des récepteurs 1 et 2 du VEGF ainsi que d'un fragment Fc d'immunoglobuline humaine. L'Aflibercept agit alors comme un récepteur-leurre à haute affinité empêchant la fixation du VEGFA, VEGFB, PlGF1 et PlGF2 à leurs récepteurs VEGFR1 et 2 présents à la surface des cellules endothéliales. L'Aflibercept cible donc davantage de facteurs angiogéniques que le Bevacizumab (Avastin®), qui est un anticorps monoclonal anti-VEGFA. Bien que le VEGFB ait un rôle négligeable dans la croissance de vaisseaux sanguins, il est impliqué dans le maintien et la stabilité des vaisseaux

sanguins ainsi que dans la survie des différents types cellulaires associés aux vaisseaux (cellules endothéliales, péricytes, cellules musculaires lisses) (X. Li et al. 2009). Son implication dans la physiopathologie de l'arthrose n'a cependant pas été démontrée. Le PlGF, identifié pour la première fois dans le placenta humain, est un facteur angiogénique exprimé dans de nombreux organes, dont le tissu osseux. Le PlGF est impliqué dans le remodelage osseux au cours de la réparation suite à une fracture (Maes et al. 2006). Le rôle protecteur de l'Aflibercept dans l'arthrose n'avait encore jamais été démontré. Néanmoins, le Bevacizumab a montré son efficacité dans le traitement de l'arthrose, dans des modèles animaux, en inhibant l'angiogenèse synoviale et ostéochondrale (W. Li et al. 2019b; Nagai et al. 2014).

Notre hypothèse est que la différenciation hypertrophique des chondrocytes constitue un des moteurs de l'angiogenèse ostéochondrale, à travers un déséquilibre de la balance angiogénique. Notre modèle *in vitro* de différenciation hypertrophique nous a permis d'investiguer différentes cibles potentielles impliquées dans le remodelage de la jonction ostéochondrale. Dans notre modèle cellulaire, nous n'avons pas observé de différences entre les quantités de VEGF et de PlGF sécrétées entre les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Ainsi, d'autres facteurs, dont l'expression et la sécrétion sont dérégulées avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes, pourraient être impliqués dans le remodelage de la jonction ostéochondrale.

D'autres cellules que les chondrocytes hypertrophiques pourraient également assurer un rôle dans l'angiogenèse ostéochondrale, comme les ostéoblastes, les cellules souches mésenchymateuses ou les adipocytes médullaires. En effet, l'ostéogenèse et l'angiogenèse sont deux phénomènes couplés au cours du développement embryonnaire du squelette (Kusumbe, Ramasamy, et Adams 2014; Neag, Finlay, et Naylor 2021). Les ostéoblastes sont une source majeure de facteurs angiogéniques, dont le VEGF est le principal représentant, et sont en étroite relation avec les vaisseaux H (K. Hu et Olsen 2016; Sivan, De Angelis, et Kusumbe s. d.; Ying Wang et al. 2007; Yuan et al. 2014). Martinez *et al.* ont montré une diminution de la sécrétion du VEGF par les ostéoblastes avec l'âge, suggérant un rôle de ces cellules osseuses dans les défauts de vascularisation observés chez les sujets âgés (Martínez et al. 2002). Une autre étude a montré que les ostéoblastes de sujets sains et de patients arthrosiques et ostéoporotiques exprimaient et sécrétaient du VEGF et que les milieux conditionnés d'ostéoblastes arthrosiques induisaient une forte réponse angiogénique (Neve et al. 2013). Les cellules souches mésenchymateuses participent également à la vascularisation de l'os (Duffy et al. 2009; Watt et al. 2013). Ces cellules progénitrices favorisent l'angiogenèse et l'ostéogenèse via la sécrétion

d'exosomes chez le rat ostéoporotique (Qi et al. 2016). Les cellules souches mésenchymateuses stabilisent les nouveaux vaisseaux sanguins (W. C. W. Chen et al. 2013) et produisent de nombreux facteurs pro-angiogéniques et ostéoclastogéniques, qui placent les cellules souches mésenchymateuses au cœur de nouvelles stratégies thérapeutiques (Bronckaers et al. 2014; Nassiri et Rahbarghazi 2014). De plus, Xie *et al.* ont montré que l'activation de la signalisation FAK des cellules souches mésenchymateuses favorisait la formation de vaisseaux H, via la sécrétion de PDGF-BB par les pré-ostéoclastes (Xie et al. 2014). En effet, une sécrétion accrue de PDGF-BB est observée par les pré-ostéoclastes mononucléaires de la moelle osseuse de l'os sous-chondral, activant la signalisation PDGFR- β des péricytes impliqués dans la formation de néovaisseaux (Su et al. 2020). Plus récemment, Hu *et al.* ont montré que les cellules souches mésenchymateuses de l'os sous-chondral de souris arthrosiques stimulait l'angiogenèse *in vitro* et que cet effet était inhibé par l'ajout d'un anticorps anti-VEGF (Y. Hu et al. 2020). Des adipocytes et pré-adipocytes sont présents dans la moelle osseuse et pourrait contribuer à la vascularisation de la jonction ostéochondrale. Les adipocytes produisent des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques, parmi lesquels le PlGF, FGF2, Ang-2, l'angiostatine, l'endostatine, des thrombospondines, de l'IGF, ainsi que le VEGF, suggérant qu'ils pourraient également réguler l'angiogenèse (Christiaens et Lijnen 2010). Le rôle des adipokines a été rapporté dans des cancers osseux, où elles favorisent l'angiogenèse mais également l'ostéoclastogénèse (Shin et Koo 2020). L'apeline est une adipokine qui a été décrite comme impliquée dans l'angiogenèse de la membrane synoviale arthrosique, en stimulant l'expression de VEGF par les synoviocytes fibroblastiques (Y.-H. Wang et al. 2020).

Dans notre modèle de rat arthrosique, nous avons observé un important remodelage de l'os sous-chondral, visible par une désorganisation de la plaque sous-chondrale et par la présence d'un marquage des protéoglycanes. La fibrose de l'os sous-chondral a été décrite dans de nombreuses études chez des patients arthrosiques (Donell 2019; Loef et al. 2018). Cependant, nous n'avons pas étudié plus en détail ces anomalies de l'os sous-chondral. Avant le sacrifice, nous avons injecté de la tétracycline aux rats contrôle et Aflibercept, à 5 jours d'intervalle, afin de quantifier la formation osseuse durant cet intervalle. En effet, la tétracycline est utilisée dans l'étude des pathologies osseuses, pour mettre en évidence des défauts de minéralisation et reflète l'activité des ostéoblastes dans le processus de calcification (Fallon et Teitelbaum 1982).

Nous avons également observé la formation d'excroissances osseuses en marge de l'articulation, appelées ostéophytes. La formation des ostéophytes résulte de la récapitulation

du processus d'ossification endochondrale et met en jeu les cellules souches mésenchymateuses du périoste. Roelofs *et al.* ont récemment montré que les cellules progénitrices à l'origine de la formation des ostéophytes dérivent des cellules Gdf5⁺, c'est-à-dire des cellules de l'interzone embryonnaires impliquées dans la formation des articulations synoviales. Bien que les ostéophytes se développent généralement à proximité du cartilage articulaire, les chondrocytes du cartilage ne participent pas à l'apparition des ostéophytes. En effet, cette étude démontre l'implication de progéniteurs du périoste Sox9⁺ et de progéniteurs de la membrane synoviale Prg4⁺. Ces derniers seraient impliqués dans la formation du cartilage à la surface des ostéophytes mais pas à la partie osseuse des ostéophytes. En revanche, les progéniteurs nestine⁺, Leptine-récepteur⁺ et Gremlin-1⁺ ne semblent pas contribuer à la formation des ostéophytes (Roelofs et al. 2020). Plusieurs études suggèrent que les ostéophytes seraient mis en place comme un mécanisme d'adaptation du squelette, servant à stabiliser l'articulation arthrosique en augmentant la surface du cartilage (Peter M. van der Kraan et van den Berg 2007b). L'angiogenèse et l'inflammation de la membrane synoviale sont étroitement liées dans l'articulation arthrosique (Bonnet 2005; Haywood et al. 2003). Un épaissement de la membrane synoviale a été observé dans notre modèle de rat arthrosique, cependant nous n'avons pas investigué le rôle de l'Aflibercept dans l'angiogenèse synoviale. Néanmoins, avec l'administration systémique de l'Aflibercept, nous pouvons nous attendre à une réduction de l'angiogenèse synoviale, comme c'est le cas avec le Bevacizumab qui réduit l'hyperplasie et le nombre de cellules VEGF⁺ de la membrane synoviale (W. Li et al. 2019b; Nagai et al. 2014). Une analyse histomorphométrique des ostéophytes mais également de la membrane synoviale pourrait compléter notre étude de l'inhibition de l'arthrose par l'Aflibercept.

Notre étude de l'inhibition de l'angiogenèse ostéochondrale a été compliquée par la présence de peroxydases endogènes dans la moelle osseuse. En effet, malgré une inhibition des peroxydases endogènes avec 6% d'H₂O₂ pendant 1h, la moelle osseuse des pattes de rats présente une forte immunoréactivité, occultant le marquage de différents marqueurs endothéliaux, comme CD34. Nous avons détecté la présence de chenaux vasculaires par la présence du récepteur VEGFR3 (également connu sous le nom de Flt4), exprimé par les vaisseaux H, néanmoins un comptage précis des chenaux vasculaires traversant la tidemark doit être effectué pour évaluer l'inhibition de l'angiogenèse ostéochondrale. De manière intéressante, les clusters de chondrocytes présents dans le cartilage articulaire des rats contrôle présentent un marquage positif pour VEGFR3. L'expression de ce récepteur dans le cartilage arthrosique a été peu étudié mais une étude a montré que les chondrocytes arthrosiques présents

à la surface du cartilage arthrosique de patients exprimaient ce récepteur au niveau de leur cytoplasme et de la surface de leur membrane (Shakibaei et al. 2003). Le VEGF-C, un des ligands de VEGFR3, est détecté dans la membrane synoviale arthrosique et pourrait atteindre le liquide synovial puis diffuser dans le cartilage articulaire et cibler les chondrocytes (Paavonen et al. 2002).

Enfin, nous avons choisi le rat comme modèle animal d'arthrose. Le choix d'un modèle murin autre que la souris s'est fait car nous souhaitons évaluer les effets de l'inhibition de l'angiogenèse ostéochondrale dans la progression de l'arthrose, en injectant nos molécules d'intérêt directement dans l'os sous-chondral. Pour cela, des billes d'alginate contenant nos inhibiteurs d'intérêt seront implantées localement dans l'os sous-chondral du compartiment tibial de rats lors de la chirurgie visant à déstabiliser le ménisque, suite à la réalisation du canal à l'aide d'une aiguille au travers du cartilage. Cette méthode a été utilisée par Zhen *et al.* afin d'inhiber la signalisation TGF- β dans l'os sous-chondral et atténuer la sévérité de l'arthrose chirurgicalement induite (Z. Cui et al. 2016; Zhen et al. 2013). Les billes d'alginate permettent une diffusion lente et continue de molécules directement dans le compartiment osseux, au plus près des cellules cibles, les cellules endothéliales des vaisseaux H. Parmi les cibles potentielles, nous souhaitons injecter localement dans l'os sous-chondral de l'Aflibercept afin comparer les effets locaux et les effets systémiques mais également de l'AMD3100, pour cibler l'axe SDF-1/CXCR4 dans l'angiogenèse ostéochondrale, et du MAZ51, un antagoniste du VEGFR3, pour cibler spécifiquement les vaisseaux H.

Nous souhaitons également évaluer la progression de l'arthrose induite par DMM dans un modèle de souris conditionnel knock-out inductible pour SDF-1 dans les chondrocytes hypertrophiques. Ces souris sont obtenues suite au croisement de souris exprimant la Cre recombinase liée au récepteur aux œstrogènes sous le contrôle du promoteur du collagène 10 (*Col10-Cre^{ERT}*) et de souris *Sdf-1^{fl/fl}*. Ainsi la délétion de *Sdf-1* dans les chondrocytes hypertrophiques est inductible suite à un traitement au tamoxifène. La sévérité de l'arthrose et l'angiogenèse ostéochondrale sera évaluée par histologie, à l'aide du score OARSI et d'immunomarquages des vaisseaux sanguins, le remodelage de l'os sous-chondral sera examiné par histomorphométrie et μ CT.

Le modèle de différenciation hypertrophique des chondrocytes

L'arthrose se caractérise par des modifications cellulaires, dont une différenciation hypertrophique des chondrocytes, conduisant à une minéralisation du cartilage articulaire. La différenciation hypertrophique des chondrocytes au cours de l'arthrose résulterait d'une réactivation du processus d'ossification endochondrale et pourrait jouer un rôle important dans la dégradation du cartilage articulaire et dans le remodelage pathologique de l'os sous-chondral (Dreier 2010b; Singh et al. 2019). Ainsi, l'identification de facteurs produits par les chondrocytes hypertrophiques et impliqués dans les lésions du cartilage et de l'os arthrosiques permettrait la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons développé au sein du laboratoire un nouveau modèle de différenciation progressive de chondrocytes hypertrophiques afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques régulant la transition phénotypique des chondrocytes et de mettre en évidence des molécules impliquées dans le remodelage de la jonction ostéochondrale. Ce modèle permet l'obtention de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques à partir de chondrocytes articulaires murins iMAC. Le développement de ce modèle repose sur une caractérisation fine du profil d'expression génique des chondrocytes et sur la capacité de minéralisation de la matrice extracellulaire des chondrocytes. En plus des iMAC et des chondrocytes hypertrophiques, notre modèle fournit un troisième phénotype de chondrocytes, les chondrocytes pré-hypertrophiques, qui expriment des niveaux intermédiaires de marqueurs chondrocytaires et de l'hypertrophie. Néanmoins, ce phénotype pré-hypertrophique correspond à une population spécifique de chondrocytes, qui expriment des marqueurs de chondrocytes pré-hypertrophiques, comme snorc et ostéomoduline (Belluoccio et al. 2010; Heinonen et al. 2011). La présence de différentes populations de chondrocytes moléculairement distinctes a été mise en évidence dans le cartilage humain arthrosique. Ji *et al.* ont ainsi décrit sept populations différentes, dont des phénotypes pré-hypertrophiques et hypertrophiques (Ji et al. 2019).

Nos résultats montrent que la transition entre le phénotype pré-hypertrophique et le phénotype hypertrophique est associée à une dérégulation transcriptionnelle, en faveur à des mécanismes impliqués dans l'angiogenèse, l'ostéoclastogenèse et la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Ainsi, l'expression de plusieurs gènes pro-angiogéniques et pro-ostéoclastogéniques augmente avec la différenciation hypertrophique. C'est le cas de SDF-1 qui stimule l'angiogenèse en recrutant des précurseurs endothéliaux (Zheng et al. 2007) et en favorisant la prolifération, migration et tubulogenèse des précurseurs endothéliaux (Cun et al.

2021) et de cellules endothéliales (Kuhlmann et al. 2005). SDF-1 augmente également la production et la sécrétion de VEGF par les cellules hématopoïétique CXCR4⁺ (Kijowski et al. 2001). De plus, le VEGF et le bFGF induisent une élévation de l'expression de CXCR4, le principal récepteur de SDF-1, au niveau des cellules endothéliales humaines, accentuant davantage le rôle pro-angiogénique de SDF-1 (Salcedo et al. 1999). Enfin, SDF-1 pourrait favoriser l'ostéoclastogenèse en activant l'expression de RANKL (H.-R. Kim et al. 2014). CCL4 fait partie des chimiokines dont l'expression est augmentée avec l'acquisition du phénotype hypertrophique des chondrocytes. CCL4 a été décrite pour être impliquée dans la dégradation des disques intervertébraux en facilitant l'infiltration de macrophages (Z. Li et al. 2017). Cette chimiokine, libérée par les ostéoblastes, rétablit l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques durant l'activation de la moelle osseuse. Elle est également impliquée dans la migration et la viabilité des pré-ostéoclastes (Lee et al. 2018). Le rôle de CCL4 dans l'arthrose demeure peu étudié. La sphingosine kinase 1, est une enzyme qui permet la formation de la sphingosine phosphate 1, impliquée dans l'angiogenèse (Nagahashi et al. 2012) mais également dans l'ostéoclastogenèse (Ryu et al. 2006). Cherifi *et al.* ont montré récemment que le sécrétome des ostéoclastes augmente l'expression de Mmp3 et Mmp13 des chondrocytes et d'explants de cartilage et que cet effet était inhibé par le JTE013, un inhibiteur du récepteur de la sphingosine phosphate 1. L'activité de la sphingosine kinase 1 augmente avec l'ostéoclastogenèse, ainsi que son expression dans l'os sous-chondral de souris arthrosiques (Cherifi et al. 2021).

Nous nous sommes intéressés au sécrétome des chondrocytes, puisque nous avons évalué le rôle biologique des chondrocytes sur l'angiogenèse et l'ostéoclastogenèse, en utilisant principalement des milieux conditionnés de chondrocytes. Pour cela, nous avons effectué une étude par deux techniques de détection, une détection semi-quantitative avec le *Proteome Profiler Angiogenesis Array* ciblant simultanément un grand nombre de facteurs liés à l'angiogenèse et une détection quantitative par ELISA ciblant spécifiquement nos protéines d'intérêt. Avec le *Proteome Array*, nous avons détecté 14 protéines liées à l'angiogenèse dans les milieux pré-hypertrophiques et hypertrophiques de chondrocytes. Parmi ces protéines, certaines sont décrites comme ayant un rôle pro-angiogénique (ostéopontine, SDF-1, MCP-1, Pentraxin-3, IGFBP-2, IGFBP-3, NOV, MMP-3 et VEGF) et d'autres comme étant anti-angiogéniques (serpine E1, serpine F1, thrombospondine-2, endostatine, IGFBP-3 et TIMP-1). Peu de variations ont été observées entre les protéines présentes dans les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Néanmoins, nous constatons que

SDF-1 fait partie des protéines produites en plus grande quantité. En complément de l'analyse du sécrétome, une analyse des protéines liées à l'angiogenèse contenues dans les lysats cellulaires de chondrocytes permettrait d'évaluer la présence de facteurs pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques produits et stockés dans les matrices extracellulaires de chondrocytes. En effet, les protéines anti-angiogéniques sont essentiellement matricielles comme les thrombospondines, mais également la serpine E1/F1, l'endostatine et la TIMP-1. Néanmoins, la confirmation du *Proteome Array* par une technique quantitative comme l'ELISA se révèle être nécessaire pour évaluer les concentrations de protéines stockées et/ou sécrétées par les chondrocytes.

Tous ces éléments confirment l'acquisition d'un potentiel angiogénique et ostéoclastogénique avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes, que nous avons par la suite vérifié d'un point de vue fonctionnel à l'aide de différents tests d'ostéoclastogénèse et d'angiogenèse *in vitro*.

[Le rôle pro-ostéoclastogénique des chondrocytes](#)

L'os sous-chondral arthrosique est le siège d'un remodelage pathologique, suite à un découplage entre la synthèse et la résorption osseuse. Au stade précoce de l'arthrose, la résorption accrue de l'os, assurée par les ostéoclastes, conduit à un amincissement de la plaque sous-chondrale accompagné d'une baisse de sa densité. Différentes études ont montré l'implication de la résorption osseuse et des ostéoclastes dans l'initiation et la progression de l'arthrose. La ménisectomie chez la souris conduit à une importante dégradation du cartilage en 6 semaines. Lorsque ces souris sont traitées à l'OPG, un puissant suppresseur de la résorption osseuse et du remodelage osseux, le volume de l'os sous-chondral augmente considérablement, mais la détérioration du cartilage est évitée. Ainsi, l'interaction de l'OPG avec RANKL inhibe la différenciation des ostéoclastes et conduit à une diminution du score OARSI et du pourcentage de cellules ADAMTS-4⁺ et ADAMTS-5⁺ (Kadri et al. 2008). RANKL est un facteur essentiel à la différenciation ostéoclastogénique des précurseurs monocytaires, à la fonction de résorption de l'os et à la survie des ostéoclastes (T. Nakashima, Hayashi, et Takayanagi 2012). RANKL est fortement exprimé et produit par les ostéocytes, les ostéoblastes mais également les chondrocytes. L'expression de RANKL, en ARNm, en protéine ainsi que le ratio RANKL/OPG sont augmentés dans le cartilage de patients arthrosiques (Upton et al.

2012), suggérant que les chondrocytes pourraient jouer un rôle dans le recrutement des ostéoclastes et donc dans le remodelage de l'os dans un contexte d'arthrose.

Après avoir montré que la différenciation hypertrophique des chondrocytes était associée à une expression accrue de facteurs ostéoclastogéniques, nous avons évalué la capacité de différenciation ostéoclastogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. La différenciation des monocytes de la lignée RAW264.7 en ostéoclastes est induite par une forte concentration de RANKL. Nous avons montré que les deux phénotypes de chondrocytes présentaient une capacité d'induction de l'ostéoclastogénèse, sans apport exogène de RANKL, avec un effet supérieur pour les chondrocytes hypertrophiques. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les chondrocytes hypertrophiques participeraient au remodelage de la jonction ostéochondrale. Shibakawa *et al.* ont suggéré que les chondrocytes sécrétaient des facteurs chimiotactiques, favorisant la formation des *resorption pits*, comme par exemple des chimiokines telles que CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1) et MIP (Macrophage Inflammation Protein), ainsi que le VEGF (Shibakawa et al. 2005).

Dans notre modèle cellulaire, malgré une régulation à la hausse du gène codant RANKL, nous n'avons pas détecté de RANKL dans les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques ou hypertrophiques. Ainsi, le RANKL ne serait pas à l'origine des effets observés dans l'ostéoclastogénèse. D'autres facteurs en revanche pourraient expliquer l'effet ostéoclastogénique important des chondrocytes hypertrophiques. Les chimiokines CCL4, également connue sous le nom de MIP-1 β , et CXCL12 sont fortement exprimées par les chondrocytes hypertrophiques et sont retrouvés dans les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques. De plus, les monocytes de la lignée RAW264.7 expriment les récepteurs de ces chimiokines, le récepteur CCR5 de CCL4 et un des récepteurs de SDF-1, le CXCR4.

Afin de confirmer l'implication de ces deux chimiokines dans les effets pro-ostéoclastogéniques des chondrocytes hypertrophiques, nous souhaitons réaliser ces expériences d'ostéoclastogénèse en présence d'antagonistes spécifiques de nos molécules cibles. Nous envisageons également d'utiliser des chondrocytes déficients pour SDF-1 obtenus par transfection de chondrocytes de souris *Sdf-1^{fl/fl}* par un adénovirus exprimant la Cre recombinase. La capacité ostéoclastogénique des milieux conditionnés de chondrocytes déficients pour SDF-1 serait évaluée et comparée aux effets ostéoclastogéniques de chondrocytes WT.

Le rôle pro-angiogénique des chondrocytes

Peu d'études se sont intéressées au lien pouvant exister entre la différenciation hypertrophique des chondrocytes et l'angiogenèse ostéochondrale au cours de l'arthrose. L'équipe de Yves Henrotin a recherché le lien entre le phénotype hypertrophique des chondrocytes présents dans le cartilage arthrosique et l'angiogenèse de la jonction ostéochondrale (L. Pesesse et al. 2013). Pour cela, Pesesse *et al.* ont cultivé des chondrocytes arthrosiques humains dans des billes d'alginate pour induire leur hypertrophie et ont évalué l'effet de milieux conditionnés de chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques et hypertrophiques sur la migration, l'invasion et l'adhérence de cellules endothéliales. Ils ont ainsi montré que les chondrocytes arthrosiques hypertrophiques stimulaient la migration, l'invasion et l'adhérence de cellules HUVEC et ont identifié la BSP (bone sialoprotein) comme principal facteur pro-angiogénique à l'origine de ces effets. La BSP est une protéine de la famille des SIBLINGS qui est exprimée par les ostéoblastes matures, les ostéoclastes et les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance (Malaval, Aubin, et Vico 2009). La BSP est impliquée dans les mécanismes de minéralisation, puisque son interaction avec le collagène favorise la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (Baht, Hunter, et Goldberg 2008), mais également dans l'attachement cellulaire grâce à son domaine RGD (Arg-Gly-Asp) (Byzova et al. 2000). Bellahcène *et al.* ont démontré l'implication de la BSP dans l'angiogenèse en montrant que la BSP assurait l'attachement de cellules endothéliales et leur migration via l'interaction de sa séquence RGD avec les récepteurs $\alpha v\beta 3$ des intégrines des cellules endothéliales (Bellahcène et al. 2000).

Cependant, les chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques sont issus de chondrocytes arthrosiques en culture primaire, ils présentent donc initialement un phénotype pathologique et pourraient produire des facteurs pro-angiogéniques. De manière intéressante, l'expression du VEGF n'est pas augmentée avec l'hypertrophie des chondrocytes dans leur modèle.

Notre modèle cellulaire permet d'obtenir des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques et donc d'évaluer et de comparer les capacités angiogéniques de chacun des phénotypes de chondrocytes. Par ailleurs, nous avons également observé une augmentation de la transcription de la BSP avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes.

L'adhérence des cellules endothéliales aux matrices extracellulaire de chondrocytes

Dans un premier test fonctionnel d'angiogenèse, nous avons évalué l'adhérence de cellules endothéliales aux matrices extracellulaires de chondrocyte et avons montré que les matrices de chondrocytes hypertrophiques favorisaient l'adhérence des HUVEC. Les matrices de chondrocytes hypertrophiques pourraient constituer un support d'ancrage des cellules endothéliales. En effet, dans notre modèle cellulaire, les chondrocytes iMAC sont cultivés jusqu'à confluence puis différenciés successivement en chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Ainsi, la proportion de cellules chondrocytaires et de matrice extracellulaire ne reflète pas le tissu cartilagineux, où la matrice occupe 95% du volume total et les chondrocytes uniquement 5%. Dans notre modèle cellulaire, la matrice des chondrocytes ne correspondrait pas à la matrice extracellulaire des chondrocytes du cartilage mais plutôt à la matrice péricellulaire et territoriale des chondrocytes du cartilage. De plus, des études à l'échelle nanométrique par microscopie à force atomique ont montré que les chondrocytes issus de notre modèle étaient entièrement enchâssés dans leur matrice. Ainsi, l'adhérence de cellules endothéliales constitue bien une adhérence cellule/matrice et non une adhérence cellule/cellule.

La matrice péricellulaire des chondrocytes du cartilage possède des propriétés biochimiques et biomécaniques différentes de la matrice extracellulaire des chondrocytes. La matrice péricellulaire est principalement composée de collagène de type VI, de perlécane, des protéoglycanes à héparane sulfate présents dans les membranes basales et de laminines. Les perlécane peuvent interagir avec une grande variété de protéines et de molécules présentes dans la matrice extracellulaire (Farach-Carson et al. 2014), comme le facteur WARP, un membre de la famille des von Willebrand factor A domain, découvert en 2002 (Allen et al. 2006; Fitzgerald, Tay Ting, et Bateman 2002). De manière intéressante, les perlécane sont des composants majeurs de la membrane basale des cellules endothéliales, où ils permettent l'interaction des péricytes avec la matrice environnante afin de stabiliser le vaisseau (Gustafsson et al. 2013). Les perlécane jouent notamment un rôle important dans l'angiogenèse tumorale (X. Jiang et Couchman 2003). Les cellules tumorales pourraient sécréter des perlécane pour fournir un socle d'ancrage aux vaisseaux sanguins pendant l'expansion tumorale puis favoriser la croissance de la tumeur en modulant l'activité de facteurs angiogéniques. En effet, de nombreux facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF et le FGF-2, mais également anti-angiogéniques interagissent avec les héparanes sulfates. Au cours de l'ossification endochondrale, les perlécane sont présents dans la partie calcifiée de la plaque de croissance, séparant le tissu osseux vascularisé du cartilage avasculaire. Les perlécane sont

également trouvés en abondance dans les zones pré-hypertrophique et hypertrophiques, suggérant qu'ils pourraient être impliqués dans les phénomènes de vascularisation du cartilage (Farach-Carson et al. 2014).

La matrice péri-cellulaire des chondrocytes est altérée avec l'arthrose, au niveau de sa structure mais également de sa composition. Poole *et al.* ont montré que les changements dans la distribution du collagène et des protéoglycanes de la matrice péri-cellulaire précèdent la prolifération des chondrocytes et la formation de clusters (Poole, Matsuoka, et Schofield 1991). Le collagène de type VI est augmenté dans la matrice péri-cellulaire des chondrocytes arthrosiques (Arican et al. 1996) et a été décrit comme facteur favorisant l'angiogenèse dans un contexte tumoral (P. Chen, Cescon, et Bonaldo 2013). En condition pathologique, le cartilage articulaire présente une diminution de l'expression de la plupart des laminines. Néanmoins, la chaîne $\alpha 4$ de la laminine présente une forte expression dans le cartilage arthrosique, au niveau des clusters de chondrocytes hypertrophiques (F. Fuerst et al. 2011). Gonzalez *et al.* ont montré que le domaine G de la chaîne $\alpha 4$ de la laminine est un ligand spécifique de haute affinité pour les hétérodimères $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha 3 \beta 1$ d'intégrines avec qui il coopère pour assurer une interaction cellules endothéliale/chaîne $\alpha 4$ de la laminine et ainsi favoriser la croissance vasculaire.

Ainsi, des compositions différentes des matrices extracellulaires de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques pourraient expliquer les variations obtenues dans l'adhérence des cellules endothéliales. Une étude plus précise de la composition et de la structure des matrices extracellulaires de chondrocytes est nécessaire afin de mieux comprendre les différences observées. Des facteurs anti-angiogéniques seraient également stockés dans la matrice extracellulaire des chondrocytes pré-hypertrophiques, comme l'angiopoïétine-like 4 (ANGPTL4) qui pourrait empêcher l'adhérence des cellules endothéliales (Cazes et al. 2006). ANGPTL4 se lie aux protéoglycanes à héparane sulfate des matrices. Ainsi, afin d'investiguer le rôle des facteurs liés aux protéoglycanes à héparane sulfate dans l'adhérence des cellules endothéliales, notamment ANGPTL4, nous envisageons d'effectuer ces expériences avec des matrices de chondrocytes dépourvues de facteurs liant les héparane sulfate. Pour cela, une forte concentration d'héparine est ajoutée sur les matrices de chondrocytes afin de les libérer des facteurs liés aux héparane sulfate, qui passeraient de la matrice au milieu extracellulaire. La capacité d'adhérence des cellules endothéliales aux matrices de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, préalablement traitées ou non à l'héparine, sera ainsi évaluée.

La prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par les chondrocytes

Dans un second test fonctionnel d'angiogenèse, nous avons évalué la prolifération de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques et avons montré que les chondrocytes hypertrophiques exerçaient à la fois un rôle pro-angiogénique et anti-angiogénique, selon les conditions expérimentales. Lorsque la prolifération basale n'est pas induite, c'est-à-dire sans ajout de facteurs de croissance exogène, les chondrocytes hypertrophiques stimulent la prolifération de cellules HUVEC. Lorsque la prolifération basale est induite par un ajout de facteurs de croissance exogène, les chondrocytes hypertrophiques présentent une capacité d'inhibition de la prolifération, néanmoins cette inhibition est plus faible que celle induite par les chondrocytes pré-hypertrophiques. Ces résultats montrent que les chondrocytes produisent et sécrètent à la fois des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques et que l'activité des chondrocytes repose sur une balance angiogénique qui favorisent ou non *in fine* la prolifération cellulaire. Ainsi le passage du phénotype pré-hypertrophique au phénotype hypertrophique est associé à un « *switch* » de la balance angiogénique en faveur d'un rôle pro-angiogénique. Des tests de prolifération de cellules HUVEC, préalablement traitées à l'AMD3100, en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes ont été effectués afin de cibler l'axe SDF-1/CXCR4. Cependant, aucun effet de l'AMD3100 n'a été observé dans la prolifération cellulaire. Ainsi, SDF-1 ne semble pas être à l'origine des effets observés dans la prolifération des cellules HUVEC. Le rôle de SDF-1 dans la prolifération a pourtant été démontré par de nombreuses équipes. Cependant, la courte demi-vie de SDF-1 et le temps long d'expérimentation du test de prolifération (48h) pourrait expliquer l'absence d'inhibition de la prolifération par l'AMD3100.

Nous avons également étudié la migration de cellules endothéliales en réponses aux milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques et avons montré les chondrocytes hypertrophiques favorisaient la migration des cellules HUVEC. Nous avons identifié SDF-1 comme molécule potentiellement à l'origine des effets pro-angiogéniques exercés par les chondrocytes. Le rôle de SDF-1 dans la migration des cellules HUVEC a été démontré par Kuhlmann *et al.* (Kuhlmann et al. 2005). Nous avons donc évalué l'implication de SDF-1, comme facteur produit et sécrété par les chondrocytes hypertrophiques, dans la migration de cellules endothéliales, en inhibant l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100. Lorsque les cellules endothéliales sont préalablement traitées à l'AMD3100, la migration induite par les chondrocytes hypertrophiques est totalement inhibée. Ainsi, SDF-1 se révèle être le principal facteur impliqué dans la migration des cellules endothéliales.

Des expériences de migration de cellules endothéliales dans un système de « chambre de Boyden » pourrait compléter nos résultats. En effet, nous avons observé un effet sur la migration des cellules endothéliales et aimerions montrer un effet chimiotactique des chondrocytes hypertrophiques. Ainsi, des cellules endothéliales seraient ensemencées dans un insert de culture, qui sera placé dans un puits contenant des chondrocytes en culture. Les cellules endothéliales seraient alors capables de migrer à travers les pores de la membrane de polycarbonate de l'insert, en réponse à un stimulus chimioattractant produit par les chondrocytes situés dans le compartiment inférieur. L'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100 permettra alors d'évaluer le rôle de SDF-1 dans la chimioattraction des cellules endothéliales. Des expériences d'invasion cellulaire, avec un insert préalablement coaté avec du Matrigel, permettraient également de mieux modéliser la migration des cellules endothéliales au sein d'une matrice extracellulaire.

La tubulogenèse des cellules endothéliales induite par les chondrocytes

Enfin, le dernier test fonctionnel d'angiogenèse utilisé est un test de tubulogenèse de cellules endothéliales en réponse aux milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques et nous avons montré que les chondrocytes hypertrophiques favorisaient la formation de structures pseudo-tubulaires par les cellules HUVEC. Nous avons également évalué l'implication du SDF-1 produit et sécrété par les chondrocytes dans ces effets, en inhibant l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100. Ainsi, nous avons montré que SDF-1 était également impliqué dans la formation de tubules induite par les chondrocytes hypertrophiques. Le rôle angiogénique de SDF-1 a été démontré avec l'utilisation de test fonctionnel en trois dimensions (Strasser, Kaminker, et Tessier-Lavigne 2010). La formation de structures tubulaires autour de billes de Cytodex placées dans un gel de fibrine permet l'obtention de tubules ramifiés présentant une véritable lumière (Nehls et Drenckhahn 1995). En effet, le test de formation de tubules sur Matrigel est un test en deux dimensions qui permet la formation de pseudo-tubules présentant une lumière « *lumen-like* » (Montañez et al. 2002). Le test en trois dimensions serait plus représentatif de la morphogenèse des tubules *in vivo*, puisqu'il récapitule les différentes étapes du processus d'angiogenèse. Ainsi, un test fonctionnel en trois dimensions permet d'observer la prolifération et la migration des cellules endothéliales, le bourgeonnement du vaisseau avec une cellule *tip cell* en amont, la formation d'une lumière, la croissance du vaisseau ainsi que la formation de ramifications qui peuvent s'anastomoser entre elles.

Enfin, ces différents tests fonctionnels d'angiogenèse pourraient être réalisés en utilisant des milieux conditionnés des chondrocytes déficients pour SDF-1, obtenus par transfection de chondrocytes de souris *Sdf-1^{fl/fl}* par un adénovirus exprimant la Cre recombinase. Ainsi, la capacité de prolifération, migration et de formation de tubules des chondrocytes déficients pour SDF-1 serait évaluée et comparée aux effets induits par des chondrocytes WT, afin de démontrer l'implication de SDF-1 dans le processus d'angiogenèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abad, Veronica et al. 2002. « The Role of the Resting Zone in Growth Plate Chondrogenesis ». *Endocrinology* 143(5): 1851-57.
- Abdallah, Basem M. 2017. « Marrow adipocytes inhibit the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts via suppressing BMP-signaling ». *Journal of Biomedical Science* 24: 11.
- Adams, Ralf H., et Kari Alitalo. 2007. « Molecular Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8(6): 464-78.
- Adams, Ralf H., et Anne Eichmann. 2010. « Axon Guidance Molecules in Vascular Patterning ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5): a001875.
- Addison, William N. et al. 2007. « Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, up-Regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(21): 15872-83.
- Aghajanian, Patrick, et Subburaman Mohan. 2018. « The Art of Building Bone: Emerging Role of Chondrocyte-to-Osteoblast Transdifferentiation in Endochondral Ossification ». *Bone Research* 6: 19.
- Aigner, T. et al. 2001. « Anabolic and Catabolic Gene Expression Pattern Analysis in Normal versus Osteoarthritic Cartilage Using Complementary DNA-Array Technology ». *Arthritis and Rheumatism* 44(12): 2777-89.
- Aigner, T., et H. A. Kim. 2002. « Apoptosis and Cellular Vitality: Issues in Osteoarthritic Cartilage Degeneration ». *Arthritis and Rheumatism* 46(8): 1986-96.
- Aigner, T, A Sachse, P Gebhard, et H Roach. 2006. « Osteoarthritis: Pathobiology—Targets and Ways for Therapeutic Intervention☆ ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 58(2): 128-49.
- Aigner, T., S. Soeder, et J. Haag. 2006. « IL-1beta and BMPs--Interactive Players of Cartilage Matrix Degradation and Regeneration ». *European Cells & Materials* 12: 49-56; discussion 56.
- Allen, Justin M. et al. 2006. « WARP Is a Novel Multimeric Component of the Chondrocyte Pericellular Matrix That Interacts with Perlecan* ». *Journal of Biological Chemistry* 281(11): 7341-49.
- Aoudjit, F., et K. Vuori. 2001. « Matrix Attachment Regulates Fas-Induced Apoptosis in Endothelial Cells: A Role for c-Flip and Implications for Anoikis ». *The Journal of Cell Biology* 152(3): 633-43.
- Appleton, C. Thomas G. et al. 2007. « Forced Mobilization Accelerates Pathogenesis: Characterization of a Preclinical Surgical Model of Osteoarthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 9(1): R13.
- Arden, N. K. et al. 1996. « The Association between Osteoarthritis and Osteoporotic Fracture: The Chingford Study ». *British Journal of Rheumatology* 35(12): 1299-1304.
- Arden, Nigel, et Michael C. Nevitt. 2006. « Osteoarthritis: Epidemiology ». *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology* 20(1): 3-25.
- Arican, M. et al. 1996. « Increased Metabolism of Collagen VI in Canine Osteoarthritis ». *Journal of Comparative Pathology* 114(3): 249-56.

- Arkill, K. P., et C. P. Winlove. 2008. « Solute Transport in the Deep and Calcified Zones of Articular Cartilage ». *Osteoarthritis and Cartilage* 16(6): 708-14.
- Armstrong, Lucas C., et Paul Bornstein. 2003. « Thrombospondins 1 and 2 Function as Inhibitors of Angiogenesis ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 22(1): 63-71.
- Atsumi, Tadao, Yoji Ikawa, Yoko Miwa, et Koji Kimata. 1990. « A Chondrogenic Cell Line Derived from a Differentiating Culture of AT805 Teratocarcinoma Cells ». *Cell Differentiation and Development* 30(2): 109-16.
- Aulin, C., T. Lassacher, K. Palmblad, et H. Erlandsson Harris. 2020. « Early Stage Blockade of the Alarmin HMGB1 Reduces Cartilage Destruction in Experimental OA ». *Osteoarthritis and Cartilage* 28(5): 698-707.
- Aury-Landas, Juliette et al. 2016. « Genetic Determinism of Primary Early-Onset Osteoarthritis ». *Trends in Molecular Medicine* 22(1): 38-52.
- Azar, Walid J. et al. 2011. « IGFBP-2 Enhances VEGF Gene Promoter Activity and Consequent Promotion of Angiogenesis by Neuroblastoma Cells ». *Endocrinology* 152(9): 3332-42.
- Bach, Leon A. 2015. « Endothelial Cells and the IGF System ». *Journal of Molecular Endocrinology* 54(1): R1-13.
- Bader, D. L., D. M. Salter, et T. T. Chowdhury. 2011. « Biomechanical Influence of Cartilage Homeostasis in Health and Disease ». *Arthritis* 2011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3196252/> (25 mai 2020).
- Baht, Gurpreet S., Graeme K. Hunter, et Harvey A. Goldberg. 2008. « Bone Sialoprotein-Collagen Interaction Promotes Hydroxyapatite Nucleation ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 27(7): 600-608.
- Bakker, A. C. et al. 2001. « Overexpression of Active TGF-Beta-1 in the Murine Knee Joint: Evidence for Synovial-Layer-Dependent Chondro-Osteophyte Formation ». *Osteoarthritis and Cartilage* 9(2): 128-36.
- Ballegaard, C. et al. 2014. « Knee Pain and Inflammation in the Infrapatellar Fat Pad Estimated by Conventional and Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Obese Patients with Osteoarthritis: A Cross-Sectional Study ». *Osteoarthritis and Cartilage* 22(7): 933-40.
- Bannuru, R. R. et al. 2019. « OARSI Guidelines for the Non-Surgical Management of Knee, Hip, and Polyarticular Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 27(11): 1578-89.
- Baron. 2001. « L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse ». *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN: 0767-0974], 2001, Vol. 17, N° 12; p.1260-1269.* <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/1864> (12 août 2020).
- Bashir, A., M. L. Gray, R. D. Boutin, et D. Burstein. 1997. « Glycosaminoglycan in Articular Cartilage: In Vivo Assessment with Delayed Gd(DTPA)(2-)-Enhanced MR Imaging ». *Radiology* 205(2): 551-58.
- Bastiaansen-Jenniskens, Yvonne M. et al. 2013. « Stimulation of Fibrotic Processes by the Infrapatellar Fat Pad in Cultured Synoviocytes from Patients with Osteoarthritis: A Possible Role for Prostaglandin F2 α ». *Arthritis and Rheumatism* 65(8): 2070-80.

- Bau, Brigitte et al. 2002. « Relative Messenger RNA Expression Profiling of Collagenases and Aggrecanases in Human Articular Chondrocytes in Vivo and in Vitro ». *Arthritis and Rheumatism* 46(10): 2648-57.
- Becerra, S. P., A. Sagasti, P. Spinella, et V. Notario. 1995. « Pigment Epithelium-Derived Factor Behaves like a Noninhibitory Serpin. Neurotrophic Activity Does Not Require the Serpin Reactive Loop ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(43): 25992-99.
- Bell, D. M. et al. 1997. « SOX9 Directly Regulates the Type-II Collagen Gene ». *Nature Genetics* 16(2): 174-78.
- Bellahcène, A. et al. 2000. « Bone Sialoprotein Mediates Human Endothelial Cell Attachment and Migration and Promotes Angiogenesis ». *Circulation Research* 86(8): 885-91.
- Bellido, Miriam et al. 2010. « Subchondral Bone Microstructural Damage by Increased Remodelling Aggravates Experimental Osteoarthritis Preceded by Osteoporosis ». *Arthritis Research & Therapy* 12(4): R152.
- Belluoccio, Daniele et al. 2010. « Sorting of Growth Plate Chondrocytes Allows the Isolation and Characterization of Cells of a Defined Differentiation Status ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25(6): 1267-81.
- Belluzzi, Elisa et al. 2019. « Contribution of Infrapatellar Fat Pad and Synovial Membrane to Knee Osteoarthritis Pain ». *BioMed Research International* 2019: 6390182.
- Benninghoff, A. 1925. « Form und Bau der Gelenkknorpel in Ihren Beziehungen zur Funktion Zweiter Teil. Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. Z. » *Zellforschung*: 2.783-862.
- Beswick, Andrew David et al. 2012. « What Proportion of Patients Report Long-Term Pain after Total Hip or Knee Replacement for Osteoarthritis? A Systematic Review of Prospective Studies in Unselected Patients ». *BMJ open* 2(1): e000435.
- Bettica, Paolo et al. 2002. « Evidence for Increased Bone Resorption in Patients with Progressive Knee Osteoarthritis: Longitudinal Results from the Chingford Study ». *Arthritis and Rheumatism* 46(12): 3178-84.
- van Beuningen, H. M., H. L. Glansbeek, P. M. van der Kraan, et W. B. van den Berg. 1998. « Differential Effects of Local Application of BMP-2 or TGF-Beta 1 on Both Articular Cartilage Composition and Osteocyte Formation ». *Osteoarthritis and Cartilage* 6(5): 306-17.
- van Bezooijen, Rutger L. et al. 2004. « Sclerostin Is an Osteocyte-Expressed Negative Regulator of Bone Formation, but Not a Classical BMP Antagonist ». *The Journal of Experimental Medicine* 199(6): 805-14.
- Bi, W. et al. 1999. « Sox9 Is Required for Cartilage Formation ». *Nature Genetics* 22(1).
- Billinghurst, R. C. et al. 1997. « Enhanced Cleavage of Type II Collagen by Collagenases in Osteoarthritic Articular Cartilage ». *The Journal of Clinical Investigation* 99(7): 1534-45.
- Blair, Harry C., Li Sun, et Ronald A. Kohanski. 2007. « Balanced Regulation of Proliferation, Growth, Differentiation, and Degradation in Skeletal Cells ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116: 165-73.

- Blair-Levy, J. M. et al. 2008. « A Type I Collagen Defect Leads to Rapidly Progressive Osteoarthritis in a Mouse Model ». *Arthritis and Rheumatism* 58(4): 1096-1106.
- Blom, Arjen B. et al. 2007. « Crucial Role of Macrophages in Matrix Metalloproteinase-Mediated Cartilage Destruction during Experimental Osteoarthritis: Involvement of Matrix Metalloproteinase 3 ». *Arthritis and Rheumatism* 56(1): 147-57.
- Bondeson, Jan et al. 2006. « The Role of Synovial Macrophages and Macrophage-Produced Cytokines in Driving Aggrecanases, Matrix Metalloproteinases, and Other Destructive and Inflammatory Responses in Osteoarthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 8(6): R187.
- Bonnet, C. S. 2005. « Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation ». *Rheumatology* 44(1): 7-16.
- Bonnet, C. S., et D. A. Walsh. 2005. « Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation ». *Rheumatology (Oxford, England)* 44(1): 7-16.
- Bornstein, P. 2001. « Thrombospondins as Matricellular Modulators of Cell Function ». *The Journal of Clinical Investigation* 107(8): 929-34.
- Bornstein, Paul. 2009. « Thrombospondins Function as Regulators of Angiogenesis ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 3(3-4): 189-200.
- Bougault, Carole et al. 2012. « Stress-Induced Cartilage Degradation Does Not Depend on the NLRP3 Inflammasome in Human Osteoarthritis and Mouse Models ». *Arthritis and Rheumatism* 64(12): 3972-81.
- Boyce, Brendan F., et Lianping Xing. 2008. « Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling ». *Archives of biochemistry and biophysics* 473(2): 139-46.
- Bragg, Robert et al. 2019. « Stromal Cell-Derived Factor-1 as a Potential Therapeutic Target for Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis ». *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 10: 2040622319882531.
- Brew, C. J. et al. 2010. « Gene Expression in Human Chondrocytes in Late Osteoarthritis Is Changed in Both Fibrillated and Intact Cartilage without Evidence of Generalised Chondrocyte Hypertrophy ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 69(01): 234-40.
- Bronckaers, Annelies et al. 2014. « Mesenchymal Stem/Stromal Cells as a Pharmacological and Therapeutic Approach to Accelerate Angiogenesis ». *Pharmacology & Therapeutics* 143(2): 181-96.
- Brower, T., Y. Akahoshi, et P. Orlić. 1962. « The Diffusion of Dyes Through Articular Cartilage in Vivo ».
- Brown, T. D., E. L. Radin, R. B. Martin, et D. B. Burr. 1984. « Finite Element Studies of Some Juxtarticular Stress Changes Due to Localized Subchondral Stiffening ». *Journal of Biomechanics* 17(1): 11-24.
- Buckland-Wright, Christopher. 2004. « Subchondral Bone Changes in Hand and Knee Osteoarthritis Detected by Radiography ». *Osteoarthritis and Cartilage* 12 Suppl A: S10-19.
- Buckwalter, J. A., et H. J. Mankin. 1998. « Articular Cartilage: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions ». *Instructional Course Lectures* 47: 477-86.

- Burr, D. B., et M. B. Schaffler. 1997. « The Involvement of Subchondral Mineralized Tissues in Osteoarthritis: Quantitative Microscopic Evidence ». *Microscopy Research and Technique* 37(4): 343-57.
- Burr, D. B., M. B. Schaffler, et R. G. Frederickson. 1988. « Composition of the Cement Line and Its Possible Mechanical Role as a Local Interface in Human Compact Bone ». *Journal of Biomechanics* 21(11): 939-45.
- Burr, David B., et Maxime A. Gallant. 2012. « Bone Remodelling in Osteoarthritis ». *Nature Reviews Rheumatology* 8(11): 665-73.
- Burr, David B., et Eric L. Radin. 2003. « Microfractures and Microcracks in Subchondral Bone: Are They Relevant to Osteoarthritis? ». *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 29(4): 675-85.
- Burton, D. W. et al. 2005. « Chondrocyte Calcium-Sensing Receptor Expression Is up-Regulated in Early Guinea Pig Knee Osteoarthritis and Modulates PTHrP, MMP-13, and TIMP-3 Expression ». *Osteoarthritis and Cartilage* 13(5): 395-404.
- Busse, Björn et al. 2010. « Decrease in the Osteocyte Lacunar Density Accompanied by Hypermineralized Lacunar Occlusion Reveals Failure and Delay of Remodeling in Aged Human Bone ». *Aging Cell* 9(6): 1065-75.
- Byzova, T. V., W. Kim, R. J. Midura, et E. F. Plow. 2000. « Activation of Integrin Alpha(V)Beta(3) Regulates Cell Adhesion and Migration to Bone Sialoprotein ». *Experimental Cell Research* 254(2): 299-308.
- Cai, Jun, Wen G. Jiang, Maria B. Grant, et Mike Boulton. 2006. « Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibits Angiogenesis via Regulated Intracellular Proteolysis of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(6): 3604-13.
- Cantagrel, et Constantin. 2013. « Membrane synoviale : de la physiologie à l'inflammation rhumatoïde. Implications thérapeutiques. »
- Carlson, C. S. et al. 1994. « Osteoarthritis in Cynomolgus Macaques: A Primate Model of Naturally Occurring Disease ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 12(3): 331-39.
- Carmeliet, Peter. 2005. « VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer ». *Oncology* 69 Suppl 3: 4-10.
- Carmeliet, Peter, et Rakesh K. Jain. 2011. « Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis ». *Nature* 473(7347): 298-307.
- Caron, M. M. J. et al. 2012. « Redifferentiation of Dedifferentiated Human Articular Chondrocytes: Comparison of 2D and 3D Cultures ». *Osteoarthritis and Cartilage* 20(10): 1170-78.
- Cazes, Aurélie et al. 2006. « Extracellular Matrix-Bound Angiopoietin-like 4 Inhibits Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Sprouting and Alters Actin Cytoskeleton ». *Circulation Research* 99(11): 1207-15.
- Cecil, Denise L. et al. 2005. « Inflammation-Induced Chondrocyte Hypertrophy Is Driven by Receptor for Advanced Glycation End Products ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175(12): 8296-8302.

- Cecil, Denise L., et Robert Terkeltaub. 2008. « Transamidation by Transglutaminase 2 Transforms S100A11 Calgranulin into a Procatabolic Cytokine for Chondrocytes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180(12): 8378-85.
- Chagin, Andrei S., et Phillip T. Newton. 2020. « Postnatal Skeletal Growth Is Driven by the Epiphyseal Stem Cell Niche: Potential Implications to Pediatrics ». *Pediatric Research* 87(6): 986-90.
- Chaipinyo, Kanda, Barry W. Oakes, et Marie-Paule I. van Damme. 2002. « Effects of Growth Factors on Cell Proliferation and Matrix Synthesis of Low-Density, Primary Bovine Chondrocytes Cultured in Collagen I Gels ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 20(5): 1070-78.
- Chang, Ching-Fang, Girish Ramaswamy, et Rosa Serra. 2012. « Depletion of primary cilia in articular chondrocytes results in reduced Gli3 repressor to activator ratio, increased Hedgehog signaling, and symptoms of early osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 20(2): 152-61.
- Chauffier, Karine et al. 2012. « Induction of the Chemokine IL-8/Kc by the Articular Cartilage: Possible Influence on Osteoarthritis ». *Joint Bone Spine* 79(6): 604-9.
- Chen, Peiwen, Matilde Cescon, et Paolo Bonaldo. 2013. « Collagen VI in Cancer and Its Biological Mechanisms ». *Trends in Molecular Medicine* 19(7): 410-17.
- Chen, William C. W. et al. 2013. « Cellular Kinetics of Perivascular MSC Precursors ». *Stem Cells International* 2013: 983059.
- Chen, Y. et al. 2017. « Attenuation of Subchondral Bone Abnormal Changes in Osteoarthritis by Inhibition of SDF-1 Signaling ». *Osteoarthritis and Cartilage* 25(6): 986-94.
- Cherifi, C. et al. 2021. « Inhibition of Sphingosine 1-Phosphate Protects Mice against Chondrocyte Catabolism and Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 29(9): 1335-45.
- Chevalier, X. 1998. « [Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage] ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 27(2): 75-80.
- Chevalier, X., et P. Richette. 2005. « Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement ». *EMC - Rhumatologie-Orthopédie* 2(1): 41-58.
- Chiaverina, Giulia et al. 2019. « Dynamic Interplay between Pericytes and Endothelial Cells during Sprouting Angiogenesis ». *Cells* 8(9): 1109.
- Chijimatsu, Ryota, et Taku Saito. 2019. « Mechanisms of Synovial Joint and Articular Cartilage Development ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 76(20): 3939-52.
- Ching, Karen, Xavier Houard, Francis Berenbaum, et Chunyi Wen. 2021. « Hypertension Meets Osteoarthritis - Revisiting the Vascular Aetiology Hypothesis ». *Nature Reviews. Rheumatology* 17(9): 533-49.
- Chiu, Yung-Cheng et al. 2007. « Stromal Cell-Derived Factor-1 Induces Matrix Metalloprotease-13 Expression in Human Chondrocytes ». *Molecular Pharmacology* 72(3): 695-703.
- Christiaens, V., et H. R. Lijnen. 2010. « Angiogenesis and Development of Adipose Tissue ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 318(1-2): 2-9.
- Chu, L., et Z. Yu. 2019. « Osteoporosis Accelerates Osteoarthritis Progression by Aberrant Subchondral Bone Remodeling in Osteoporotic Osteoarthritis Patients ». *Osteoarthritis and Cartilage* 27: S168.

- Cirillo, Dominic J., Robert B. Wallace, LieLing Wu, et Robert A. Yood. 2006. « Effect of Hormone Therapy on Risk of Hip and Knee Joint Replacement in the Women's Health Initiative ». *Arthritis and Rheumatism* 54(10): 3194-3204.
- Clark, J M. 1990. « The structure of vascular channels in the subchondral plate. » *Journal of Anatomy* 171: 105-15.
- Clarke, I C. 1974. « Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study-2. The territorial fibular architecture. » *J. Anat*: 118.261-280.
- Cohen, T. et al. 1995. « VEGF121, a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Isoform Lacking Heparin Binding Ability, Requires Cell-Surface Heparan Sulfates for Efficient Binding to the VEGF Receptors of Human Melanoma Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(19): 11322-26.
- Collins, Douglas H. 1949. *The Pathology of Articular and Spinal Diseases*. London: Edward Arnold.
- Corvol, M. T. 2000. « The Chondrocyte: From Cell Aging to Osteoarthritis ». *Joint Bone Spine* 67(6): 557-60.
- Couchourel, Denis et al. 2009. « Altered Mineralization of Human Osteoarthritic Osteoblasts Is Attributable to Abnormal Type I Collagen Production ». *Arthritis and rheumatism* 60(5): 1438-50.
- Crema, Michel D. et al. 2010. « Subchondral Cystlike Lesions Develop Longitudinally in Areas of Bone Marrow Edema-like Lesions in Patients with or at Risk for Knee Osteoarthritis: Detection with MR Imaging—The MOST Study1 ». *Radiology* 256(3): 855-62.
- de Crombrugge, B., V. Lefebvre, et K. Nakashima. 2001. « Regulatory Mechanisms in the Pathways of Cartilage and Bone Formation ». *Current Opinion in Cell Biology* 13(6): 721-27.
- Cui, L., D. A. Houston, C. Farquharson, et V. E. MacRae. 2016. « Characterisation of Matrix Vesicles in Skeletal and Soft Tissue Mineralisation ». *Bone* 87: 147-58.
- Cui, Zhuang et al. 2016. « Halofuginone Attenuates Osteoarthritis by Inhibition of TGF- β Activity and H-Type Vessel Formation in Subchondral Bone ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 75(9): 1714-21.
- Cun, Yanping et al. 2021. « Role of the stromal cell derived factor-1 in the biological functions of endothelial progenitor cells and its underlying mechanisms ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 21(1): 1-1.
- Daans, Melina, Frank P. Luyten, et Rik J. U. Lories. 2011. « GDF5 Deficiency in Mice Is Associated with Instability-Driven Joint Damage, Gait and Subchondral Bone Changes ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 70(1): 208-13.
- Dai, Jingjin et al. 2020. « Osteoclast-derived exosomal let-7a-5p targets Smad2 to promote the hypertrophic differentiation of chondrocytes ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 319(1): C21-33.
- Dai, Yankun et al. 2019. « MicroRNA-31 Promotes Chondrocyte Proliferation by Targeting C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 ». *Molecular Medicine Reports* 19(3): 2231-37.
- Dawson, D. W. et al. 1999. « Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 285(5425): 245-48.

- Deshane, Jessy et al. 2007. « Stromal cell–derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1–dependent mechanism ». *The Journal of Experimental Medicine* 204(3): 605-18.
- Dieppe, P., J. Cushnaghan, P. Young, et J. Kirwan. 1993. « Prediction of the Progression of Joint Space Narrowing in Osteoarthritis of the Knee by Bone Scintigraphy ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 52(8): 557-63.
- Dijkgraaf, L. C., L. G. De Bont, G. Boering, et R. S. Liem. 1996. « Function, Biochemistry, and Metabolism of the Normal Synovial Membrane of the Temporomandibular Joint: A Review of the Literature ». *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 54(1): 95-100.
- Ding, C. et al. 2013. « Body Fat Is Associated with Increased and Lean Mass with Decreased Knee Cartilage Loss in Older Adults: A Prospective Cohort Study ». *International Journal of Obesity (2005)* 37(6): 822-27.
- D’Lima, Darryl et al. 2006. « Caspase Inhibitors Reduce Severity of Cartilage Lesions in Experimental Osteoarthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 54(6): 1814-21.
- Dobnig, H., et R. T. Turner. 1995. « Evidence That Intermittent Treatment with Parathyroid Hormone Increases Bone Formation in Adult Rats by Activation of Bone Lining Cells ». *Endocrinology* 136(8): 3632-38.
- Doherty, M. J. et al. 1998. « Vascular Pericytes Express Osteogenic Potential in Vitro and in Vivo ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13(5): 828-38.
- Donell, Simon. 2019. « Subchondral bone remodelling in osteoarthritis ». *EFORT Open Reviews* 4(6): 221-29.
- Dong, Yonghui et al. 2016. « Inhibition of SDF-1 α /CXCR4 Signalling in Subchondral Bone Attenuates Post-Traumatic Osteoarthritis ». *International Journal of Molecular Sciences* 17(6): E943.
- Dong, Yu-Feng et al. 2006. « Wnt Induction of Chondrocyte Hypertrophy through the Runx2 Transcription Factor ». *Journal of Cellular Physiology* 208(1): 77-86.
- Dreier, Rita. 2010a. « Hypertrophic Differentiation of Chondrocytes in Osteoarthritis: The Developmental Aspect of Degenerative Joint Disorders ». *Arthritis Research & Therapy* 12(5): 216.
- Ducy, P. et al. 1997. « Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation ». *Cell* 89(5): 747-54.
- Duffy, Garry P. et al. 2009. « Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Angiogenic Processes in a Time- and Dose-Dependent Manner in Vitro ». *Tissue Engineering, Part A* 15(9): 2459-70.
- van Eegher, S. et al. 2021. « The Differentiation of Prehypertrophic into Hypertrophic Chondrocytes Drives an OA-Remodeling Program and IL-34 Expression ». *Osteoarthritis and Cartilage* 29(2): 257-68.
- Eghbali-Fatourechi, Guiti Z. et al. 2005. « Circulating Osteoblast-Lineage Cells in Humans ». *The New England Journal of Medicine* 352(19): 1959-66.

- Eisenstein et al. 1975. « The resistance of certain tissues to invasion. III. Cartilage extracts inhibit the growth of fibroblasts and endothelial cells in culture. » *The American Journal of Pathology* 81(2): 337-47.
- Eisenstein, R. et al. 1973. « The Resistance of Certain Tissues to Invasion: Penetrability of Explanted Tissues by Vascularized Mesenchyme ». *The American Journal of Pathology* 73(3): 765-74.
- El Hajjaji, Hafida et al. 2004. « Treatment with Calcitonin Prevents the Net Loss of Collagen, Hyaluronan and Proteoglycan Aggregates from Cartilage in the Early Stages of Canine Experimental Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 12(11): 904-11.
- Englund, M., et L. S. Lohmander. 2004. « Risk Factors for Symptomatic Knee Osteoarthritis Fifteen to Twenty-Two Years after Meniscectomy ». *Arthritis and Rheumatism* 50(9): 2811-19.
- Englund, Martin et al. 2008. « Incidental Meniscal Findings on Knee MRI in Middle-Aged and Elderly Persons ». *The New England Journal of Medicine* 359(11): 1108-15.
- Englund, Martin, Ali Guermazi, et Stefan L. Lohmander. 2009. « The Role of the Meniscus in Knee Osteoarthritis: A Cause or Consequence? » *Radiologic Clinics of North America* 47(4): 703-12.
- Enomoto, Hiroyuki et al. 2003. « Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Their Receptors Are Expressed in Human Osteoarthritic Cartilage ». *The American Journal of Pathology* 162(1): 171-81.
- Eshkar-Oren, Idit et al. 2009. « The Forming Limb Skeleton Serves as a Signaling Center for Limb Vasculature Patterning via Regulation of Vegf ». *Development (Cambridge, England)* 136(8): 1263-72.
- Evelinger, Dufour, et Cerioli. 2018. « Point d'anatomie. Focus sur les ménisques : l'anatomie au service de la clinique ». *Kinesither Rev.* <https://www.em-consulte.com/article/1193497> (12 août 2020).
- Everts, V. et al. 2002. « The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17(1): 77-90.
- Eymard, Florent et al. 2014. « Induction of an Inflammatory and Prodegradative Phenotype in Autologous Fibroblast-like Synoviocytes by the Infrapatellar Fat Pad from Patients with Knee Osteoarthritis ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66(8): 2165-74.
- Eymard, Florent et al. 2017. « Knee and Hip Intra-Articular Adipose Tissues (IAATs) Compared with Autologous Subcutaneous Adipose Tissue: A Specific Phenotype for a Central Player in Osteoarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76(6): 1142-48.
- Fairbank, T. J. 1948. « Knee Joint Changes after Meniscectomy ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 30B(4): 664-70.
- Fallon, M. D., et S. L. Teitelbaum. 1982. « The Interpretation of Fluorescent Tetracycline Markers in the Diagnosis of Metabolic Bone Diseases ». *Human Pathology* 13(5): 416-17.
- Farach-Carson, Mary C., Curtis R. Warren, Daniel A. Harrington, et Daniel D. Carson. 2014. « Border Patrol: Insights into the Unique Role of Perlecan/Heparan Sulfate Proteoglycan 2 at Cell and Tissue Borders ». *Matrix Biology* 34: 64-79.
- Fawns, H. T., et J. W. Landells. 1953. « Histochemical Studies of Rheumatic Conditions. I. Observations on the Fine Structures of the Matrix of Normal Bone and Cartilage ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 12(2): 105-13.

- Felson, D. T. et al. 2005. « Osteophytes and Progression of Knee Osteoarthritis ». *Rheumatology (Oxford, England)* 44(1): 100-104.
- Felson, David T. et al. 2003. « Bone Marrow Edema and Its Relation to Progression of Knee Osteoarthritis ». *Annals of Internal Medicine* 139(5 Pt 1): 330-36.
- Felson, David T., et Yuqing Zhang. 1998. « An Update on the Epidemiology of Knee and Hip Osteoarthritis with a View to Prevention ». *Arthritis & Rheumatism* 41(8): 1343-55.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, et E. A. Berger. 1996. « HIV-1 Entry Cofactor: Functional CDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 272(5263): 872-77.
- Feng, Yi et al. 2005. « Endostatin Promotes the Anabolic Program of Rabbit Chondrocyte ». *Cell Research* 15(3): 201-6.
- Fenwick, S. A., P. J. Gregg, et P. Rooney. 1999. « Osteoarthritic Cartilage Loses Its Ability to Remain Avascular ». *Osteoarthritis and Cartilage* 7(5): 441-52.
- Ferreras, M. et al. 2000. « Generation and Degradation of Human Endostatin Proteins by Various Proteinases ». *FEBS letters* 486(3): 247-51.
- Filip, Anna et al. 2015. « A Simple Two Dimensional Culture Method to Study the Hypertrophic Differentiation of Rat Articular Chondrocytes ». *Bio-Medical Materials and Engineering* 25(1 Suppl): 87-102.
- Fitzgerald, Jamie, Su Tay Ting, et John F. Bateman. 2002. « WARP Is a New Member of the von Willebrand Factor A-Domain Superfamily of Extracellular Matrix Proteins ». *FEBS letters* 517(1-3): 61-66.
- Fransès, R.E., D.F. McWilliams, P.I. Mapp, et D.A. Walsh. 2010. « Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA ». *Osteoarthritis and Cartilage* 18(4): 563-71.
- Franz-Odendaal, Tamara A., Brian K. Hall, et P. Eckhard Witten. 2006. « Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235(1): 176-90.
- Friel, Nicole A., et Constance R. Chu. 2013. « The Role of ACL Injury in the Development of Posttraumatic Knee Osteoarthritis ». *Clinics in sports medicine* 32(1): 1-12.
- Fuerst, FC et al. 2011. « Regulation of MMP3 by laminin alpha 4 in human osteoarthritic cartilage ». *Scandinavian journal of rheumatology* 40(6): 494-96.
- Fuerst, M. et al. 2009. « Calcification of Articular Cartilage in Human Osteoarthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 60(9): 2694-2703.
- Fuerst, Martin et al. 2010. « Investigation of Calcium Crystals in OA Knees ». *Rheumatology International* 30(5): 623-31.
- Fujii, Masataka et al. 2013. « Chondromodulin-I Derived from the Inner Meniscus Prevents Endothelial Cell Proliferation ». *Journal of Orthopaedic Research* 31(4): 538-43.
- Fujisawa, T. et al. 1999. « Cyclic Mechanical Stress Induces Extracellular Matrix Degradation in Cultured Chondrocytes via Gene Expression of Matrix Metalloproteinases and Interleukin-1 ». *Journal of Biochemistry* 125(5): 966-75.

- Fukui, Naoshi, Yasuko Ikeda, et al. 2008. « Regional Differences in Chondrocyte Metabolism in Osteoarthritis: A Detailed Analysis by Laser Capture Microdissection ». *Arthritis and Rheumatism* 58(1): 154-63.
- Fukui, Naoshi, Yoshinari Miyamoto, et al. 2008. « Zonal Gene Expression of Chondrocytes in Osteoarthritic Cartilage ». *Arthritis and Rheumatism* 58(12): 3843-53.
- Funaki, H. et al. 2001. « Expression and Localization of Angiogenic Inhibitory Factor, Chondromodulin-I, in Adult Rat Eye ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42(6): 1193-1200.
- Funck-Brentano, Thomas, et Martine Cohen-Solal. 2015. « Subchondral Bone and Osteoarthritis ». *Current Opinion in Rheumatology* 27(4): 420-26.
- Gannon, F. H., et L. Sokoloff. 1999. « Histomorphometry of the Aging Human Patella: Histologic Criteria and Controls ». *Osteoarthritis and Cartilage* 7(2): 173-81.
- Gao, Zhi-Yong et al. 2020. « T140 Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation and Matrix Formation Through the SDF-1/CXC Receptor-4 Signaling Pathway in Endplate Chondrocytes of the Rat Intervertebral Discs ». *World Neurosurgery* 133: e165-72.
- García-Andrés, Clara, et Miguel Torres. 2010. « Comparative Expression Pattern Analysis of the Highly Conserved Chemokines SDF1 and CXCL14 during Amniote Embryonic Development ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239(10): 2769-77.
- Gavard, Julie, Vyomesh Patel, et J. Silvio Gutkind. 2008. « Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through MDia ». *Developmental Cell* 14(1): 25-36.
- GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. 2018. « Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 354 Diseases and Injuries for 195 Countries and Territories, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 ». *Lancet (London, England)* 392(10159): 1789-1858.
- Gelb, D. E., R. N. Rosier, et J. E. Puzas. 1990. « The Production of Transforming Growth Factor-Beta by Chick Growth Plate Chondrocytes in Short Term Monolayer Culture ». *Endocrinology* 127(4): 1941-47.
- Gerber, H. P. et al. 1999. « VEGF Couples Hypertrophic Cartilage Remodeling, Ossification and Angiogenesis during Endochondral Bone Formation ». *Nature Medicine* 5(6): 623-28.
- Gerhardt, Holger et al. 2003. « VEGF Guides Angiogenic Sprouting Utilizing Endothelial Tip Cell Filopodia ». *The Journal of Cell Biology* 161(6): 1163-77.
- Ghosh, P., D. Burkhardt, R. Read, et C. Bellenger. 1991. « Recent Advances in Animal Models for Evaluating Chondroprotective Drugs ». *The Journal of Rheumatology. Supplement* 27: 143-46.
- Giatromanolaki, Alexandra et al. 2003. « Upregulated hypoxia inducible factor-1 α and -2 α pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 5(4): R193-201.
- Gibson, G., D. L. Lin, et M. Roque. 1997. « Apoptosis of Terminally Differentiated Chondrocytes in Culture ». *Experimental Cell Research* 233(2): 372-82.

- Glasson, S. S., T. J. Blanchet, et E. A. Morris. 2007. « The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse ». *Osteoarthritis and Cartilage* 15(9): 1061-69.
- Goldring, Mary B. et al. 2011. « Roles of Inflammatory and Anabolic Cytokines in Cartilage Metabolism: Signals and Multiple Effectors Converge upon MMP-13 Regulation in Osteoarthritis ». *European Cells & Materials* 21: 202-20.
- Goldring, Mary B, et Kenneth B Marcu. 2009. « Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases ». *Arthritis Research & Therapy* 11(3): 224.
- Goldring, Steven R., et Mary B. Goldring. 2016. « Changes in the Osteochondral Unit during Osteoarthritis: Structure, Function and Cartilage–Bone Crosstalk ». *Nature Reviews Rheumatology* 12(11): 632-44.
- Golub, E., et K. Boesze-Battaglia. 2007. « The role of alkaline phosphatase in mineralization ».
- Gómez, Rodolfo et al. 2011. « Adiponectin and Leptin Increase IL-8 Production in Human Chondrocytes ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 70(11): 2052-54.
- Gonzalez, A. M., M. Buscaglia, M. Ong, et A. Baird. 1990. « Distribution of Basic Fibroblast Growth Factor in the 18-Day Rat Fetus: Localization in the Basement Membranes of Diverse Tissues. » *Journal of Cell Biology* 110(3): 753-65.
- Good, D. J. et al. 1990. « A Tumor Suppressor-Dependent Inhibitor of Angiogenesis Is Immunologically and Functionally Indistinguishable from a Fragment of Thrombospondin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(17): 6624-28.
- Gosset, Marjolaine et al. 2006. « Prostaglandin E2 Synthesis in Cartilage Explants under Compression: MPGES-1 Is a Mechanosensitive Gene ». *Arthritis Research & Therapy* 8(4): R135.
- . 2008. « Mechanical Stress and Prostaglandin E2 Synthesis in Cartilage ». *Biorheology* 45(3-4): 301-20.
- Goto, Yoh et al. 2016. « CXCR4+ CD45- Cells Are Niche Forming for Osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 Signaling Pathways in Bone Marrow ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 34(11): 2733-43.
- Goyal, Neeru, Madhur Gupta, Kusum Joshi, et Onkar Nath Nagi. 2010. « Immunohistochemical Analysis of Ageing and Osteoarthritic Articular Cartilage ». *Journal of Molecular Histology* 41(4-5): 193-97.
- Grassi, Francesco et al. 2003. « Human Osteoclasts Express Different CXC Chemokines Depending on Cell Culture Substrate: Molecular and Immunocytochemical Evidence of High Levels of CXCL10 and CXCL12 ». *Histochemistry and Cell Biology* 120(5): 391-400.
- Grassi, Francesco et al. 2004. « CXCL12 Chemokine Up-Regulates Bone Resorption and MMP-9 Release by Human Osteoclasts: CXCL12 Levels Are Increased in Synovial and Bone Tissue of Rheumatoid Arthritis Patients ». *Journal of Cellular Physiology* 199(2): 244-51.
- Greene, George W. et al. 2011. « Adaptive Mechanically Controlled Lubrication Mechanism Found in Articular Joints ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(13): 5255-59.
- Griffith, James F. et al. 2009. « A Study of Bone Marrow and Subcutaneous Fatty Acid Composition in Subjects of Varying Bone Mineral Density ». *Bone* 44(6): 1092-96.

- Grotle, Margreth et al. 2008. « Obesity and Osteoarthritis in Knee, Hip and/or Hand: An Epidemiological Study in the General Population with 10 Years Follow-Up ». *BMC musculoskeletal disorders* 9: 132.
- Grynblas, M. D. et al. 1991. « Subchondral Bone in Osteoarthritis ». *Calcified Tissue International* 49(1): 20-26.
- Guang, Liang G., Adele L. Boskey, et Wei Zhu. 2012. « Regulatory Role of Stromal Cell-Derived Factor-1 in Bone Morphogenetic Protein-2-Induced Chondrogenic Differentiation in Vitro ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44(11): 1825-33.
- Guévremont, Melanie et al. 2003. « Human Adult Chondrocytes Express Hepatocyte Growth Factor (HGF) Isoforms but Not HgF: Potential Implication of Osteoblasts on the Presence of HGF in Cartilage ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18(6): 1073-81.
- Guo, Xizhi, Kinglun Kingston Mak, Makoto M. Taketo, et Yingzi Yang. 2009. « The Wnt/Beta-Catenin Pathway Interacts Differentially with PTHrP Signaling to Control Chondrocyte Hypertrophy and Final Maturation ». *PLoS One* 4(6): e6067.
- Gupta, K. et al. 1999. « Binding and Displacement of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Thrombospondin: Effect on Human Microvascular Endothelial Cell Proliferation and Angiogenesis ». *Angiogenesis* 3(2): 147-58.
- Gustafsson, Erika, Maylin Almonte-Becerril, Wilhelm Bloch, et Mercedes Costell. 2013. « Perlecan Maintains Microvessel Integrity In Vivo and Modulates Their Formation In Vitro ». *PLOS ONE* 8(1): e53715.
- Haigh, J. J., H. P. Gerber, N. Ferrara, et E. F. Wagner. 2000. « Conditional Inactivation of VEGF-A in Areas of Collagen2a1 Expression Results in Embryonic Lethality in the Heterozygous State ». *Development (Cambridge, England)* 127(7): 1445-53.
- Hamilton, John L. et al. 2016. « Targeting VEGF and its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain ». *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31(5): 911-24.
- Han, Dafei et al. 2020. « The Emerging Role of Fibroblast-like Synoviocytes-Mediated Synovitis in Osteoarthritis: An Update ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(17): 9518-32.
- Han, Weiyu et al. 2014. « Infrapatellar Fat Pad in the Knee: Is Local Fat Good or Bad for Knee Osteoarthritis? ». *Arthritis Research & Therapy* 16(4): R145.
- Hanahan, D., et J. Folkman. 1996. « Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis ». *Cell* 86(3): 353-64.
- Hannan, M. T. et al. 1993. « Bone Mineral Density and Knee Osteoarthritis in Elderly Men and Women. The Framingham Study ». *Arthritis and Rheumatism* 36(12): 1671-80.
- Hannan, M. T., D. T. Felson, et T. Pincus. 2000. « Analysis of the Discordance between Radiographic Changes and Knee Pain in Osteoarthritis of the Knee ». *The Journal of Rheumatology* 27(6): 1513-17.
- Harada, S. et al. 1994. « Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Prostaglandin E2 and E1 in Osteoblasts ». *The Journal of Clinical Investigation* 93(6): 2490-96.

- Hardouin, Pierre, Vittorio Pansini, et Bernard Cortet. 2014. « Bone Marrow Fat ». *Joint Bone Spine* 81(4): 313-19.
- Hardouin, Pierre, Tareck Rharass, et Stéphanie Lucas. 2016. « Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? » *Frontiers in Endocrinology* 7. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fendo.2016.00085/abstract> (27 août 2018).
- Harrison, M. H., F. Schajowicz, et J. Trueta. 1953. « Osteoarthritis of the Hip: A Study of the Nature and Evolution of the Disease ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 35-B(4): 598-626.
- Harvey, W. F. et al. 2008. « Knee Alignment Differences between Chinese and Caucasian Subjects without Osteoarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 67(11): 1524-28.
- Hasegawa, Tetsuo et al. 2019. « Identification of a Novel Arthritis-Associated Osteoclast Precursor Macrophage Regulated by FoxM1 ». *Nature Immunology* 20(12): 1631-43.
- Hashimoto, Ko et al. 2013. « Regulated Transcription of Human Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) and Interleukin-1 β (IL1B) Genes in Chondrocytes Depends on Methylation of Specific Proximal Promoter CpG Sites ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(14): 10061-72.
- Hashimoto, S. et al. 2002. « Development and Regulation of Osteophyte Formation during Experimental Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 10(3): 180-87.
- Hata, Kenji, Yoshifumi Takahata, Tomohiko Murakami, et Riko Nishimura. 2017. « Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification ». *Journal of Bone Metabolism* 24(2): 75-82.
- Hayami, Tadashi et al. 2003. « Expression of the Cartilage Derived Anti-Angiogenic Factor Chondromodulin-I Decreases in the Early Stage of Experimental Osteoarthritis ». *The Journal of Rheumatology* 30(10): 2207-17.
- . 2004. « The Role of Subchondral Bone Remodeling in Osteoarthritis: Reduction of Cartilage Degeneration and Prevention of Osteophyte Formation by Alendronate in the Rat Anterior Cruciate Ligament Transection Model ». *Arthritis and Rheumatism* 50(4): 1193-1206.
- Hayashi, Shinya et al. 2011. « The Type II Collagen N-Propeptide, PIIBNP, Inhibits Cell Survival and Bone Resorption of Osteoclasts via Integrin-Mediated Signaling ». *Bone* 49(4): 644-52.
- Haywood, L. et al. 2003. « Inflammation and Angiogenesis in Osteoarthritis ». *Arthritis & Rheumatism* 48(8): 2173-77.
- Haywood, L., et D. A. Walsh. 2001. « Vasculature of the Normal and Arthritic Synovial Joint ». *Histology and Histopathology* 16(1): 277-84.
- Hecht, J. et al. 2007. « Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. » *Gene expression patterns : GEP*.
- Heino, Terhi J., Kosaku Kurata, Hidehiko Higaki, et H. Kalervo Väänänen. 2009. « Evidence for the Role of Osteocytes in the Initiation of Targeted Remodeling ». *Technology and Health Care: Official Journal of the European Society for Engineering and Medicine* 17(1): 49-56.
- Heinonen, J. et al. 2011. « Snorc Is a Novel Cartilage Specific Small Membrane Proteoglycan Expressed in Differentiating and Articular Chondrocytes ». *Osteoarthritis and Cartilage* 19(8): 1026-35.

- Hendriks, Michelle, et Saravana K. Ramasamy. 2020. « Blood Vessels and Vascular Niches in Bone Development and Physiological Remodeling ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 602278.
- Henriksen, Kim, Morten Karsdal, Jean-Marie Delaisse, et Michael T. Engsig. 2003. « RANKL and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Induce Osteoclast Chemotaxis through an ERK1/2-Dependent Mechanism ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(49): 48745-53.
- Higashikawa, Akiro et al. 2009. « Identification of the Core Element Responsive to Runt-Related Transcription Factor 2 in the Promoter of Human Type X Collagen Gene ». *Arthritis and Rheumatism* 60(1): 166-78.
- Hilal, G. et al. 1998. « Osteoblast-like Cells from Human Subchondral Osteoarthritic Bone Demonstrate an Altered Phenotype in Vitro: Possible Role in Subchondral Bone Sclerosis ». *Arthritis and Rheumatism* 41(5): 891-99.
- Hill, Catherine L. et al. 2005. « Cruciate Ligament Integrity in Osteoarthritis of the Knee ». *Arthritis and Rheumatism* 52(3): 794-99.
- Hill, P. A. 1998. « Bone Remodelling ». *British Journal of Orthodontics* 25(2): 101-7.
- Hinterwimmer, S. et al. 2004. « Cartilage Atrophy in the Knees of Patients after Seven Weeks of Partial Load Bearing ». *Arthritis and Rheumatism* 50(8): 2516-20.
- Hiraki et al. 1997. « Inhibition of DNA Synthesis and Tube Morphogenesis of Cultured Vascular Endothelial Cells by Chondromodulin-I ». *FEBS Letters* 415(3): 321-24.
- Hiraki, Yuji et al. 1991. « Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175(3): 971-77.
- den Hollander, Wouter et al. 2017. « Genome-Wide Association and Functional Studies Identify a Role for Matrix Gla Protein in Osteoarthritis of the Hand ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76(12): 2046-53.
- Hong, Kyung Hee, Jewon Ryu, et Ki Hoon Han. 2005. « Monocyte Chemoattractant Protein-1-Induced Angiogenesis Is Mediated by Vascular Endothelial Growth Factor-A ». *Blood* 105(4): 1405-7.
- Hopwood, Blair, Anna Tsykin, David M. Findlay, et Nicola L. Fazzalari. 2007. « Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor- β /bone morphogenic protein signalling ». *Arthritis Research & Therapy* 9(5): R100.
- Hoyland, J. A. et al. 1991. « Distribution of Type X Collagen mRNA in Normal and Osteoarthritic Human Cartilage ». *Bone and Mineral* 15(2): 151-63.
- Hsieh, Jeng-Long et al. 2010. « Intraarticular Gene Transfer of Thrombospondin-1 Suppresses the Disease Progression of Experimental Osteoarthritis ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 28(10): 1300-1306.
- Hu, Kai, et Bjorn R. Olsen. 2016. « Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair ». *The Journal of Clinical Investigation* 126(2): 509-26.
- Hu, Yanjun et al. 2020. « Defactinib Attenuates Osteoarthritis by Inhibiting Positive Feedback Loop between H-Type Vessels and MSCs in Subchondral Bone ». *Journal of Orthopaedic Translation* 24: 12-22.

- Huang, Tingting, Li Sun, Xianglin Yuan, et Hong Qiu. 2017. « Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression ». *Oncotarget* 8(48): 84546-58.
- Huebner, J. L., K. A. Johnson, V. B. Kraus, et R. A. Terkeltaub. 2009. « Transglutaminase 2 Is a Marker of Chondrocyte Hypertrophy and Osteoarthritis Severity in the Hartley Guinea Pig Model of Knee OA ». *Osteoarthritis and Cartilage* 17(8): 1056-64.
- Huebner, Janet L. et al. 2014. « Alpha C-Telopeptide of Type I Collagen Is Associated with Subchondral Bone Turnover and Predicts Progression of Joint Space Narrowing and Osteophytes in Osteoarthritis ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66(9): 2440-49.
- Hughes, D. E., D. M. Salter, et R. Simpson. 1994. « CD44 Expression in Human Bone: A Novel Marker of Osteocytic Differentiation ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9(1): 39-44.
- Hunter, G. K., D. P. Holmyard, et K. P. Pritzker. 1993. « Calcification of Chick Vertebral Chondrocytes Grown in Agarose Gels: A Biochemical and Ultrastructural Study ». *Journal of Cell Science* 104 (Pt 4): 1031-38.
- Hwang, Jennifer et al. 2008. « Increased Hydraulic Conductance of Human Articular Cartilage and Subchondral Bone Plate with Progression of Osteoarthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 58(12): 3831-42.
- Iijima, H. et al. 2014. « Destabilization of the Medial Meniscus Leads to Subchondral Bone Defects and Site-Specific Cartilage Degeneration in an Experimental Rat Model ». *Osteoarthritis and Cartilage* 22(7): 1036-43.
- Imhof, H. et al. 2000. « Subchondral Bone and Cartilage Disease: A Rediscovered Functional Unit ». *Investigative Radiology* 35(10): 581-88.
- Iruela-Arispe, M. L. et al. 1999. « Inhibition of Angiogenesis by Thrombospondin-1 Is Mediated by 2 Independent Regions within the Type 1 Repeats ». *Circulation* 100(13): 1423-31.
- Jakobsson, Lars et al. 2006. « Heparan Sulfate in Trans Potentiates VEGFR-Mediated Angiogenesis ». *Developmental Cell* 10(5): 625-34.
- Jakobsson, Lars et al. 2010. « Endothelial Cells Dynamically Compete for the Tip Cell Position during Angiogenic Sprouting ». *Nature Cell Biology* 12(10): 943-53.
- Jay, Gregory D., et Kimberly A. Waller. 2014. « The Biology of Lubricin: Near Frictionless Joint Motion ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 39: 17-24.
- Jeon, Ok Hee et al. 2017. « Local Clearance of Senescent Cells Attenuates the Development of Post-Traumatic Osteoarthritis and Creates a pro-Regenerative Environment ». *Nature Medicine* 23(6): 775-81.
- Jeon, Ok Hee, Nathaniel David, Judith Campisi, et Jennifer H. Elisseeff. 2018. « Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection ». *The Journal of Clinical Investigation* 128(4): 1229-37.
- Ji, Quanbo et al. 2019. « Single-Cell RNA-Seq Analysis Reveals the Progression of Human Osteoarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 78(1): 100-110.
- Jiang, J. et al. 2008. « Interaction between Zonal Populations of Articular Chondrocytes Suppresses Chondrocyte Mineralization and This Process Is Mediated by PTHrP ». *Osteoarthritis and Cartilage* 16(1): 70-82.

- Jiang, Li-Feng, Jing-Hua Fang, et Li-Dong Wu. 2019. « Role of infrapatellar fat pad in pathological process of knee osteoarthritis: Future applications in treatment ». *World Journal of Clinical Cases* 7(16): 2134-42.
- Jiang, Liying et al. 2016. « Body Mass Index and Hand Osteoarthritis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis ». *International Journal of Rheumatic Diseases* 19(12): 1244-54.
- Jiang, Xinnong, et John R. Couchman. 2003. « Perlecan and Tumor Angiogenesis ». *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51(11): 1393-1410.
- Jikko, Akitoshi et al. 1993. « Characterization of the Mineralization Process in Cultures of Rabbit Growth Plate Chondrocytes ». *Developmental Biology* 156(2): 372-80.
- Johnson, Victoria L., et David J. Hunter. 2014. « The Epidemiology of Osteoarthritis ». *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology* 28(1): 5-15.
- Jones, Elizabeth A. V., Ferdinand le Noble, et Anne Eichmann. 2006. « What Determines Blood Vessel Structure? Genetic Prespecification vs. Hemodynamics ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 21: 388-95.
- Jones, Graeme et al. 2003. « Knee Articular Cartilage Development in Children: A Longitudinal Study of the Effect of Sex, Growth, Body Composition, and Physical Activity ». *Pediatric Research* 54(2): 230-36.
- Jones, S. W. et al. 2006. « The Orphan G-Protein Coupled Receptor RDC1: Evidence for a Role in Chondrocyte Hypertrophy and Articular Cartilage Matrix Turnover ». *Osteoarthritis and Cartilage* 14(6): 597-608.
- Jung, Youn-Kwan et al. 2018. « Calcium-Phosphate Complex Increased during Subchondral Bone Remodeling Affects Earlystage Osteoarthritis ». *Scientific Reports* 8(1): 487.
- Kadri, A. et al. 2008. « Osteoprotegerin Inhibits Cartilage Degradation through an Effect on Trabecular Bone in Murine Experimental Osteoarthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 58(8): 2379-86.
- Kamei, Makoto et al. 2006. « Endothelial Tubes Assemble from Intracellular Vacuoles in Vivo ». *Nature* 442(7101): 453-56.
- Kamekura et al. 2006. « Contribution of Runt-Related Transcription Factor 2 to the Pathogenesis of Osteoarthritis in Mice after Induction of Knee Joint Instability ». *Arthritis and Rheumatism* 54(8): 2462-70.
- Kamekura, S. et al. 2005. « Osteoarthritis Development in Novel Experimental Mouse Models Induced by Knee Joint Instability ». *Osteoarthritis and Cartilage* 13(7): 632-41.
- Kanbe, Katsuaki, Kenji Takagishi, et Qian Chen. 2002. « Stimulation of Matrix Metalloprotease 3 Release from Human Chondrocytes by the Interaction of Stromal Cell-Derived Factor 1 and CXC Chemokine Receptor 4 ». *Arthritis and Rheumatism* 46(1): 130-37.
- Karsdal, M. A. et al. 2014. « The Coupling of Bone and Cartilage Turnover in Osteoarthritis: Opportunities for Bone Antiresorptives and Anabolics as Potential Treatments? » *Annals of the Rheumatic Diseases* 73(2): 336-48.
- Karsenty, Gerard, Henry M. Kronenberg, et Carmine Settembre. 2009. « Genetic Control of Bone Formation ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 629-48.

- Kaur, Sukhbir et al. 2010. « Thrombospondin-1 Inhibits VEGF Receptor-2 Signaling by Disrupting Its Association with CD47 ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(50): 38923-32.
- Kaux, J. -F., et J. -M. Crielaard. 2014. « Tendon et tendinopathie ». *Journal de Traumatologie du Sport* 31(4): 235-40.
- Kiani, Chris et al. 2002. « Structure and Function of Aggrecan ». *Cell Research* 12(1): 19-32.
- Kijowski, Jacek et al. 2001. « The SDF-1-CXCR4 Axis Stimulates VEGF Secretion and Activates Integrins but Does Not Affect Proliferation and Survival in Lymphohematopoietic Cells ». *STEM CELLS* 19(5): 453-66.
- Kim, D. Y. et al. 2003. « Articular Chondrocyte Apoptosis in Equine Osteoarthritis ». *The Veterinary Journal* 166(1): 52-57.
- Kim, G.-W. et al. 2015. « CXC Chemokine Ligand 12a Enhances Chondrocyte Proliferation and Maturation during Endochondral Bone Formation ». *Osteoarthritis and Cartilage* 23(6): 966-74.
- Kim, H. A. et al. 2000. « Apoptotic Chondrocyte Death in Human Osteoarthritis ». *The Journal of Rheumatology* 27(2): 455-62.
- Kim, Hae-Rim et al. 2014. « Reciprocal Activation of CD4+ T Cells and Synovial Fibroblasts by Stromal Cell-Derived Factor 1 Promotes RANKL Expression and Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66(3): 538-48.
- Kim, Sooah et al. 2017. « Metabolite Profiles of Synovial Fluid Change with the Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis ». *Joint Bone Spine* 84(5): 605-10.
- Kirsch, T., B. Swoboda, et H. Nah. 2000. « Activation of Annexin II and V Expression, Terminal Differentiation, Mineralization and Apoptosis in Human Osteoarthritic Cartilage ». *Osteoarthritis and Cartilage* 8(4): 294-302.
- Kitamura, H. P., H. Yanase, H. Kitamura, et T. Iwanaga. 1999. « Unique Localization of Protein Gene Product 9.5 in Type B Synoviocytes in the Joints of the Horse ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 47(3): 343-52.
- Klein-Wieringa, I. R. et al. 2011. « The Infrapatellar Fat Pad of Patients with Osteoarthritis Has an Inflammatory Phenotype ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 70(5): 851-57.
- Klinger, Patricia et al. 2011. « Chondromodulin 1 Stabilizes the Chondrocyte Phenotype and Inhibits Endochondral Ossification of Porcine Cartilage Repair Tissue ». *Arthritis and Rheumatism* 63(9): 2721-31.
- Knothe Tate, Melissa L., Josée R. Adamson, Andrea E. Tami, et Thomas W. Bauer. 2004. « The Osteocyte ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(1): 1-8.
- Ko, Frank C. et al. 2013. « In Vivo Cyclic Compression Causes Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Changes in Mouse Tibiae ». *Arthritis and Rheumatism* 65(6): 1569-78.
- Kobayashi, K. et al. 2000. « Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the ODF/RANKL-RANK Interaction ». *The Journal of Experimental Medicine* 191(2): 275-86.

- Kobayashi, Takashi, Ikuko Kakizaki, Hiroyuki Nozaka, et Toshiya Nakamura. 2017. « Chondroitin Sulfate Proteoglycans from Salmon Nasal Cartilage Inhibit Angiogenesis ». *Biochemistry and Biophysics Reports* 9: 72-78.
- Koh, Yong-Gon, et Yun-Jin Choi. 2012. « Infrapatellar Fat Pad-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy for Knee Osteoarthritis ». *The Knee* 19(6): 902-7.
- Koskinen, Anna et al. 2011. « Leptin Enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 Production in Human Osteoarthritic Cartilage and Correlates with MMP-1 and MMP-3 in Synovial Fluid from OA Patients ». *Clinical and Experimental Rheumatology* 29(1): 57-64.
- Kozhemyakina, Elena, Andrew B. Lassar, et Elazar Zelzer. 2015. « A Pathway to Bone: Signaling Molecules and Transcription Factors Involved in Chondrocyte Development and Maturation ». *Development (Cambridge, England)* 142(5): 817-31.
- van der Kraan, P. M., et W. B. van den Berg. 2012. « Chondrocyte Hypertrophy and Osteoarthritis: Role in Initiation and Progression of Cartilage Degeneration? » *Osteoarthritis and Cartilage* 20(3): 223-32.
- van der Kraan, Peter M., et Wim B. van den Berg. 2007a. « Osteophytes: Relevance and Biology ». *Osteoarthritis and Cartilage* 15(3): 237-44.
- Kricun, M. E. 1985. « Red-Yellow Marrow Conversion: Its Effect on the Location of Some Solitary Bone Lesions ». *Skeletal Radiology* 14(1): 10-19.
- Kristensen, Helene B. et al. 2014. « Osteoblast Recruitment Routes in Human Cancellous Bone Remodeling ». *The American Journal of Pathology* 184(3): 778-89.
- Kronenberg, Henry M. 2003. « Developmental Regulation of the Growth Plate ». *Nature* 423(6937): 332-36.
- Kuhlmann, Christoph Rüdiger Wolfram et al. 2005. « Signalling Mechanisms of SDF-Induced Endothelial Cell Proliferation and Migration ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335(4): 1107-14.
- Kusumbe, Anjali P., Saravana K. Ramasamy, et Ralf H. Adams. 2014. « Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis by a Specific Vessel Subtype in Bone ». *Nature* 507(7492): 323-28.
- Labusca, Luminita, et Florin Zugun-Eloae. 2018. « The Unexplored Role of Intra-Articular Adipose Tissue in the Homeostasis and Pathology of Articular Joints ». *Frontiers in Veterinary Science* 5: 35.
- Lafage-Proust, Marie-Hélène et al. 2015. « Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling ». *BoneKEy Reports* 4: 662.
- Laiguillon, Marie-Charlotte et al. 2014. « Expression and Function of Visfatin (Nampt), an Adipokine-Enzyme Involved in Inflammatory Pathways of Osteoarthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 16(1): R38.
- Lajeunesse, Daniel, et Pascal Reboul. 2003. « Subchondral Bone in Osteoarthritis: A Biologic Link with Articular Cartilage Leading to Abnormal Remodeling ». *Current Opinion in Rheumatology* 15(5): 628-33.
- Lam, J. et al. 2000. « TNF-Alpha Induces Osteoclastogenesis by Direct Stimulation of Macrophages Exposed to Permissive Levels of RANK Ligand ». *The Journal of Clinical Investigation* 106(12): 1481-88.

- Lane, L. B., et P. G. Bullough. 1980. « Age-Related Changes in the Thickness of the Calcified Zone and the Number of Tidemarks in Adult Human Articular Cartilage ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 62(3): 372-75.
- Lane, L. B., A. Villacin, et P. G. Bullough. 1977. « The Vascularity and Remodelling of Subchondrial Bone and Calcified Cartilage in Adult Human Femoral and Humeral Heads. An Age- and Stress-Related Phenomenon ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 59(3): 272-78.
- de Lange-Brokaar, B. J. E. et al. 2012. « Synovial Inflammation, Immune Cells and Their Cytokines in Osteoarthritis: A Review ». *Osteoarthritis and Cartilage* 20(12): 1484-99.
- Langen, Urs H. et al. 2017. « Cell–Matrix Signals Specify Bone Endothelial Cells during Developmental Osteogenesis ». *Nature Cell Biology* 19(3): 189-201.
- Larrivé, Bruno et al. 2009. « Guidance of Vascular Development: Lessons from the Nervous System ». *Circulation Research* 104(4): 428-41.
- Lee, Dabin et al. 2018. « CCL4 Enhances Preosteoclast Migration and Its Receptor CCR5 Downregulation by RANKL Promotes Osteoclastogenesis ». *Cell Death & Disease* 9(5): 1-12.
- Lefebvre, V., P. Li, et B. de Crombrughe. 1998. « A New Long Form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 Are Coexpressed in Chondrogenesis and Cooperatively Activate the Type II Collagen Gene ». *The EMBO journal* 17(19): 5718-33.
- Leong, Daniel J. et al. 2010. « Matrix Metalloproteinase-3 in Articular Cartilage Is Upregulated by Joint Immobilization and Suppressed by Passive Joint Motion ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 29(5): 420-26.
- Leong, Daniel J., et Hui B. Sun. 2014. « Mechanical Loading: Potential Preventive and Therapeutic Strategy for Osteoarthritis ». *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 22(7): 465-66.
- Leopoldino, Amanda O. et al. 2019. « Paracetamol versus Placebo for Knee and Hip Osteoarthritis ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2: CD013273.
- Li, B., et R. M. Aspden. 1997. « Composition and Mechanical Properties of Cancellous Bone from the Femoral Head of Patients with Osteoporosis or Osteoarthritis ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12(4): 641-51.
- Li, Guanwu et al. 2017. « To Assess Differential Features of Marrow Adiposity between Postmenopausal Women with Osteoarthritis and Osteoporosis Using Water/Fat MRI ». *Menopause (New York, N.Y.)* 24(1): 105-11.
- Li, J. et al. 2021. « The Role of Stromal Cell-Derived Factor 1 on Cartilage Development and Disease ». *Osteoarthritis and Cartilage* 29(3): 313-22.
- Li, Jianmei, et Shiwu Dong. 2016. « The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation ». *Stem Cells International* 2016: 2470351.
- Li, Jiao, Xiang Chen, Lingyun Lu, et Xijie Yu. 2020. « The Relationship between Bone Marrow Adipose Tissue and Bone Metabolism in Postmenopausal Osteoporosis ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 52: 88-98.

- Li, Pengcui et al. 2016. « Blockade of hypoxia-induced CXCR4 with AMD3100 inhibits production of OA-associated catabolic mediators IL-1 β and MMP-13 ». *Molecular Medicine Reports* 14(2): 1475-82.
- Li, Wei et al. 2019a. « Bevacizumab Tested for Treatment of Knee Osteoarthritis via Inhibition of Synovial Vascular Hyperplasia in Rabbits ». *Journal of Orthopaedic Translation* 19: 38-46.
- Li, Xuri et al. 2009. « VEGF-B ». *Cell Adhesion & Migration* 3(4): 322-27.
- Li, Z. et al. 2017. « Resistin Promotes CCL4 Expression through Toll-like Receptor-4 and Activation of the P38-MAPK and NF-KB Signaling Pathways: Implications for Intervertebral Disc Degeneration ». *Osteoarthritis and Cartilage* 25(2): 341-50.
- Lin, Cristiane G. et al. 2003. « CCN3 (NOV) Is a Novel Angiogenic Regulator of the CCN Protein Family ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(26): 24200-208.
- Lisignoli, Gina et al. 2006. « CXCL12 (SDF-1) and CXCL13 (BCA-1) Chemokines Significantly Induce Proliferation and Collagen Type I Expression in Osteoblasts from Osteoarthritis Patients ». *Journal of Cellular Physiology* 206(1): 78-85.
- Little, Christopher B. et al. 2007. « Blocking Aggrecanase Cleavage in the Aggrecan Interglobular Domain Abrogates Cartilage Erosion and Promotes Cartilage Repair ». *The Journal of Clinical Investigation* 117(6): 1627-36.
- Litwic, Anna, Mark H. Edwards, Elaine M. Dennison, et Cyrus Cooper. 2013. « Epidemiology and Burden of Osteoarthritis ». *British Medical Bulletin* 105: 185-99.
- Liu, Marco Angelozzi, Abdul Haseeb, et Véronique Lefebvre. 2018. « SOX9 Is Dispensable for the Initiation of Epigenetic Remodeling and the Activation of Marker Genes at the Onset of Chondrogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 145(14): dev164459.
- Liu, Li-Fen et al. 2011. « Characterization of Age-Related Gene Expression Profiling in Bone Marrow and Epididymal Adipocytes ». *BMC genomics* 12: 212.
- Liu-Bryan, Ru, et Robert Terkeltaub. 2015. « Emerging Regulators of the Inflammatory Process in Osteoarthritis ». *Nature Reviews. Rheumatology* 11(1): 35-44.
- Loef, M. et al. 2018. « Comparison of Histological and Morphometrical Changes Underlying Subchondral Bone Abnormalities in Inflammatory and Degenerative Musculoskeletal Disorders: A Systematic Review ». *Osteoarthritis and Cartilage* 26(8): 992-1002.
- Loeser, R. F. et al. 2000. « Reduction in the Chondrocyte Response to Insulin-like Growth Factor 1 in Aging and Osteoarthritis: Studies in a Non-Human Primate Model of Naturally Occurring Disease ». *Arthritis and Rheumatism* 43(9): 2110-20.
- Loeser, R. F. et al. 2009. « Aging and Osteoarthritis: The Role of Chondrocyte Senescence and Aging Changes in the Cartilage Matrix ». *Osteoarthritis and Cartilage* 17(8): 971-79.
- Loeser, Richard F., Steven R. Goldring, Carla R. Scanzello, et Mary B. Goldring. 2012a. « Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ ». *Arthritis & Rheumatism* 64(6): 1697-1707.
- Loeser, Richard F., Steven R. Goldring, Carla R. Scanzello, et Mary B. Goldring. 2012b. « Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ ». *Arthritis and Rheumatism* 64(6): 1697-1707.

- Löfvall, Henrik et al. 2018. « Osteoclasts degrade bone and cartilage knee joint compartments through different resorption processes ». *Arthritis Research & Therapy* 20(1): 67.
- Lohmander, L. S. et al. 2009. « Incidence of Severe Knee and Hip Osteoarthritis in Relation to Different Measures of Body Mass: A Population-Based Prospective Cohort Study ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 68(4): 490-96.
- Long, Fanxin. 2011. « Building Strong Bones: Molecular Regulation of the Osteoblast Lineage ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13(1): 27-38.
- Lories, Rik J., et Frank P. Luyten. 2011. « The Bone-Cartilage Unit in Osteoarthritis ». *Nature Reviews. Rheumatology* 7(1): 43-49.
- Lu, Jiansen et al. 2018. « Positive-Feedback Regulation of Subchondral H-Type Vessel Formation by Chondrocyte Promotes Osteoarthritis Development in Mice: H-TYPE VESSEL FORMATION PROMOTES OSTEOARTHRITIS DEVELOPMENT IN MICE ». *Journal of Bone and Mineral Research* 33(5): 909-20.
- Lyons, Tim J, Sheena F McClure, Robert W Stoddart, et John McClure. 2006. « The Normal Human Chondro-Osseous Junctional Region: Evidence for Contact of Uncalcified Cartilage with Subchondral Bone and Marrow Spaces ». *BMC Musculoskeletal Disorders* 7(1). <http://bmc-musculoskeletal-disorders.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2474-7-52> (23 août 2018).
- MacGregor, A. J. et al. 2000. « The Genetic Contribution to Radiographic Hip Osteoarthritis in Women: Results of a Classic Twin Study ». *Arthritis and Rheumatism* 43(11): 2410-16.
- Madry, Henning, C. Niek van Dijk, et Magdalena Mueller-Gerbl. 2010. « The Basic Science of the Subchondral Bone ». *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 18(4): 419-33.
- Maes, Christa et al. 2004. « Soluble VEGF Isoforms Are Essential for Establishing epiphyseal Vascularization and Regulating Chondrocyte Development and Survival ». *The Journal of Clinical Investigation* 113(2): 188-99.
- Maes, Christa et al. 2006. « Placental Growth Factor Mediates Mesenchymal Cell Development, Cartilage Turnover, and Bone Remodeling during Fracture Repair ». *The Journal of Clinical Investigation* 116(5): 1230-42.
- Maes, Christa, Steven Goossens, et al. 2010. « Increased skeletal VEGF enhances β -catenin activity and results in excessively ossified bones ». *The EMBO Journal* 29(2): 424-41.
- Maes, Christa, Tatsuya Kobayashi, et al. 2010. « Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels ». *Developmental Cell* 19(2): 329-44.
- Magne, David et al. 2003. « Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification ». *Journal of Bone and Mineral Research* 18(8): 1430-42.
- Mahjoub, M., F. Berenbaum, et X. Houard. 2012. « Why Subchondral Bone in Osteoarthritis? The Importance of the Cartilage Bone Interface in Osteoarthritis ». *Osteoporosis International* 23(S8): 841-46.

- Makris, Eleftherios A., Pasha Hadidi, et Kyriacos A. Athanasiou. 2011. « The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration ». *Biomaterials* 32(30): 7411-31.
- Malaval, L., J. E. Aubin, et L. Vico. 2009. « Role of the Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoprotein (SIBLING), Bone Sialoprotein (BSP) in Bone Development and Remodeling ». *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 20(6): 1077-80.
- Malghem et al. 2004. « Le genou dégénératif: ménisques, os sous-chondral et tutti quanti ». *Revue Médicale Suisse*. <https://www.revmed.ch/RMS/2003/RMS-2444/23158> (12 août 2020).
- Malinin, T., et E. A. Ouellette. 2000. « Articular Cartilage Nutrition Is Mediated by Subchondral Bone: A Long-Term Autograft Study in Baboons ». *Osteoarthritis and Cartilage* 8(6): 483-91.
- Manferdini, Cristina et al. 2013. « Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert Antiinflammatory Effects on Chondrocytes and Synoviocytes from Osteoarthritis Patients through Prostaglandin E2 ». *Arthritis and Rheumatism* 65(5): 1271-81.
- Mankin, H. J., H. Dorfman, L. Lippiello, et A. Zarins. 1971. « Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips. II. Correlation of Morphology with Biochemical and Metabolic Data ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 53(3): 523-37.
- Manolagas, Stavros C. 2000. « Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis ». *Endocrine Reviews* 21(2): 115-37.
- Mansell, J P, et A J Bailey. 1998. « Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. » *Journal of Clinical Investigation* 101(8): 1596-1603.
- Mapp, P. I. et al. 2008. « Angiogenesis in Two Animal Models of Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 16(1): 61-69.
- von der Mark, K. et al. 1992. « Type X Collagen Synthesis in Human Osteoarthritic Cartilage. Indication of Chondrocyte Hypertrophy ». *Arthritis and Rheumatism* 35(7): 806-11.
- Marks, Sandy C., et Steven N. Popoff. 1988. « Bone Cell Biology: The Regulation of Development, Structure, and Function in the Skeleton ». *American Journal of Anatomy* 183(1): 1-44.
- Marlovits, Stefan et al. 2003. « Chondrogenesis of Aged Human Articular Cartilage in a Scaffold-Free Bioreactor ». *Tissue Engineering* 9(6): 1215-26.
- Maroudas, A. et al. 1992. « Swelling Pressure of Cartilage: Roles Played by Proteoglycans and Collagen » éd. Theodoros K. Karalis. *Mechanics of Swelling*: 487-512.
- Maroudas, A., P. Bullough, S. a. V. Swanson, et M. a. R. Freeman. 1968. « The permeability of articular cartilage ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* 50-B(1): 166-77.
- Martínez, P. et al. 2002. « Age-Related Changes in Parathyroid Hormone-Related Protein and Vascular Endothelial Growth Factor in Human Osteoblastic Cells ». *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 13(11): 874-81.

- Matic, Igor et al. 2016. « Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 34(12): 2930-42.
- Matsumoto, Tomoyuki et al. 2009. « Cartilage Repair in a Rat Model of Osteoarthritis through Intraarticular Transplantation of Muscle-Derived Stem Cells Expressing Bone Morphogenetic Protein 4 and Soluble Flt-1 ». *Arthritis and Rheumatism* 60(5): 1390-1405.
- Maurel et al. 2010. « [Infrapatellar fat pad: anterior crossroads of the knee] - PubMed ». *J Radiol.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20814373/> (12 août 2020).
- Mayne, R, M S Vail, P M Mayne, et E J Miller. 1976. « Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(5): 1674-78.
- Meyer, Christina, Luigi Notari, et S. Patricia Becerra. 2002. « Mapping the Type I Collagen-Binding Site on Pigment Epithelium-Derived Factor. Implications for Its Antiangiogenic Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(47): 45400-407.
- Miceli-Richard, C, M Le Bars, N Schmidely, et M Dougados. 2004. « Paracetamol in osteoarthritis of the knee ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 63(8): 923-30.
- Millerand, M. et al. 2020. « Activation of Innate Immunity by 14-3-3 ϵ , a New Potential Alarmin in Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 28(5): 646-57.
- Millerand, Marion, Francis Berenbaum, et Claire Jacques. 2019. « Danger Signals and Inflammaging in Osteoarthritis ». *Clinical and Experimental Rheumatology* 37 Suppl 120(5): 48-56.
- Mitsuyama, H. et al. 2007. « Calcification of Human Articular Knee Cartilage Is Primarily an Effect of Aging Rather than Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 15(5): 559-65.
- Mobasheri, A. et al. 2002. « Glucose Transport and Metabolism in Chondrocytes: A Key to Understanding Chondrogenesis, Skeletal Development and Cartilage Degradation in Osteoarthritis ». *Histology and Histopathology* 17(4): 1239-67.
- Mohsin, S, F J O'Brien, et T C Lee. 2006. « Microcracks in compact bone: a three-dimensional view ». *Journal of Anatomy* 209(1): 119-24.
- Montañez, Eloi, Ricardo P. Casaroli-Marano, Senén Vilaró, et Roser Pagan. 2002. « Comparative Study of Tube Assembly in Three-Dimensional Collagen Matrix and on Matrigel Coats ». *Angiogenesis* 5(3): 167-72.
- Mori, K. et al. 2001. « Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibits Retinal and Choroidal Neovascularization ». *Journal of Cellular Physiology* 188(2): 253-63.
- Mori, S., R. Harruff, et D. B. Burr. 1993. « Microcracks in Articular Calcified Cartilage of Human Femoral Heads ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117(2): 196-98.
- Morris, Kirsten J., Gabriella Cs-Szabo, et Ada A. Cole. 2010. « Characterization of TIMP-3 in Human Articular Talar Cartilage ». *Connective Tissue Research* 51(6): 478-90.
- Moses, M. A., J. Sudhalter, et R. Langer. 1990. « Identification of an Inhibitor of Neovascularization from Cartilage ». *Science (New York, N.Y.)* 248(4961): 1408-10.
- Moses, Marsha A., et Robert Langer. 1991. « A Metalloproteinase Inhibitor as an Inhibitor of Neovascularization ». *Journal of Cellular Biochemistry* 47(3): 230-35.

- Moses, Sudhalter, et Langer. 1992. « Isolation and Characterization of an Inhibitor of Neovascularization from Scapular Chondrocytes ». *The Journal of Cell Biology* 119(2): 475-82.
- Mueller, Michael B., et Rocky S. Tuan. 2008. « Functional Characterization of Hypertrophy in Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells ». *Arthritis and Rheumatism* 58(5): 1377-88.
- Murata, Koichi et al. 2012. « Stromal Cell-Derived Factor 1 Regulates the Actin Organization of Chondrocytes and Chondrocyte Hypertrophy ». *PLOS ONE* 7(5): e37163.
- Murata, M., K. Yudoh, et K. Masuko. 2008. « The Potential Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Cartilage: How the Angiogenic Factor Could Be Involved in the Pathogenesis of Osteoarthritis? ». *Osteoarthritis and Cartilage* 16(3): 279-86.
- Muruganandan, Shanmugam, et Christopher J. Sinal. 2014. « The Impact of Bone Marrow Adipocytes on Osteoblast and Osteoclast Differentiation ». *IUBMB Life* 66(3): 147-55.
- Musumeci, Giuseppe et al. 2015. « Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours That Influence Disease Onset and Progression ». *International Journal of Molecular Sciences* 16(3): 6093-6112.
- Musumeci, Giuseppe, Carla Loreto, Maria Luisa Carnazza, et Giuseppa Martinez. 2011. « Characterization of Apoptosis in Articular Cartilage Derived from the Knee Joints of Patients with Osteoarthritis ». *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 19(2): 307-13.
- Nagahashi, Masayuki et al. 2012. « Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis ». *Cancer Research* 72(3): 726-35.
- Nagai, Toshihiro et al. 2014. « Bevacizumab, an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, Inhibits Osteoarthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 16(5). <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-014-0427-y> (21 août 2018).
- Nakamichi, Yuko et al. 2003. « Chondromodulin I Is a Bone Remodeling Factor ». *Molecular and Cellular Biology* 23(2): 636-44.
- Nakamura, Ichiro, Le T. Duong, Sevgi B. Rodan, et Gideon A. Rodan. 2007. « Involvement of Alpha(v)Beta3 Integrins in Osteoclast Function ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 25(6): 337-44.
- Nakashima, Kazuhisa et al. 2002a. « The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation ». *Cell* 108(1): 17-29.
- Nakashima, Tomoki, Mikihiro Hayashi, et Hiroshi Takayanagi. 2012. « New Insights into Osteoclastogenic Signaling Mechanisms ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23(11): 582-90.
- Nampei, Akihide et al. 2004. « Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) Is Highly Expressed in Osteocytes in Human Bone ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 22(3): 176-84.
- Nassiri, Seyed Mahdi, et Reza Rahbarghazi. 2014. « Interactions of Mesenchymal Stem Cells with Endothelial Cells ». *Stem Cells and Development* 23(4): 319-32.

- Neag, Georgiana, Melissa Finlay, et Amy J. Naylor. 2021. « The Cellular Choreography of Osteoblast Angiotropism in Bone Development and Homeostasis ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(14): 7253.
- Nehls, V., et D. Drenckhahn. 1995. « A Novel, Microcarrier-Based in Vitro Assay for Rapid and Reliable Quantification of Three-Dimensional Cell Migration and Angiogenesis ». *Microvascular Research* 50(3): 311-22.
- Nelson, Amanda E. et al. 2011. « Differences in multi-joint radiographic osteoarthritis phenotypes among African Americans and Caucasians: The Johnston County Osteoarthritis Project ». *Arthritis and rheumatism* 63(12): 3843-52.
- Neogi, T. et al. 2009. « Cartilage Loss Occurs in the Same Subregions as Subchondral Bone Attrition: A Within-Knee Subregion-Matched Approach From the Multicenter Osteoarthritis Study ». *Arthritis and rheumatism* 61(11): 1539-44.
- Neve, Anna et al. 2013. « In Vitro and in Vivo Angiogenic Activity of Osteoarthritic and Osteoporotic Osteoblasts Is Modulated by VEGF and Vitamin D3 Treatment ». *Regulatory Peptides* 184: 81-84.
- Nevitt, Michael C., David T. Felson, Elizabeth N. Williams, et Deborah Grady. 2001. « The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The heart and estrogen/progestin replacement study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial - Nevitt - 2001 - Arthritis & Rheumatism - Wiley Online Library ». [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1529-0131\(200104\)44:4%3C811::AID-ANR137%3E3.0.CO%3B2-F](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1529-0131(200104)44:4%3C811::AID-ANR137%3E3.0.CO%3B2-F) (16 juin 2021).
- Nishimori, Makoto et al. 2008. « Articular Cartilage Injury of the Posterior Lateral Tibial Plateau Associated with Acute Anterior Cruciate Ligament Injury ». *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 16(3): 270-74.
- Nör, J. E. et al. 2000. « Thrombospondin-1 Induces Endothelial Cell Apoptosis and Inhibits Angiogenesis by Activating the Caspase Death Pathway ». *Journal of Vascular Research* 37(3): 209-18.
- Oiestad, Britt Elin et al. 2010. « Knee Function and Prevalence of Knee Osteoarthritis after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Prospective Study with 10 to 15 Years of Follow-Up ». *The American Journal of Sports Medicine* 38(11): 2201-10.
- Okazaki, K. et al. 1999. « Expression of Insulin-like Growth Factor I Messenger Ribonucleic Acid in Developing Osteophytes in Murine Experimental Osteoarthritis and in Rats Inoculated with Growth Hormone-Secreting Tumor ». *Endocrinology* 140(10): 4821-30.
- Olivotto, Eleonora et al. 2008. « Differential Requirements for IKKalpha and IKKbeta in the Differentiation of Primary Human Osteoarthritic Chondrocytes ». *Arthritis and Rheumatism* 58(1): 227-39.
- O'Reilly, M. S. et al. 1997. « Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth ». *Cell* 88(2): 277-85.
- Oren, Trevor W. et al. 2011. « Arthroplasty in Veterans: Analysis of Cartilage, Bone, Serum, and Synovial Fluid Reveals Differences and Similarities in Osteoarthritis with and without Comorbid Diabetes ». *Journal of Rehabilitation Research and Development* 48(10): 1195-1210.

- Orfanidou, Timoklia, Dimitrios Iliopoulos, Konstantinos N. Malizos, et Aspasia Tsezou. 2009. « Involvement of SOX-9 and FGF-23 in RUNX-2 Regulation in Osteoarthritic Chondrocytes ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13(9B): 3186-94.
- Paavonen, Karri et al. 2002. « Vascular Endothelial Growth Factors C and D and Their VEGFR-2 and 3 Receptors in Blood and Lymphatic Vessels in Healthy and Arthritic Synovium ». *The Journal of Rheumatology* 29(1): 39-45.
- Palumbo, C. 1986. « A Three-Dimensional Ultrastructural Study of Osteoid-Osteocytes in the Tibia of Chick Embryos ». *Cell and Tissue Research* 246(1): 125-31.
- Pan, Jun et al. 2009. « In Situ Measurement of Transport between Subchondral Bone and Articular Cartilage ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 27(10): 1347-52.
- Pan, Jun et al. 2012. « Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints ». *Bone* 51(2): 212-17.
- Papaioannou, N. A. et al. 2007. « Effect of Calcitonin in Early and Late Stages of Experimentally Induced Osteoarthritis. A Histomorphometric Study ». *Osteoarthritis and Cartilage* 15(4): 386-95.
- Patra, Debabrata, et Linda J. Sandell. 2012. « Antiangiogenic and Anticancer Molecules in Cartilage ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14: e10.
- Pauli, C. et al. 2011. « Macroscopic and Histopathologic Analysis of Human Knee Menisci in Aging and Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 19(9): 1132-41.
- Pearson, Mark J. et al. 2017. « IL-6 Secretion in Osteoarthritis Patients Is Mediated by Chondrocyte-Synovial Fibroblast Cross-Talk and Is Enhanced by Obesity ». *Scientific Reports* 7(1): 3451.
- Pecchi, Emilie et al. 2014. « Induction of Nerve Growth Factor Expression and Release by Mechanical and Inflammatory Stimuli in Chondrocytes: Possible Involvement in Osteoarthritis Pain ». *Arthritis Research & Therapy* 16(1): R16.
- Peng, Yi, Song Wu, Yusheng Li, et Janet L. Crane. 2020. « Type H blood vessels in bone modeling and remodeling ». *Theranostics* 10(1): 426-36.
- Pepper, Ms. 2000. « Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. » *médecine/sciences* 16(12): 1378.
- Perruzzi, Carole A. et al. 2003. « Functional Overlap and Cooperativity among AlphaV and Beta1 Integrin Subfamilies during Skin Angiogenesis ». *The Journal of Investigative Dermatology* 120(6): 1100-1109.
- Pesesse, L. et al. 2013. « Consequences of Chondrocyte Hypertrophy on Osteoarthritic Cartilage: Potential Effect on Angiogenesis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 21(12): 1913-23.
- Pesesse, Laurence, Christelle Sanchez, et Yves Henrotin. 2011. « Osteochondral Plate Angiogenesis: A New Treatment Target in Osteoarthritis ». *Joint Bone Spine* 78(2): 144-49.
- Pfander, D. et al. 2000. « Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 59(6): 448-54.
- Pfander, D, D Kortje, et al. 2001. « Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 60(11): 1070-73.

- Pfander, D., D. Körtje, et al. 2001. « Vascular Endothelial Growth Factor in Articular Cartilage of Healthy and Osteoarthritic Human Knee Joints ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 60(11): 1070-73.
- Phng, L.-K., et Holger Gerhardt. 2009. « Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch ». *Developmental Cell* 16(2): 196-208.
- Plumb, Mandy S, et Richard M Aspden. 2004. « High levels of fat and (n-6) fatty acids in cancellous bone in osteoarthritis ». *Lipids in Health and Disease* 3: 12.
- Poole, C. A., M. H. Flint, et B. W. Beaumont. 1984. « Morphological and Functional Interrelationships of Articular Cartilage Matrices ». *Journal of Anatomy* 138 (Pt 1): 113-38.
- Poole, C. A., A. Matsuoka, et J. R. Schofield. 1991. « Chondrons from Articular Cartilage. III. Morphologic Changes in the Cellular Microenvironment of Chondrons Isolated from Osteoarthritic Cartilage ». *Arthritis and Rheumatism* 34(1): 22-35.
- Pottenger, L. A., F. M. Phillips, et L. F. Draganich. 1990. « The Effect of Marginal Osteophytes on Reduction of Varus-Valgus Instability in Osteoarthritic Knees ». *Arthritis and Rheumatism* 33(6): 853-58.
- Pouders, Caroline et al. 2008. « Prevalence and MRI-Anatomic Correlation of Bone Cysts in Osteoarthritic Knees ». *AJR. American journal of roentgenology* 190(1): 17-21.
- Praillet, C., J. A. Grimaud, et H. Lortat-Jacob. 1998. « Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ? » *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974], 1998, Vol. 14, N° 4; p.412-20.* <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/1056> (25 mai 2020).
- Prasadam, Indira et al. 2010. « Osteoarthritic Cartilage Chondrocytes Alter Subchondral Bone Osteoblast Differentiation via MAPK Signalling Pathway Involving ERK1/2 ». *Bone* 46(1): 226-35.
- Presta, Marco, Eleonora Foglio, Ander Churrua Schuind, et Roberto Ronca. 2018. « Long Pentraxin-3 Modulates the Angiogenic Activity of Fibroblast Growth Factor-2 ». *Frontiers in Immunology* 9: 2327.
- Priam, Sabrina et al. 2013. « Identification of Soluble 14-3-3 ϵ as a Novel Subchondral Bone Mediator Involved in Cartilage Degradation in Osteoarthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 65(7): 1831-42.
- Pritzker, K.P.H. et al. 2006. « Osteoarthritis Cartilage Histopathology: Grading and Staging ». *Osteoarthritis and Cartilage* 14(1): 13-29.
- Pufe, T., W. Petersen, B. Tillmann, et R. Mentlein. 2001. « The Splice Variants VEGF121 and VEGF189 of the Angiogenic Peptide Vascular Endothelial Growth Factor Are Expressed in Osteoarthritic Cartilage ». *Arthritis and Rheumatism* 44(5): 1082-88.
- Pufe, Thomas, Wolf J. Petersen, et al. 2004. « Endostatin/Collagen XVIII--an Inhibitor of Angiogenesis--Is Expressed in Cartilage and Fibrocartilage ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 23(5): 267-76.
- Pufe, Thomas, Viola Harde, et al. 2004. « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Induces Matrix Metalloproteinase Expression in Immortalized Chondrocytes ». *The Journal of Pathology* 202(3): 367-74.

- Pullig, O., G. Weseloh, D. Ronneberger, et al. 2000. « Chondrocyte Differentiation in Human Osteoarthritis: Expression of Osteocalcin in Normal and Osteoarthritic Cartilage and Bone ». *Calcified Tissue International* 67(3): 230-40.
- Pullig, O., G. Weseloh, S. Gauer, et B. Swoboda. 2000. « Osteopontin Is Expressed by Adult Human Osteoarthritic Chondrocytes: Protein and MRNA Analysis of Normal and Osteoarthritic Cartilage ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 19(3): 245-55.
- Qi, Xin et al. 2016. « Exosomes Secreted by Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Repair Critical-Sized Bone Defects through Enhanced Angiogenesis and Osteogenesis in Osteoporotic Rats ». *International Journal of Biological Sciences* 12(7): 836-49.
- Qian, Jia-jia et al. 2021. « Expression of VEGF-A Signaling Pathway in Cartilage of ACLT-induced Osteoarthritis Mouse Model ». *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 16(1): 379.
- Qin, Hanjun et al. 2019. « SDF-1/CXCR4 Axis Coordinates Crosstalk between Subchondral Bone and Articular Cartilage in Osteoarthritis Pathogenesis ». *Bone* 125: 140-50.
- Qin, Hanjun et al. 2021. « Inhibition of SDF-1/CXCR4 Axis to Alleviate Abnormal Bone Formation and Angiogenesis Could Improve the Subchondral Bone Microenvironment in Osteoarthritis ». *BioMed Research International* 2021: 8852574.
- Quan, Gerald M. Y. et al. 2005. « Localization of Pigment Epithelium-Derived Factor in Growing Mouse Bone ». *Calcified Tissue International* 76(2): 146-53.
- Radin, E. L., et R. M. Rose. 1986. « Role of Subchondral Bone in the Initiation and Progression of Cartilage Damage ». *Clinical Orthopaedics and Related Research* (213): 34-40.
- Ramasamy, Saravana K. et al. 2016. « Blood Flow Controls Bone Vascular Function and Osteogenesis ». *Nature Communications* 7(1): 13601.
- Ramasamy, Saravana K., Anjali P. Kusumbe, Lin Wang, et Ralf H. Adams. 2014. « Endothelial Notch Activity Promotes Angiogenesis and Osteogenesis in Bone ». *Nature* 507(7492): 376-80.
- Rannou, François, Jeremy Sellam, et Francis Berenbaum. 2010. « [Pathophysiology of osteoarthritis: updated concepts] ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 39(11): 1159-63.
- Reed, May J. et al. 2003. « Inhibition of TIMP1 Enhances Angiogenesis in Vivo and Cell Migration in Vitro ». *Microvascular Research* 65(1): 9-17.
- Reijman, M. et al. 2007. « Body Mass Index Associated with Onset and Progression of Osteoarthritis of the Knee but Not of the Hip: The Rotterdam Study ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 66(2): 158-62.
- Richmond, Sarah A. et al. 2013. « Are Joint Injury, Sport Activity, Physical Activity, Obesity, or Occupational Activities Predictors for Osteoarthritis? A Systematic Review ». *The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy* 43(8): 515-B19.
- Roberts, Scott J., Nick van Gastel, Geert Carmeliet, et Frank P. Luyten. 2015. « Uncovering the Periosteum for Skeletal Regeneration: The Stem Cell That Lies Beneath ». *Bone* 70: 10-18.
- Roelofs, Anke J. et al. 2020. « Identification of the Skeletal Progenitor Cells Forming Osteophytes in Osteoarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 79(12): 1625-34.

- Roman-Blas, Jorge A, Santos Castañeda, Raquel Largo, et Gabriel Herrero-Beaumont. 2009. « Osteoarthritis associated with estrogen deficiency ». *Arthritis Research & Therapy* 11(5): 241.
- Romeo, Sara G. et al. 2019. « Endothelial Proteolytic Activity and Interaction with Non-Resorbing Osteoclasts Mediate Bone Elongation ». *Nature Cell Biology* 21(4): 430-41.
- Roughley, Peter J, et John S Mort. 2014. « The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage ». *Journal of Experimental Orthopaedics* 1. 10.1186/s40634-014-0008-7 (25 mai 2020).
- Ruhlen, R., et K. Marberry. 2014. « The Chondrocyte Primary Cilium ». *Osteoarthritis and Cartilage* 22(8): 1071-76.
- Rundhaug, Joyce E. 2005. « Matrix Metalloproteinases and Angiogenesis ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9(2): 267-85.
- Rutkovskiy, Arkady, Kåre-Olav Stensløyken, et Ingvar Jarle Vaage. 2016. « Osteoblast Differentiation at a Glance ». *Medical Science Monitor Basic Research* 22: 95-106.
- Ryder, J. J. et al. 2008. « Genetic Associations in Peripheral Joint Osteoarthritis and Spinal Degenerative Disease: A Systematic Review ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 67(5): 584-91.
- Ryu, Jiyeon et al. 2006. « Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast–osteoblast coupling ». *The EMBO Journal* 25(24): 5840-51.
- van Saase, J. L. et al. 1989. « Epidemiology of Osteoarthritis: Zoetermeer Survey. Comparison of Radiological Osteoarthritis in a Dutch Population with That in 10 Other Populations ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 48(4): 271-80.
- Saito, M. et al. 2012. « Angiogenic Activity of Subchondral Bone during the Progression of Osteoarthritis in a Rabbit Anterior Cruciate Ligament Transection Model ». *Osteoarthritis and Cartilage* 20(12): 1574-82.
- Saito, Taku et al. 2010. « Transcriptional Regulation of Endochondral Ossification by HIF-2alpha during Skeletal Growth and Osteoarthritis Development ». *Nature Medicine* 16(6): 678-86.
- Salcedo, R. et al. 1999. « Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells: In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1alpha ». *The American Journal of Pathology* 154(4): 1125-35.
- Salvat, Colette et al. 2005. « Immature Murine Articular Chondrocytes in Primary Culture: A New Tool for Investigating Cartilage ». *Osteoarthritis and Cartilage* 13(3): 243-49.
- Sanchez, C. et al. 2005a. « Osteoblasts from the Sclerotic Subchondral Bone Downregulate Aggrecan but Upregulate Metalloproteinases Expression by Chondrocytes. This Effect Is Mimicked by Interleukin-6, -1beta and Oncostatin M Pre-Treated Non-Sclerotic Osteoblasts ». *Osteoarthritis and Cartilage* 13(11): 979-87.
- Sanchez, C et al. 2005b. « Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes - PubMed ». *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16168681/> (17 août 2021).
- Sanchez, C et al. 2008. « Phenotypic Characterization of Osteoblasts from the Sclerotic Zones of Osteoarthritic Subchondral Bone ». *Arthritis and Rheumatism* 58(2): 442-55.
- Sandell, L. J., et T. Aigner. 2001. « Articular Cartilage and Changes in Arthritis. An Introduction: Cell Biology of Osteoarthritis ». *Arthritis Research* 3(2): 107-13.

- Sandy, J. D., et C. Verscharen. 2001. « Analysis of Aggrecan in Human Knee Cartilage and Synovial Fluid Indicates That Aggrecanase (ADAMTS) Activity Is Responsible for the Catabolic Turnover and Loss of Whole Aggrecan Whereas Other Protease Activity Is Required for C-Terminal Processing in Vivo ». *The Biochemical Journal* 358(Pt 3): 615-26.
- Scanzello, Carla R., et Steven R. Goldring. 2012. « The Role of Synovitis in Osteoarthritis Pathogenesis ». *Bone* 51(2): 249-57.
- Scharstuhl, Alwin et al. 2002. « Inhibition of Endogenous TGF-Beta during Experimental Osteoarthritis Prevents Osteophyte Formation and Impairs Cartilage Repair ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169(1): 507-14.
- Schipani, E. et al. 2001. « Hypoxia in Cartilage: HIF-1alpha Is Essential for Chondrocyte Growth Arrest and Survival ». *Genes & Development* 15(21): 2865-76.
- Schipani, Ernestina, Christa Maes, Geert Carmeliet, et Gregg L. Semenza. 2009. « Regulation of Osteogenesis-Angiogenesis Coupling by HIFs and VEGF ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24(8): 1347-53.
- Schneider, Nicole, Jean-Philippe Lejeune, Ginette Deby-Dupont, et Didier Serteyn. 2007. « Le rôle des synoviocytes dans l'articulation diarthrodiale enflammée ». *Annales de Médecine Vétérinaire* 151. <https://orbi.uliege.be/handle/2268/67678> (12 août 2020).
- Schönherr, E. et al. 1995. « Interaction of Biglycan with Type I Collagen ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(6): 2776-83.
- Schott, Eric M. et al. 2018. « Targeting the Gut Microbiome to Treat the Osteoarthritis of Obesity ». *JCI Insight* 3(8). <https://insight.jci.org/articles/view/95997> (16 juin 2021).
- Schünke, Michael, Erik Schulte, et Udo Schumacher. 2016. *Atlas d'anatomie Prométhée - Anatomie générale et système locomoteur*. Deboeck supérieur.
- Sebastian, Aimy et al. 2021. « Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptomic Heterogeneity and Post-Traumatic Osteoarthritis-Associated Early Molecular Changes in Mouse Articular Chondrocytes ». *Cells* 10(6): 1462.
- Segev, Amit, Nafiseh Nili, et Bradley H Strauss. 2004. « The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis ». *Cardiovascular Research* 63(4): 603-10.
- Sellam, Jérémie et al. 2020. « Recommandations de la Société française de rhumatologie sur la prise en charge pharmacologique de la gonarthrose ». *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/1395824> (16 juin 2021).
- Sellam, Jérémie, et Francis Berenbaum. 2010. « The Role of Synovitis in Pathophysiology and Clinical Symptoms of Osteoarthritis ». *Nature Reviews. Rheumatology* 6(11): 625-35.
- Sellam, Jérémie, et Francis Berenbaum. 2011. « [Arthrosis] ». *La Revue Du Praticien* 61(5): 675-85; quiz 686.
- Senger, Donald R., et George E. Davis. 2011. « Angiogenesis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(8): a005090.
- Shakibaei, M. et al. 2003. « Expression of the VEGF Receptor-3 in Osteoarthritic Chondrocytes: Stimulation by Interleukin-1 Beta and Association with Beta 1-Integrins ». *Histochemistry and Cell Biology* 120(3): 235-41.

- Sharif, Mohammed et al. 2004. « Increased Apoptosis in Human Osteoarthritic Cartilage Corresponds to Reduced Cell Density and Expression of Caspase-3 ». *Arthritis and Rheumatism* 50(2): 507-15.
- Sharma, Leena et al. 2010. « Varus and Valgus Alignment and Incident and Progressive Knee Osteoarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 69(11): 1940-45.
- Shelbourne, K. D., et K. C. Stube. 1997. « Anterior Cruciate Ligament (ACL)-Deficient Knee with Degenerative Arthrosis: Treatment with an Isolated Autogenous Patellar Tendon ACL Reconstruction ». *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 5(3): 150-56.
- Shepherd, D. E., et B. B. Seedhom. 1999. « Thickness of Human Articular Cartilage in Joints of the Lower Limb ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 58(1): 27-34.
- Shibakawa, A. et al. 2005. « The Role of Subchondral Bone Resorption Pits in Osteoarthritis: MMP Production by Cells Derived from Bone Marrow ». *Osteoarthritis and Cartilage* 13(8): 679-87.
- Shikichi, M. et al. 1999. « Three-Dimensional Ultrastructure of Synoviocytes in the Horse Joint as Revealed by the Scanning Electron Microscope ». *Archives of Histology and Cytology* 62(3): 219-29.
- Shimomura, Y., T. Yoneda, et F. Suzuki. 1975. « Osteogenesis by Chondrocytes from Growth Cartilage of Rat Rib ». *Calcified Tissue Research* 19(3): 179-87.
- Shin, Eunah, et Ja Seung Koo. 2020. « The Role of Adipokines and Bone Marrow Adipocytes in Breast Cancer Bone Metastasis ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(14): 4967.
- Short, S. M., G. A. Talbott, et R. L. Juliano. 1998. « Integrin-Mediated Signaling Events in Human Endothelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 9(8): 1969-80.
- Showery, James E. et al. 2016. « The Rising Incidence of Degenerative and Posttraumatic Osteoarthritis of the Knee in the United States Military ». *The Journal of Arthroplasty* 31(10): 2108-14.
- Shukunami, C. et al. 1997. « Cellular Hypertrophy and Calcification of Embryonal Carcinoma-Derived Chondrogenic Cell Line ATDC5 in Vitro ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12(8): 1174-88.
- Shukunami, C., K. Iyama, H. Inoue, et Y. Hiraki. 1999. « Spatiotemporal Pattern of the Mouse Chondromodulin-I Gene Expression and Its Regulatory Role in Vascular Invasion into Cartilage during Endochondral Bone Formation ». *The International Journal of Developmental Biology* 43(1): 39-49.
- Sims, Natalie A., et T. John Martin. 2014. « Coupling the Activities of Bone Formation and Resorption: A Multitude of Signals within the Basic Multicellular Unit ». *BoneKEy Reports* 3: 481.
- Singh, Purva, Kenneth B. Marcu, Mary B. Goldring, et Miguel Otero. 2019. « Phenotypic Instability of Chondrocytes in Osteoarthritis: On a Path to Hypertrophy ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1442(1): 17-34.
- Sivan, Unnikrishnan, Jessica De Angelis, et Anjali P. Kusumbe. « Role of angiocrine signals in bone development, homeostasis and disease ». *Open Biology* 9(10): 190144.
- Skawina, A., J. A. Litwin, J. Gorczyca, et A. J. Miodoński. 1994. « Blood Vessels in Epiphyseal Cartilage of Human Fetal Femoral Bone: A Scanning Electron Microscopic Study of Corrosion Casts ». *Anatomy and Embryology* 189(5): 457-62.

- Slauterbeck, James R. et al. 2009. « Geographic Mapping of Meniscus and Cartilage Lesions Associated with Anterior Cruciate Ligament Injuries ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 91(9): 2094-2103.
- Smith, James O., Richard O. C. Oreffo, Nicholas M. P. Clarke, et Helmut I. Roach. 2003. « Changes in the Antiangiogenic Properties of Articular Cartilage in Osteoarthritis ». *Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association* 8(6): 849-57.
- Smits, P. et al. 2001. « The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 Are Essential for Cartilage Formation ». *Developmental Cell* 1(2): 277-90.
- Sniekers, Yvonne H. et al. 2008. « A Role for Subchondral Bone Changes in the Process of Osteoarthritis; a Micro-CT Study of Two Canine Models ». *BMC musculoskeletal disorders* 9: 20.
- Sokoloff, L. 1993. « Microcracks in the Calcified Layer of Articular Cartilage ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117(2): 191-95.
- Sophia Fox, Alice J., Asheesh Bedi, et Scott A. Rodeo. 2009. « The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function ». *Sports Health* 1(6): 461-68.
- Spector, T. D. et al. 1996. « Genetic Influences on Osteoarthritis in Women: A Twin Study ». *BMJ (Clinical research ed.)* 312(7036): 940-43.
- Srikanth, Velandai K. et al. 2005. « A Meta-Analysis of Sex Differences Prevalence, Incidence and Severity of Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 13(9): 769-81.
- Staines, K. A. et al. 2016. « Endochondral Growth Defect and Deployment of Transient Chondrocyte Behaviors Underlie Osteoarthritis Onset in a Natural Murine Model ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68(4): 880-91.
- Steenvoorden, Marjan M. C. et al. 2006. « Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products in Osteoarthritis Leads to Increased Stimulation of Chondrocytes and Synoviocytes ». *Arthritis and Rheumatism* 54(1): 253-63.
- Strasser, Geraldine A., Joshua S. Kaminker, et Marc Tessier-Lavigne. 2010. « Microarray Analysis of Retinal Endothelial Tip Cells Identifies CXCR4 as a Mediator of Tip Cell Morphology and Branching ». *Blood* 115(24): 5102-10.
- Stryker, Zachary I., Mehdi Rajabi, Paul J. Davis, et Shaker A. Mousa. 2019. « Evaluation of Angiogenesis Assays ». *Biomedicines* 7(2): 37.
- Styrkarsdottir, Unnur et al. 2017. « Whole-Genome Sequencing Identifies Rare Genotypes in COMP and CHADL Associated with High Risk of Hip Osteoarthritis ». *Nature Genetics* 49(5): 801-5.
- Su, Weiping et al. 2020. « Angiogenesis Stimulated by Elevated PDGF-BB in Subchondral Bone Contributes to Osteoarthritis Development ». *JCI Insight* 5(8). <https://insight.jci.org/articles/view/135446> (4 septembre 2021).
- Suda, T. et al. 1999. « Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families ». *Endocrine Reviews* 20(3): 345-57.
- Sun, Lin, Xiuli Wang, et David L. Kaplan. 2011. « A 3D Cartilage - Inflammatory Cell Culture System for the Modeling of Human Osteoarthritis ». *Biomaterials* 32(24): 5581-89.

- Suri, S. et al. 2007. « Neurovascular Invasion at the Osteochondral Junction and in Osteophytes in Osteoarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 66(11): 1423-28.
- Takahashi, Naoyuki, Nobuyuki Udagawa, Naoyuki Udagawa, et Tatsuo Suda. 2014. « Vitamin D Endocrine System and Osteoclasts ». *BoneKEy Reports* 3: 495.
- Takahashi, Tsuguharu et al. 2007. « Three-Dimensional Microenvironments Retain Chondrocyte Phenotypes During Proliferation Culture ». *Tissue Engineering* 13(7): 1583-92.
- Takarada, Takeshi et al. 2013. « An Analysis of Skeletal Development in Osteoblast-Specific and Chondrocyte-Specific Runt-Related Transcription Factor-2 (Runx2) Knockout Mice ». *Journal of bone and mineral research* 28(10): 2064-69.
- Takarada, Takeshi et al. 2016. « Genetic Analysis of Runx2 Function during Intramembranous Ossification ». *Development (Cambridge, England)* 143(2): 211-18.
- Taljanovic, Mihra S. et al. 2008. « Bone Marrow Edema Pattern in Advanced Hip Osteoarthritis: Quantitative Assessment with Magnetic Resonance Imaging and Correlation with Clinical Examination, Radiographic Findings, and Histopathology ». *Skeletal Radiology* 37(5): 423-31.
- Tanaka, Eiji et al. 2005. « Vascular Endothelial Growth Factor Plays an Important Autocrine/Paracrine Role in the Progression of Osteoarthritis ». *Histochemistry and Cell Biology* 123(3): 275-81.
- Taniguchi, Noboru et al. 2007. « Stage-Specific Secretion of HMGB1 in Cartilage Regulates Endochondral Ossification ». *Molecular and Cellular Biology* 27(16): 5650-63.
- Tchetina, Elena V., Ginette Squires, et A. Robin Poole. 2005. « Increased Type II Collagen Degradation and Very Early Focal Cartilage Degeneration Is Associated with Upregulation of Chondrocyte Differentiation Related Genes in Early Human Articular Cartilage Lesions ». *The Journal of Rheumatology* 32(5): 876-86.
- Thomas, Martin, et Lafage-Proust. 2008. « Physiologie du tissu osseux ». *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/69321/physiologie-du-tissu-osseux> (12 août 2020).
- Thomas, Nathan et al. 2015. « Attenuation of Cartilage Pathogenesis in Post-traumatic Osteoarthritis in Mice by blocking the Stromal Derived Factor 1 Receptor (CXCR4) with the specific inhibitor, AMD3100 ». *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 33(7): 1071-78.
- Thoms, Brendan L., Katarzyna A. Dudek, Jérôme E. Lafont, et Christopher L. Murphy. 2013. « Hypoxia Promotes the Production and Inhibits the Destruction of Human Articular Cartilage ». *Arthritis and Rheumatism* 65(5): 1302-12.
- Thorpe, S. D. et al. 2016. « Changes in Chondrocyte Primary Cilia Structure and Function Are Associated with Altered Mechanoregulation in Alkaptonuria ». *Osteoarthritis and Cartilage* 24: S174-75.
- Tooney, P. A. et al. 1998. « Restricted Localization of Thrombospondin-2 Protein during Mouse Embryogenesis: A Comparison to Thrombospondin-1 ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 17(2): 131-43.
- Toyosawa, S. et al. 2001. « Dentin Matrix Protein 1 Is Predominantly Expressed in Chicken and Rat Osteocytes But Not in Osteoblasts ». *Journal of Bone and Mineral Research* 16(11): 2017-26.
- Treps, Lucas, et Julie Gavard. 2015. « L'angiogenèse tumorale - Quand l'arbre de vie tourne mal ». *médecine/sciences* 31(11): 989-95.

- Trueta, J., et M. H. Harrison. 1953. « The Normal Vascular Anatomy of the Femoral Head in Adult Man ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 35-B(3): 442-61.
- Trueta, J., et J. D. Morgan. 1960. « The Vascular Contribution to Osteogenesis. I. Studies by the Injection Method ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 42-B: 97-109.
- Twal, W. O., R. Vasilatos-Younken, C. V. Gay, et R. M. Leach. 1994. « Isolation and Localization of Basic Fibroblast Growth Factor-Immunoreactive Substance in the Epiphyseal Growth Plate ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9(11): 1737-44.
- Uchino, M. et al. 2000. « Growth Factor Expression in the Osteophytes of the Human Femoral Head in Osteoarthritis ». *Clinical Orthopaedics and Related Research* (377): 119-25.
- Upton, Angus R., Christopher A. Holding, Anak A. S. S. K. Dharmapatni, et David R. Haynes. 2012. « The Expression of RANKL and OPG in the Various Grades of Osteoarthritic Cartilage ». *Rheumatology International* 32(2): 535-40.
- Ushiyama, T, T Chano, K Inoue, et Y Matsusue. 2003. « Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 62(2): 108-12.
- Vaamonde-Garcia, Carlos et al. 2017. « The Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor/Heme Oxygenase-1 Axis Is Critical for the Inflammatory Features of Type 2 Diabetes-Associated Osteoarthritis ». *The Journal of Biological Chemistry* 292(35): 14505-15.
- Vadalà, G. et al. 2014. « Vegf-signaling inhibition as a target of osteoarthritis treatment: an in vivo study on osteoarthritis rabbit model ». *Orthopaedic Proceedings* 96-B(SUPP_11): 340-340.
- Valdes, Ana M., et Timothy D. Spector. 2009. « The Contribution of Genes to Osteoarthritis ». *The Medical Clinics of North America* 93(1): 45-66, x.
- Venkatesan, Narayanan et al. 2005. « Stimulation de la biosynthèse des protéoglycanes : une nouvelle stratégie pour la réparation du cartilage articulaire ». *médecine/sciences* 21(5): 471-73.
- Verborgt, O., G. J. Gibson, et M. B. Schaffler. 2000. « Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodeling after Fatigue in Vivo ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15(1): 60-67.
- Verzijl, Nicole et al. 2002. « 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 and Rheumatism* 46(1): 114-23.
- Vincent, T. L. et al. 2007. « FGF-2 Is Bound to Perlecan in the Pericellular Matrix of Articular Cartilage, Where It Acts as a Chondrocyte Mechanotransducer ». *Osteoarthritis and Cartilage* 15(7): 752-63.
- Vincenti, Matthew P., et Constance E. Brinckerhoff. 2002. « Transcriptional Regulation of Collagenase (MMP-1, MMP-13) Genes in Arthritis: Integration of Complex Signaling Pathways for the Recruitment of Gene-Specific Transcription Factors ». *Arthritis Research* 4(3): 157-64.
- Volpert, O. V. et al. 1995. « Inhibition of Angiogenesis by Thrombospondin-2 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217(1): 326-32.

- Wachsmuth, L. et al. 2006. « Immunolocalization of Matrix Proteins in Different Human Cartilage Subtypes ». *Histology and Histopathology* 21(5): 477-85.
- Walsh, D. A. et al. 2007a. « Angiogenesis in the Synovium and at the Osteochondral Junction in Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 15(7): 743-51.
- Walsh, D. A. et al. 2010. « Angiogenesis and Nerve Growth Factor at the Osteochondral Junction in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis ». *Rheumatology* 49(10): 1852-61.
- Walsh, D.A. et al. 2007b. « Angiogenesis in the Synovium and at the Osteochondral Junction in Osteoarthritis ». *Osteoarthritis and Cartilage* 15(7): 743-51.
- Walzer, Sonja M et al. 2014. « Vascularization of primary and secondary ossification centres in the human growth plate ». *BMC Developmental Biology* 14: 36.
- Wang, Baoli et al. 2015. « Chondrocytes-Specific Expression of Osteoprotegerin Modulates Osteoclast Formation in Metaphyseal Bone ». *Scientific Reports* 5(1): 13667.
- Wang, G. L., et G. L. Semenza. 1995. « Purification and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor 1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(3): 1230-37.
- Wang, Guoyan et al. 2004. « RhoA/ROCK Signaling Suppresses Hypertrophic Chondrocyte Differentiation * ». *Journal of Biological Chemistry* 279(13): 13205-14.
- Wang, Kun et al. 2017. « T140 blocks the SDF-1/CXCR4 signaling pathway and prevents cartilage degeneration in an osteoarthritis disease model ». *PLoS ONE* 12(4): e0176048.
- Wang, Meina et al. 2013. « MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis | Arthritis Research & Therapy | Full Text ». *Arthritis Res Ther* 15. <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4133> (13 juillet 2021).
- Wang, Xibin et al. 2004. « Regulation of MMP-13 Expression by RUNX2 and FGF2 in Osteoarthritic Cartilage ». *Osteoarthritis and Cartilage* 12(12): 963-73.
- Wang, Ying et al. 2007. « The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development ». *Journal of Clinical Investigation* 117(6): 1616-26.
- Wang, Yu-Han et al. 2020. « Apelin Affects the Progression of Osteoarthritis by Regulating VEGF-Dependent Angiogenesis and MiR-150-5p Expression in Human Synovial Fibroblasts ». *Cells* 9(3): E594.
- Wang, Yuze et al. 2013. « Nutrition and Degeneration of Articular Cartilage ». *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA* 21(8): 1751-62.
- Wang, Zhepeng et al. 2010. « Type IIB Procollagen NH2-propeptide Induces Death of Tumor Cells via Interaction with Integrins $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(27): 20806-17.
- Watt, Suzanne M. et al. 2013. « The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential ». *British Medical Bulletin* 108(1): 25-53.
- Wei, F. et al. 2012. « Activation of Indian Hedgehog Promotes Chondrocyte Hypertrophy and Upregulation of MMP-13 in Human Osteoarthritic Cartilage ». *Osteoarthritis and Cartilage* 20(7): 755-63.

- Wei, Fangyuan et al. 2012. « Attenuation of Osteoarthritis via Blockade of the SDF-1/CXCR4 Signaling Pathway ». *Arthritis Research & Therapy* 14(4): R177.
- Wei, Lei et al. 2006. « Chondrocyte Death Induced by Pathological Concentration of Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1 ». *The Journal of Rheumatology* 33(9): 1818-26.
- Wei, Lei et al. 2010. « Stimulation of Chondrocyte Hypertrophy by Chemokine Stromal Cell-Derived Factor 1 in the Chondro-Osseous Junction during Endochondral Bone Formation ». *Developmental Biology* 341(1): 236-45.
- Westacott, C. I. et al. 1997. « Alteration of Cartilage Metabolism by Cells from Osteoarthritic Bone ». *Arthritis and Rheumatism* 40(7): 1282-91.
- Wilusz, Rebecca E., Johannah Sanchez-Adams, et Farshid Guilak. 2014. « The Structure and Function of the Pericellular Matrix of Articular Cartilage ». *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 0: 25-32.
- Wright, Lorinda M. et al. 2005. « Stromal Cell-Derived Factor-1 Binding to Its Chemokine Receptor CXCR4 on Precursor Cells Promotes the Chemotactic Recruitment, Development and Survival of Human Osteoclasts ». *Bone* 36(5): 840-53.
- Wu, Jianbo et al. 2015. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Inhibits Angiogenic Signaling by Uncoupling Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2-AV β 3 Integrin Cross Talk ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35(1): 111-20.
- Wu, L. N., G. R. Sauer, B. R. Genge, et R. E. Wuthier. 1989. « Induction of Mineral Deposition by Primary Cultures of Chicken Growth Plate Chondrocytes in Ascorbate-Containing Media. Evidence of an Association between Matrix Vesicles and Collagen ». *The Journal of Biological Chemistry* 264(35): 21346-55.
- Xie, Hui et al. 2014. « PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces CD31hiEmcnhi vessel subtype in coupling osteogenesis ». *Nature medicine* 20(11): 1270-78.
- Xu, Qin, Xue-cheng Sun, Xiao-peng Shang, et Hou-sen Jiang. 2012. « Association of CXCL12 Levels in Synovial Fluid with the Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis ». *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 60(6): 898-901.
- Yahara, Yasuhito et al. 2016. « Pterostatin Prevents Chondrocyte Hypertrophy and Osteoarthritis in Mice by Inhibiting SIK3 ». *Nature Communications* 7(1): 10959.
- Yang, Siyoung et al. 2010. « Hypoxia-Inducible Factor-2alpha Is a Catabolic Regulator of Osteoarthritic Cartilage Destruction ». *Nature Medicine* 16(6): 687-93.
- Yang, Yan-Qi et al. 2012. « The role of vascular endothelial growth factor in ossification ». *International Journal of Oral Science* 4(2): 64-68.
- Yin, Jianhua, Yang Xia, et Mei Lu. 2012. « Concentration Profiles of Collagen and Proteoglycan in Articular Cartilage by Fourier Transform Infrared Imaging and Principal Component Regression ». *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 88: 90-96.
- Yoshida, Carolina A. et al. 2004. « Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog ». *Genes & Development* 18(8): 952-63.

- Yu, Xuefeng, Yuefang Huang, Patricia Collin-Osdoby, et Philip Osdoby. 2003. « Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) Recruits Osteoclast Precursors by Inducing Chemotaxis, Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Activity, and Collagen Transmigration ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18(8): 1404-18.
- Yuan, Quan, Li Sun, Jian-Jun Li, et Chun-Hou An. 2014. « Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis ». *BMC Musculoskeletal Disorders* 15: 437.
- Yusuf, Erlangga et al. 2010. « Association between Weight or Body Mass Index and Hand Osteoarthritis: A Systematic Review ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 69(4): 761-65.
- Zanetti, Marco, Elisabeth Bruder, José Romero, et Juerg Hodler. 2000. « Bone Marrow Edema Pattern in Osteoarthritic Knees: Correlation between MR Imaging and Histologic Findings ». *Radiology* 215(3): 835-40.
- Zannettino, Andrew C. W. et al. 2005. « Elevated Serum Levels of Stromal-Derived Factor-1alpha Are Associated with Increased Osteoclast Activity and Osteolytic Bone Disease in Multiple Myeloma Patients ». *Cancer Research* 65(5): 1700-1709.
- Zapata-Linares, Natalia, Florent Eymard, Francis Berenbaum, et Xavier Houard. 2021. « Role of Adipose Tissues in Osteoarthritis ». *Current Opinion in Rheumatology* 33(1): 84-93.
- Zelzer, Elazar et al. 2002. « Skeletal Defects in VEGF(120/120) Mice Reveal Multiple Roles for VEGF in Skeletogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 129(8): 1893-1904.
- Zhang, M. et al. 2009. « IGF-1 Regulation of Type II Collagen and MMP-13 Expression in Rat Endplate Chondrocytes via Distinct Signaling Pathways ». *Osteoarthritis and Cartilage* 17(1): 100-106.
- Zhang, R.-K. et al. 2018. « Mechanical Stress Contributes to Osteoarthritis Development through the Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-B1) ». *Bone & Joint Research* 7(11): 587-94.
- Zhang, X. et al. 2016. « Chondromodulin-1 Ameliorates Osteoarthritis Progression by Inhibiting HIF-2 α Activity ». *Osteoarthritis and Cartilage* 24(11): 1970-80.
- Zhang, Xufang, Ross Crawford, et Yin Xiao. 2016. « Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor with ShRNA in Chondrocytes Ameliorates Osteoarthritis ». *Journal of Molecular Medicine* 94(7): 787-98.
- Zhang, Ying et al. 2012. « Analysis of the Mineral Composition of the Human Calcified Cartilage Zone ». *International Journal of Medical Sciences* 9(5): 353-60.
- Zhao, Like, Qian Wang, Chunmei Zhang, et Cibo Huang. 2017. « Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Articular Chondrocytes Identifies TRAF1, CTGF, and CX3CL1 Genes as Hypomethylated in Osteoarthritis ». *Clinical Rheumatology* 36(10): 2335-42.
- Zhen, Gehua et al. 2013. « Inhibition of TGF- β signaling in subchondral bone mesenchymal stem cells attenuates osteoarthritis ». *Nature medicine* 19(6): 704-12.
- Zheng, Hao, Guosheng Fu, Tao Dai, et He Huang. 2007. « Migration of Endothelial Progenitor Cells Mediated by Stromal Cell-Derived Factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/ENOS Signal Transduction Pathway ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 50(3): 274-80.

- Zhou, Jingming et al. 2014. « Disrupting the Indian Hedgehog Signaling Pathway in Vivo Attenuates Surgically Induced Osteoarthritis Progression in Col2a1-CreERT2; Ihhf1/F1 Mice ». *Arthritis Research & Therapy* 16(1): R11.
- Zhou, Shengda, Zhanfeng Cui, et Jill P. G. Urban. 2004. « Factors Influencing the Oxygen Concentration Gradient from the Synovial Surface of Articular Cartilage to the Cartilage-Bone Interface: A Modeling Study ». *Arthritis and Rheumatism* 50(12): 3915-24.
- Zhu, Mei et al. 2008. « Inhibition of Beta-Catenin Signaling in Articular Chondrocytes Results in Articular Cartilage Destruction ». *Arthritis and Rheumatism* 58(7): 2053-64.
- Zhu, Mei et al. 2009. « Activation of Beta-Catenin Signaling in Articular Chondrocytes Leads to Osteoarthritis-like Phenotype in Adult Beta-Catenin Conditional Activation Mice ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24(1): 12-21.
- Zovein, Ann C. et al. 2010. « Beta1 Integrin Establishes Endothelial Cell Polarity and Arteriolar Lumen Formation via a Par3-Dependent Mechanism ». *Developmental Cell* 18(1): 39-51.
- Zuscik, Michael J. et al. 2008. « Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress ». *The Journal of Clinical Investigation* 118(2): 429-38.

ANNEXE

Osteoarthritis and Cartilage



The differentiation of prehypertrophic into hypertrophic chondrocytes drives an OA-remodeling program and IL-34 expression



S. van Eegher[†], M.-L. Perez-Lozano[†], I. Toillon[†], D. Valour[‡], A. Pigenet[†], D. Citadelle[†], C. Bourrier[‡], S. Courtade-Gaïani[‡], L. Grégoire[§], D. Cléret^{||}, S. Malbos[†], G. Nourissat^{†||}, A. Sautet[#], M.-H. Lafage-Proust^{||}, P. Pastoureau[‡], G. Rolland-Valognes[‡], F. De Ceuninck[‡], F. Berenbaum^{††*}, X. Houard[†]

[†] Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012, Paris, France

[‡] Servier Research Institute, F-78290, Croissy-sur-Seine, France

[§] Soladis, 94 Rue Saint-Lazare, F-75009, Paris, France

^{||} Université de Lyon - Université Jean Monnet, INSERM U1059, Faculté de Médecine, F-42270, Saint-Priest en Jarez, France

[¶] Clinique Maussins-Nollet, Ramsay Générale de Santé, F-75019, Paris, France

[#] Department of Orthopaedic Surgery and Traumatology, APHP Saint-Antoine Hospital, F-75012, Paris, France

^{††} Sorbonne Université, INSERM CRSA, AP-HP Hôpital Saint Antoine, Paris

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2019

Accepted 8 October 2020

Keywords:

Osteoarthritis

Prehypertrophic chondrocytes

Osteochondral junction

Chondrocyte hypertrophic differentiation

IL-34

SUMMARY

Objectives: We hypothesize that chondrocytes from the deepest articular cartilage layer are pivotal in maintaining cartilage integrity and that the modification of their prehypertrophic phenotype to a hypertrophic phenotype will drive cartilage degradation in osteoarthritis.

Design: Murine immature articular chondrocytes (iMACs) were successively cultured into three different culture media to induce a progressive hypertrophic differentiation. Chondrocytes were phenotypically characterized by whole-genome microarray analysis. The expression of IL-34 and its receptors PTPRZ1 and CSF1R in chondrocytes and in human osteoarthritis tissues was assessed by RT-qPCR, ELISA and immunohistochemistry. The expression of bone remodeling and angiogenesis factors and the cell response to IL-1 β and IL-34 were investigated by RT-qPCR and ELISA.

Results: Whole-genome microarray analysis showed that iMACs, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes each displayed a specific phenotype. IL-1 β induced a stronger catabolic effect in prehypertrophic chondrocytes than in iMACs. Hypertrophic differentiation of prehypertrophic chondrocytes increased Bmp-2 (95%CI [0.78; 1.98]), Bmp-4 (95%CI [0.89; 1.59]), Cxcl12 (95%CI [2.19; 5.41]), CCL2 (95%CI [3.59; 11.86]), Mmp 3 (95%CI [10.29; 32.14]) and Vegf mRNA expression (95%CI [0.20; 1.74]). Microarray analysis identified IL-34, PTPRZ1 and CSF1R as being strongly overexpressed in hypertrophic chondrocytes. IL-34 was released by human osteoarthritis cartilage; its receptors were expressed in human osteoarthritis tissues. IL-34 stimulated CCL2 and MMP13 in osteoblasts and hypertrophic chondrocytes but not in iMACs or prehypertrophic chondrocytes.

Conclusion: Our results identify prehypertrophic chondrocytes as being potentially pivotal in the control of cartilage and subchondral bone integrity. Their differentiation into hypertrophic chondrocytes initiates a remodeling program in which IL-34 may be involved.

© 2020 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Address correspondence and reprint requests to: F. Berenbaum, Centre de Recherche Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012, Paris, France.

E-mail address: francis.berenbaum@aphp.fr (F. Berenbaum).

Introduction

Osteoarthritis (OA) is characterized by the irreversible degradation of cartilage, which is associated with a pathological remodeling of the subchondral bone, including sclerosis and osteophyte formation. Cartilage degradation mainly results from the proteolysis of the cartilage extracellular matrix by chondrocyte-

secreted proteases¹. The degradation observed in the deep zone of articular cartilage is explained by an endochondral ossification-like process at the cartilage/bone interface^{2–4}, which involves the hypertrophic differentiation of chondrocytes, the calcification and the vascularization of the extracellular matrix followed by the replacement of cartilage with bone.

While chondrocytes are the unique cell type present within cartilage, different chondrocyte phenotypes exist, depending on the type of cartilage and on the chondrocyte localization within cartilage. Articular cartilage is organized in different layers from the surface until the subchondral bone. The phenotype of chondrocytes differs upon the layer considered⁵. Chondrocytes from the deepest articular cartilage layer of non-calcified cartilage display an intermediate phenotype between that of the chondrocytes of the surface layers and that of the chondrocytes found in the calcified cartilage, which are hypertrophic. They indeed express molecules that characterize both surface layer chondrocytes and hypertrophic chondrocytes, including type II and type X collagens^{6–8}. They also express *Ihh* and *osteomodulin* as prehypertrophic chondrocytes from the growth plate cartilage^{9–12}.

Cartilage degradation in OA results in chondrocyte phenotypic modifications. We hypothesize that the chondrocytes from the deepest articular cartilage layer play a crucial role in maintaining cartilage integrity and that the modification of their prehypertrophic phenotype to a hypertrophic phenotype will drive cartilage degradation in OA. In the present study, we developed a model of progressive differentiation of murine immature articular chondrocytes (iMACs) into hypertrophic chondrocytes, and this model includes an intermediate prehypertrophic state. Here, we show that the differentiation of prehypertrophic chondrocytes into hypertrophic chondrocytes shifts chondrocytes towards an OA-inducing phenotype. This phenotype is associated with an increased expression of IL-34, a recently discovered cytokine that could be involved in both cartilage and bone integrity.

Materials and methods

See supplementary information for detailed Material and methods.

Collection of osteoarthritis human samples

Human OA knee explants (n = 33) obtained from patients undergoing total knee joint replacement surgery were dissected, as described¹³.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed with a mouse monoclonal antibody against PTPRZ1 (clone 12/RPTPb, BD Transduction Laboratories; dilution 1:50) and a rabbit polyclonal antibody against CSF-1R (H-300, Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:50) as the primary antibodies. The R.T.U. Vectastain kit (Vector) was used for detection, followed by counterstaining with Mayer's hematoxylin. Irrelevant control antibodies (Dako) were incubated at the same concentration to assess nonspecific staining.

Primary culture of murine osteoblasts and articular chondrocytes

Osteoblasts and iMACs were isolated and cultured, as described in^{14–16} and supplementary information. Prehypertrophic chondrocytes were obtained by culturing iMACs for 28 days in culture medium 2 (DMEM/HAM-F12 medium supplemented with fetal calf serum (5%), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), L-glutamine (4 mM), ascorbic acid (40 µg/mL), insulin-transferrin-

sodium selenite (1%) and triiodo-L-thyronine (50 ng/mL)). Chondrocytes were further cultured for 42 days in medium 2 supplemented with β-glycerophosphate (10 mM), retinoic acid (100 nM) and 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (10 nM) (Medium 3) to obtain hypertrophic chondrocytes. All cultures were performed in standard conditions with the exception of the last differentiation step, performed in 3% CO₂/95% air. At the end of the culture, cells were serum-starved for 24 h and stimulated by recombinant human IL-1β (1 ng/mL) or murine IL-34 (3, 30 and 100 ng/mL) for 24 h. Conditioned media were kept, centrifuged and stored at –20°C. Cells were either fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) or used for mRNA or protein extraction.

The experimental design for the cell culture study is shown in Fig. S1.

Primary culture of human articular chondrocytes

Human chondrocytes were isolated from the less damaged areas of OA cartilage from patients who underwent total knee arthroplasty. Their hypertrophic differentiation was performed according to Yahara *et al.*¹⁷.

Microarray analysis

mRNA expression profiling was performed using SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 8 × 60 K Microarray (G4852B, Agilent Technologies) and SurePrint Mouse miRNA Microarray Kit v21 8 × 60 K (G4859C, Agilent Technologies). For mRNA profiling, probe labeling and 60 mer-oligonucleotide microarray hybridization were performed according to the manufacturer's instructions¹⁸. An Agilent scanner and Feature Extraction 11.5.1.1 software (Agilent Technologies) were used to obtain the raw microarray data for both analyses.

Statistical analysis

We used repeated measures one-way ANOVA to compare iMACs, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. Paired *t*-tests were used to compare prehypertrophic to hypertrophic chondrocyte gene expression observations and gene or protein comparison in OA patients. For the IL-1β and IL-34 stimulation study, we used Dunnett's *post hoc* test. The analyses were performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Model of the progressive differentiation of murine immature articular chondrocytes into prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes

To study the consequences of the hypertrophic differentiation of chondrocytes in OA cartilage, we established an *in vitro* model of the progressive differentiation of iMACs into prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. iMACs displayed the typical phenotype of articular chondrocytes, characterized by the expression of *Col2a1*, *Acan*, *Chm1* and *Sox9* and by the almost complete absence of the expression of the hypertrophic chondrocyte markers *Runx2*, *Osterix*, *MMP-13*, *Col10a1* and *Tnap* (n = 6) (Fig. 1(B)–(E) and I–M). iMACs also showed weak alkaline phosphatase activity and no evidence of matrix calcification (Fig. 1O and P). Culturing the iMACs in Medium 2 then in Medium 3 induced progressive decreases in the mRNA expression of *Acan*, *Col2a1*, *Sox9* and *Chm1* [Fig. 1(B)–(E)]. Inversely, the mRNA expression of the hypertrophic markers *Runx2*, *Osterix*, *Mmp13*, *osteocalcin* and *Tnap* was

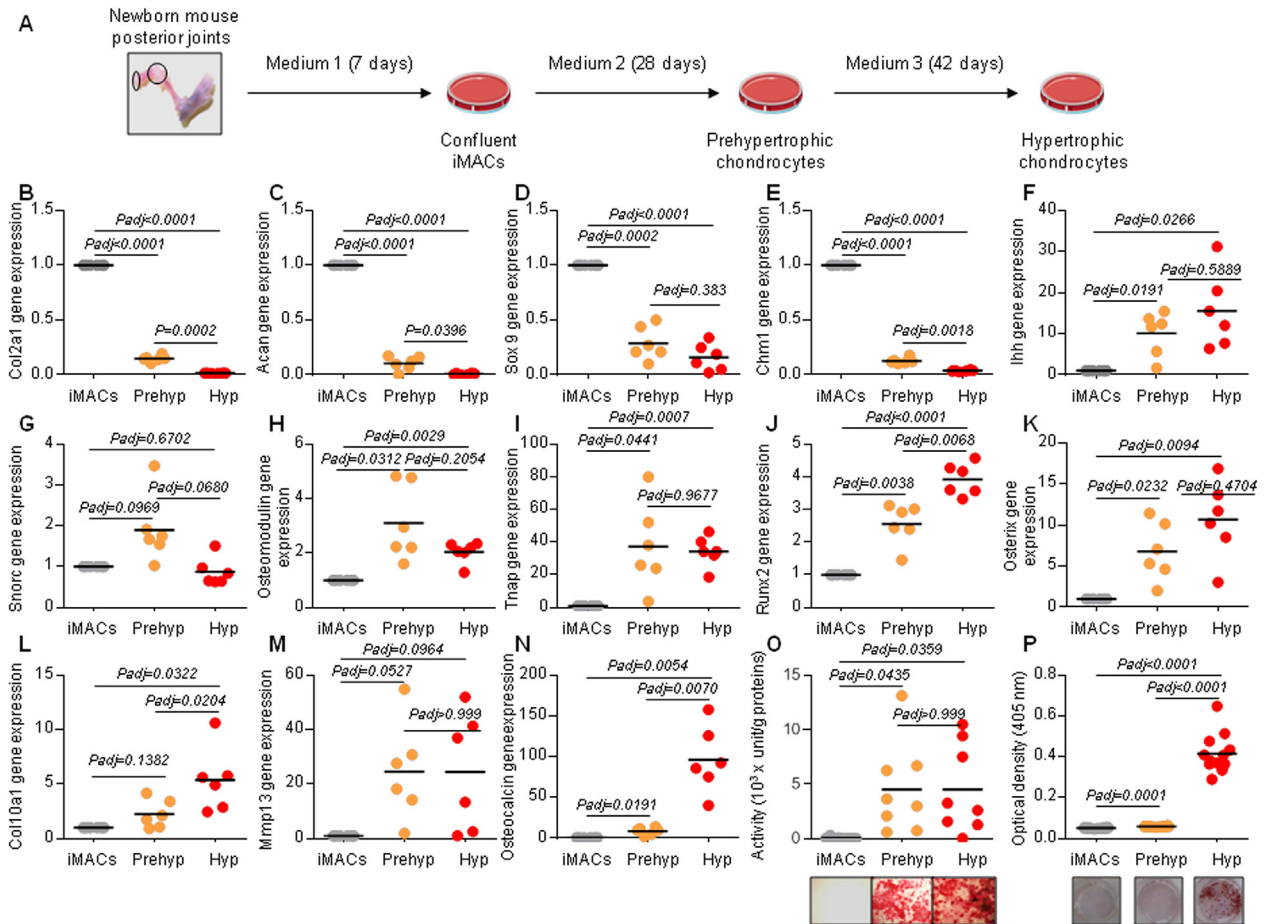


Fig. 1

Hypertrophic chondrocyte differentiation markers assessed in iMACs differentiated into prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. **A)** Model of progressive hypertrophic differentiation of iMACs. iMACs isolated from the femoral heads and the knees of newborn mice were cultured for 7 days in Medium 1. Confluent iMACs were then cultured for 28 days in Medium 2 to obtain prehypertrophic chondrocytes and for an additional 42 days for prehypertrophic to hypertrophic phenotype changes. **B–N)** Gene expression pattern of articular chondrocyte markers (**B–E**), prehypertrophic markers (**F–H**) and hypertrophic markers (**I–N**) in iMACs, prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes from six independent cell cultures. The results are expressed as fold expression compared to those of iMACs, whose mRNA expression was set to one for each culture. **O)** Measurement of alkaline phosphatase activity associated with iMACs, prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes ($n = 8$). Lower panels, representative photomicrographs of the cytochemical determination of phosphatase alkaline activity in iMACs, prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. **P)** Quantification of chondrocyte culture mineralization by alizarin red staining ($n = 12$). Lower panels, representative photomicrographs of alizarin red staining of iMACs, prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. Only hypertrophic chondrocytes showed positive alizarin red staining. Bars indicate the mean expression levels.

Osteoarthritis and Cartilage

stimulated by culture in Medium 2 (Fig. 1I–N). The mRNA expression of Runx2, Col10a1 and osteocalcin further increased after the culture in Medium 3. Consistent with the increased mRNA expression of Tnap, the activity of alkaline phosphatase was strongly stimulated by culture in Medium 2 and Medium 3 (Fig. 1O). Significant calcification of the chondrocyte cultures was only observed when cells were cultured in Medium 3 (Fig. 1P). Cells cultured in Medium 2 expressed both iMAC and hypertrophic chondrocyte markers and did not mineralize their matrix. They also expressed the markers of prehypertrophic chondrocytes Ihh, Snorc

and Osteomodulin [Fig. 1(F)–(H)]. Moreover, they expressed higher mRNA levels of Snorc and Osteomodulin than iMACs and hypertrophic chondrocytes. Thus, iMACs progressively became prehypertrophic and hypertrophic after culture in Medium 2 and Medium 3.

To further characterize our model of progressive hypertrophic differentiation of iMACs, the transcriptomic signatures of iMACs, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes were explored by high-throughput genomic methods ($n = 8$). A two-dimensional PCA of the genes expressed revealed that all displayed globally

distinct gene expression patterns (Fig. S2(B)), which were also confirmed by their distinct clustering patterns (Fig. S2(C)). Interestingly, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes showed a homogenous clustering pattern of gene expression, indicating that they displayed a specific molecular phenotype, different from iMAC phenotype.

The most variable genes identified by PCA (top 5,000 ranked by decreasing standard deviation) accounted for 40% and 17% of the total gene expression variability in the principal component (PC) 1 and PC2 groups, respectively. Genes positively correlated with PC1 displayed an upregulation across the differentiation process. The number of genes positively correlated with PC2 was more restricted, and those were of particular interest to characterize prehypertrophic cells since they were more specifically associated with this group of cells.

The repeated spotted probes and the probes targeting the same gene were not averaged but were analyzed for similar expression. We identified 8,121 differentially expressed (DE) genes (9306 DE probes, at false discovery rate (FDR)-adjusted p -value ≤ 0.05 & $|\text{Fold Change (FC)}| \geq 1.3$) between iMACs and hypertrophic chondrocytes (4,311 and 3,810 genes overexpressed in hypertrophic chondrocytes and iMACs, respectively), including markers of articular and hypertrophic chondrocytes

(Table S1). The specific part of this signature represented 1,467 genes (1768 DE probes, 809 and 959 overexpressed in hypertrophic chondrocytes and iMACs, respectively) [Fig. 2(A)]. We found 6,829 DE genes (7,744 probes) between prehypertrophic chondrocytes and iMACs (3,601 and 3,228 overexpressed in prehypertrophic chondrocytes and iMACs, respectively) (Table S1), while 1023 DE probes were specific to this contrast (540 and 483 overexpressed in prehypertrophic chondrocytes and iMACs, respectively) [Fig. 2(B)]. Finally, 5,308 genes (6,220 probes) were DE between the hypertrophic and prehypertrophic chondrocytes (2,970 and 2,338 genes overexpressed in hypertrophic and prehypertrophic chondrocytes, respectively) (Table S1). Eight hundred nine genes (1002 DE probes) were specific to differences between hypertrophic and prehypertrophic chondrocytes (626 and 376 probes overexpressed in hypertrophic and prehypertrophic chondrocytes, respectively) [Fig. 2(C)]. Hypertrophic chondrocytes were thus molecularly the most different from other cells.

Together, these results show that our culture model allows a progressive differentiation of the iMACs into prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes, each displaying a specific molecular phenotype.

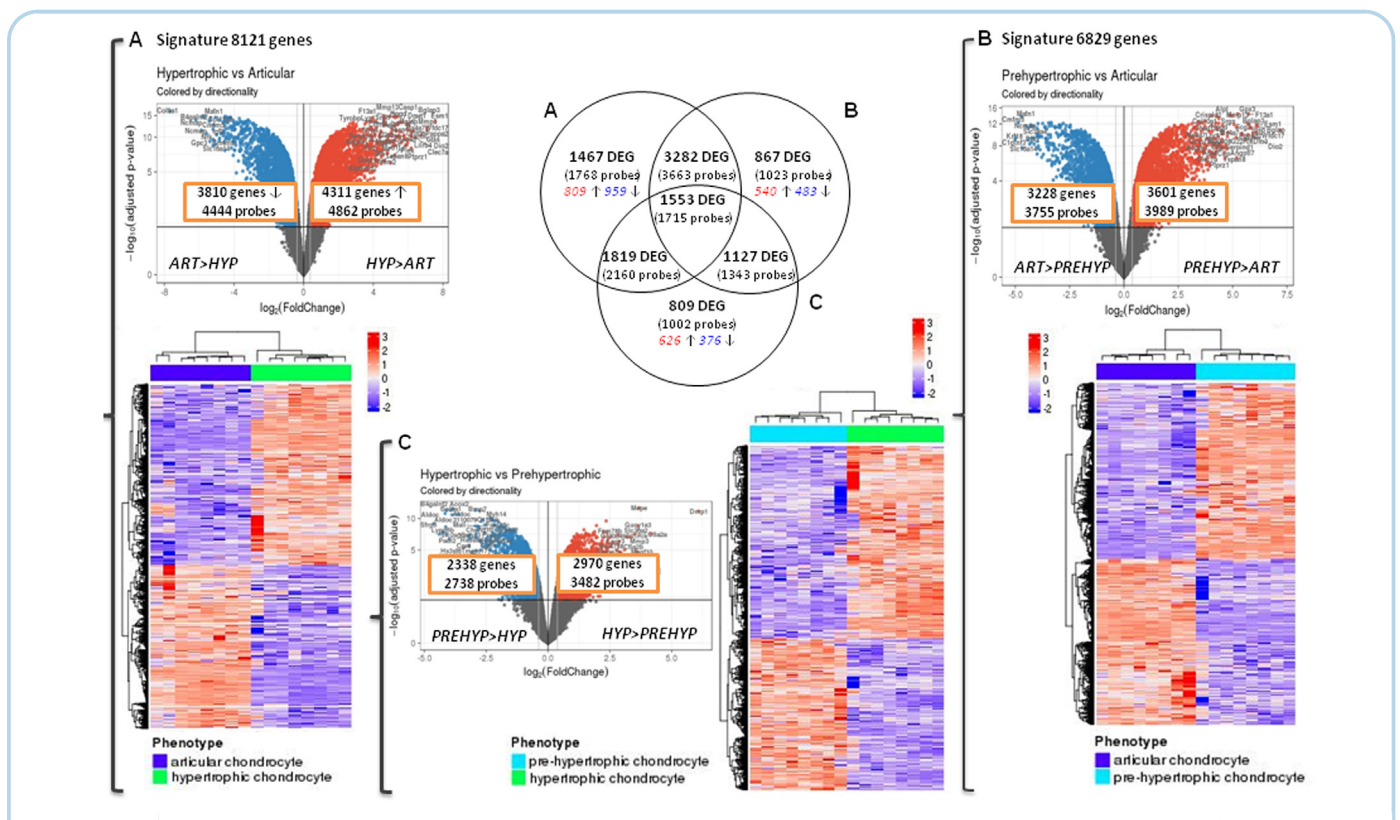


Fig. 2

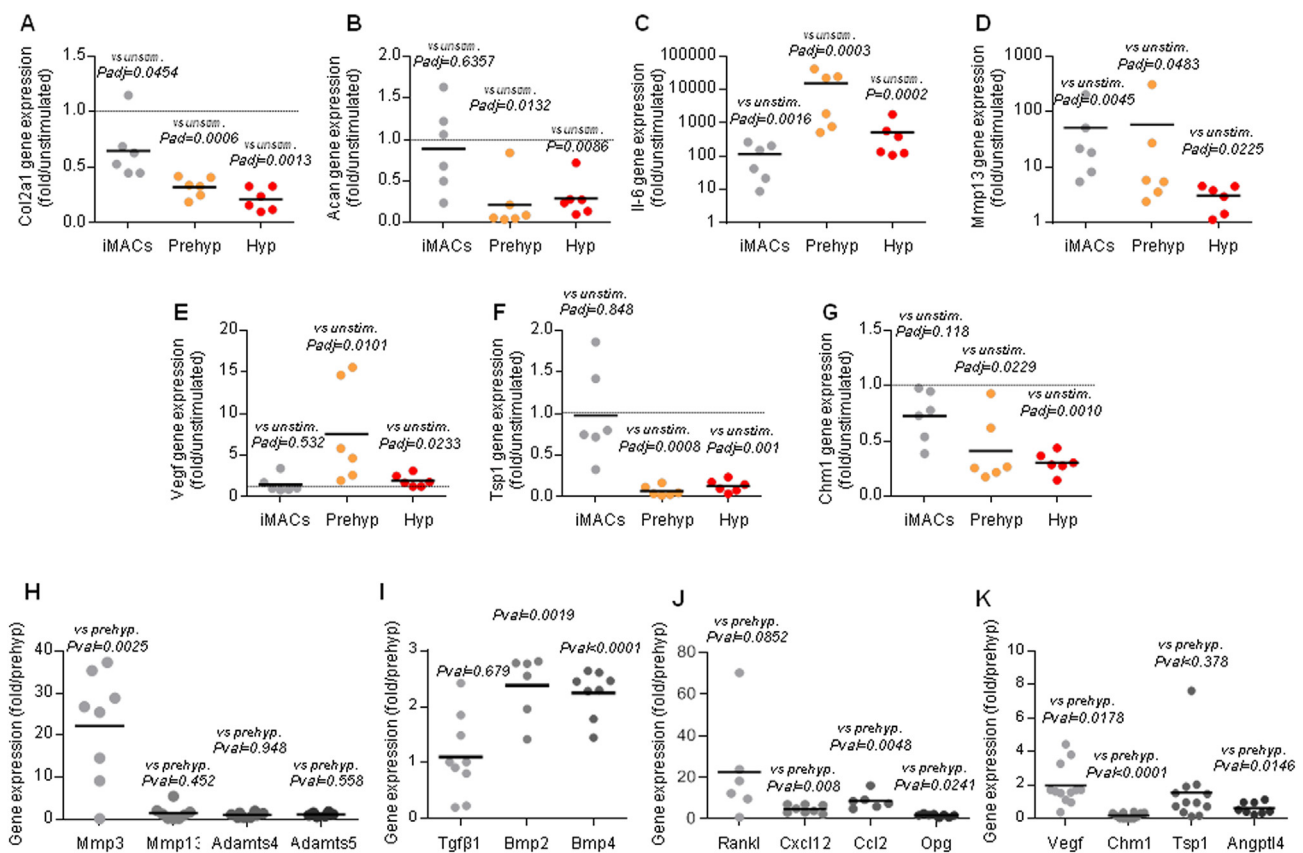
Whole-genome transcriptomic characterization across iMAC differentiation processes into hypertrophic chondrocytes. Results from differential analysis of gene expression in the chondrocytes. Signatures of differentially expressed genes (DEG) identified between **A**) hypertrophic vs articular chondrocytes ($n = 8$ in each group), **B**) prehypertrophic vs articular ($n = 8$ in each group), **C**) and hypertrophic vs prehypertrophic chondrocytes ($n = 8$ in each group). A Venn diagram compares the signatures obtained. Each comparison is illustrated by a hierarchical clustering (correlation distance on genes and Euclidean distance on samples). Volcano plots present the \log_2 -fold changes and the significance of each gene for the three comparisons. Gene and probe numbers differ due to repeated spotting and/or missing annotations.

Prehypertrophic to hypertrophic differentiation shifts chondrocytes towards an OA-inducing phenotype

Inflammatory factors, such as IL-1 β , alter the phenotype of chondrocytes that adopt OA-like catabolic features. As expected, IL-1 β downregulated the expression of Col2a1 by iMACs (Padj = 0.0454, 95%CI [-1.41; -0.00], n = 6), whereas it strongly upregulated the mRNA expression of Il-6 (Padj = 0.0016, 95%CI [1.01; 2.60], n = 6) and Mmp 13 (Padj = 0.0483, 95%CI [0.62; 2.14], n = 6) [Fig. 3(A), (C) and (D)]. IL-1 β also induced a similar catabolic phenotype in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes [Fig. 3(A)–(D)]. However, prehypertrophic chondrocytes appeared more sensitive to IL-1 β than did iMACs since IL-1 β led to a 2.0-fold, 4.1-fold and 1.8-fold lower expression of Col2a1, Acan and Chm 1 (n = 6), respectively and to a 131.7-fold higher expression of Il-6, as compared to iMACs [Fig. 3(A)–(C)]. In addition, IL-1 β also stimulated the expression of Vegf and repressed those of Tsp 1 and Chm1 by prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes (n = 6), while

neither Vegf nor Tsp1 expression was regulated by IL-1 β in iMACs [Fig. 3(E)–(G)].

To evaluate whether the shift from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes mimicked OA-related osteochondral remodeling, we performed analysis focused on molecular functions involved in OA (Fig. S2(D)). Hypertrophic chondrocytes, in contrast to prehypertrophic chondrocytes, displayed activated functions related to bone differentiation, angiogenesis and deterioration/damage of connective tissues. Accordingly, the mRNA expression of the bone remodeling factors BMP-2 (2.38-fold, 95%CI [0.78; 1.98] for the difference in means), BMP-4 (2.25-fold, 95%CI [0.89; 1.59] for the difference in means), CXCL12 (4.80-fold, 95%CI [2.19; 5.41] for the difference in means), CCL2 (8.73-fold, 95%CI [3.59; 11.86] for the difference in means) and OPG (1.75-fold, 95%CI [0.13; 1.37] for the difference in means) was increased when prehypertrophic chondrocytes became hypertrophic [Fig. 3(I) and (J)]. They also tended to overexpressed Rankl mRNA, as compared to prehypertrophic chondrocytes (22.5-fold, 95%CI [-4.32; 47.43] for the



Loss of the prehypertrophic phenotype shifts chondrocytes towards an OA-inducing phenotype. A–G iMACs, prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes from six independent cell cultures were stimulated by IL-1 β (1 ng/mL) for 24 h, and the mRNA expression of Col2a1 (A), Acan (B), Il-6 (C), Mmp 13 (D), Vegf (E), Tsp 1 (F) and Chm 1 (G) was determined. **H–K** Phenotypic transition of prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes induces the expression of factors involved in OA. Prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes from six to 12 independent cell cultures were assessed for the mRNA expression of matrix proteases (H), osteoblast (I) and osteoclast activity (J) and angiogenic/angiostatic factors (K). Data are expressed as fold expression compared to those in unstimulated control cells, whose mRNA expression was set to one for each culture (A–G), or to that in prehypertrophic chondrocytes (H–K). Bars indicate the mean expression levels.

difference in means) [Fig. 3(J)]. Hypertrophic chondrocytes expressed more Vegf (1.97-fold, 95%CI [0.203; 1.74] for the difference in means) and Mmp 3 mRNAs (22.21-fold, 95%CI [10.29; 32.14] for the difference in means) and less the angiostatic factors Chm 1 (–5.99-fold, 95%CI [–0.93;–0.73]) for the difference in means) and Angptl4 than prehypertrophic chondrocytes (–1.65-fold, 95%CI [–0.68;–0.10]) for the difference in means) [Fig. 3(H) and (K)]. In contrast, neither Tgf β 1 nor Mpm13, Adams4 and Adams5 mRNAs were modulated by the switch from prehypertrophic to hypertrophic differentiation [Fig. 3(H) and I].

Overexpression of IL-34 by hypertrophic chondrocytes

Hypertrophic differentiation of chondrocytes may contribute to OA via the release of factors with autocrine and paracrine tissue remodeling activity. We focused the analysis on ccl, cxcl cytokines/chemokines and ILs, for which expression was upregulated with chondrocyte hypertrophy (Table S2). Seven cytokines/chemokines were overexpressed by hypertrophic chondrocytes, especially in relation to prehypertrophic chondrocytes. Among them, only CXCL12 and IL-34 have their receptors (CXCR4, PTPRZ1 and CSF1R) also upregulated, suggesting that they may act in an autocrine loop (Table S2). Interestingly, Ptpz1 was the most overexpressed gene during the hypertrophic differentiation of chondrocytes (72.1-fold increased expression compared to iMACs), just after Mmp 3. In contrast, the levels of Cxcr7, the second receptor of CXCL12, were unchanged.

Since the involvement of IL-34 in OA is unknown, we next focused our investigation on its expression in OA. Consistent with the microarray analysis, RT-qPCR confirmed the overexpression of IL-34, Ptpz1 and Csf1r in hypertrophic chondrocytes (n = 6)

[Fig. 4(A)–(C)]. Both IL-34 and Ptpz1 mRNA levels increased progressively during the hypertrophic differentiation of chondrocytes, whereas the increase in the expression of Csf1r mRNA was observed during the conversion of iMACs to prehypertrophic chondrocytes. Concentrations of IL-34 in both cell supernatants and cell lysates also increased with iMAC hypertrophic differentiation [Fig. 4(D) and (E)]. Similar results were also observed during the hypertrophic differentiation of human chondrocytes. Their hypertrophic differentiation was associated with a decrease in the mRNA levels Sox 9 and aggrecan, an increase in those of TNAP and MMP-13, and the presence of areas of calcification within the extracellular matrix (Fig. S3). Human hypertrophic chondrocytes also showed an increase in IL-34 mRNA expression (Padj = 0.011, 95%CI [0.22; 1.17], n = 7) and in IL-34 concentration in cell supernatant (Padj = 0.0013, 95%CI [0.89; 2.08], n = 6) and cell lysates (Padj = 0.0282, 95%CI [0.27; 3.17], n = 6) [Fig. 4(F)–(H)].

IL-34 was also released by human OA cartilage, regardless of whether it originated from articular cartilage or from the thin cartilage layer covering osteophytes [Fig. 5(A)]. However, cartilage from osteophytes released higher amounts of IL-34 than OA articular cartilage (P = 0.0368, 95%CI [23.43; 506.40]). OA tissues also expressed PTPRZ1 and CSF1R [Fig. 5(B)]. Within articular cartilage, positive immunostaining for PTPRZ1 and CSF1R was mainly detected in the chondrocytes of the deeper area of the cartilage or in clusters of chondrocytes, although not all isolated chondrocyte or chondrocyte clusters were positive (Fig. 5(B), panels a–f). A more intense immunostaining was observed within the bone and was associated with osteoblasts, osteocytes and cells present in vascular channels, including vessels and mesenchymal stromal cells. A similar positive immunostaining pattern was observed within osteophytes (Fig. 5(B), panels g–i). Chondrocytes, osteoblasts,

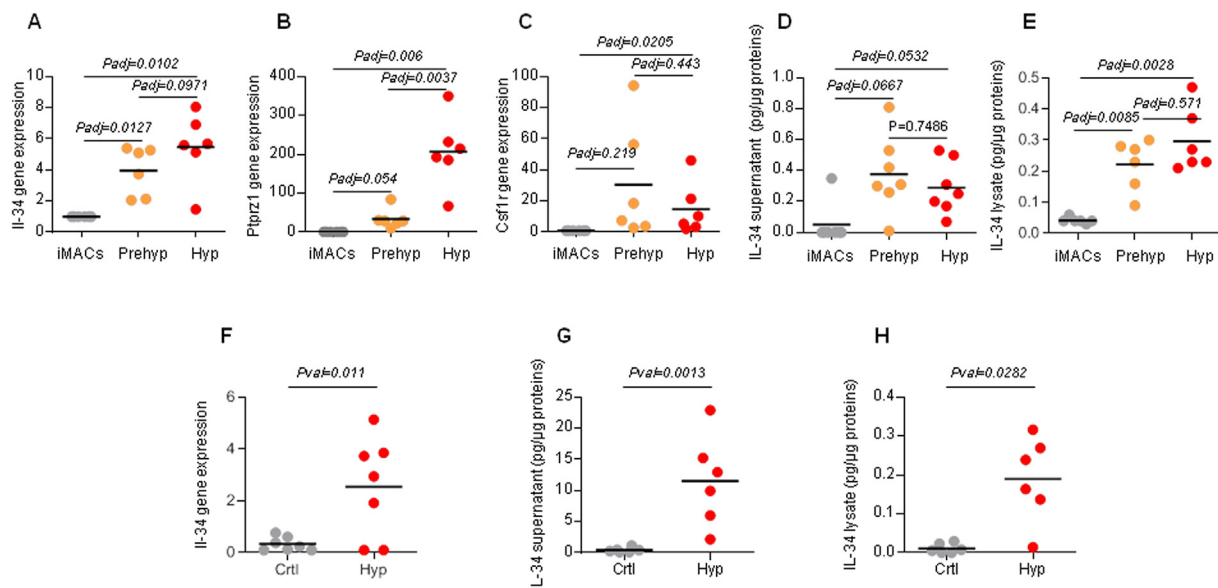
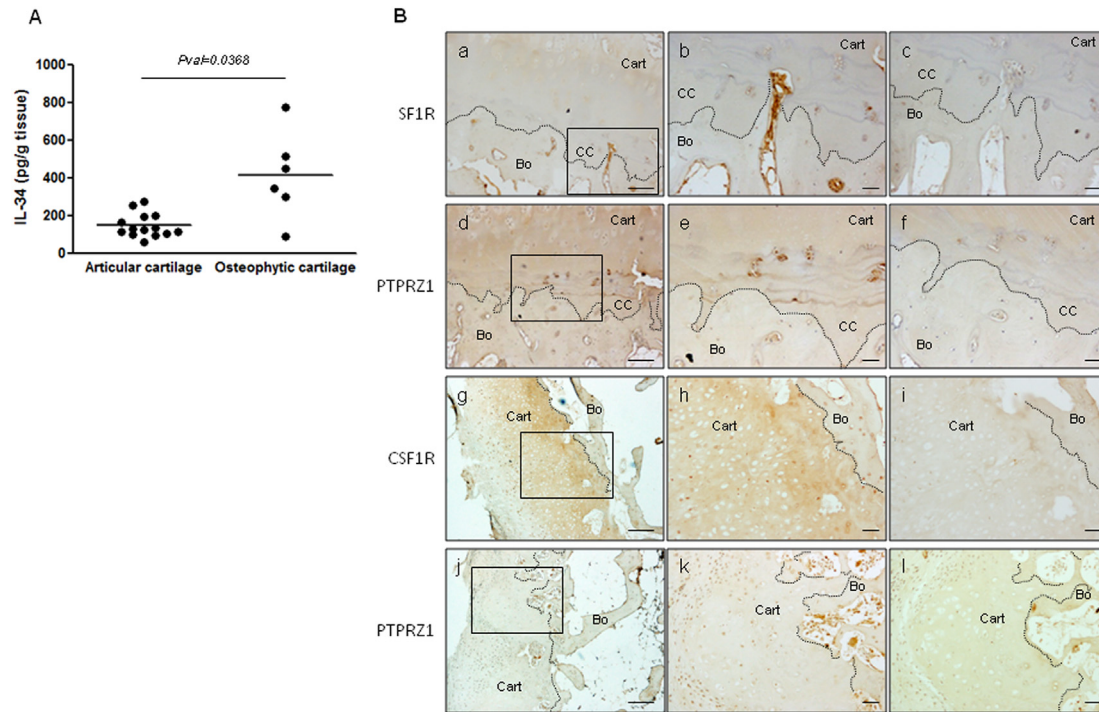


Fig. 4

Increased expression of IL-34 and IL-34 receptors with chondrocyte hypertrophic differentiation. A–E mRNA expression of IL-34 (A), Ptpz1 (B) and Csf1r (C) in iMACs, prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes (n = 6) was determined. **C–D** IL-34 protein levels were quantified by ELISA in cell conditioned medium (n = 7) (D) and cell lysates (n = 6) (E) of iMACs, prehypertrophic chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. **F–H** The IL-34 mRNA expression (n = 7) (F) and protein levels (n = 6) in chondrocyte conditioned medium (G) and cell lysates (H) were determined in human control and hypertrophic chondrocytes.

**Fig. 5**

Expression of IL-34 and IL-34 receptors in OA. **A)** IL-34 secreted by articular ($n = 14$ different donors) and osteophyte cartilages ($n = 6$ different donors) from OA patients was measured in tissue conditioned media by ELISA. **B)** Paraffin sections ($5 \mu\text{m}$) of OA cartilage bone interface (a–f) and osteophytes (g–l) ($n =$ five to eight different donors) were stained for CSF1R (a, b, g and h), PTPRZ1 (d, e, j and k) or with irrelevant antibodies as negative controls (c, f, i and l). CSF1- and PTPRZ1-positive staining are observed at the osteochondral junction (a, b, d and e). Chondrocytes near the tidemark express both the IL-34 receptors CSF1R and PTPRZ1. Within the bone, CSF1R- and PTPRZ1-positive staining is associated with osteoblasts and vascular channels. Similar staining was observed for both CSF1R and PTPRZ1 within osteophytes (g, h, j and k). Chondrocytes, osteoblasts, osteocytes and bone marrow cells showed positive staining. In addition, mesenchymal cells of the fibrous tissue at the osteophyte surface were positive for PTPRZ1. Panels b, e, h and k show higher magnification views of the delimited areas of panels a, d, g and j, respectively. Cartilage and bone are delimited by dotted lines. Bo: bone, Cart: cartilage, CC: calcified cartilage. Bars = $200 \mu\text{m}$ (a, d, g and j) or $50 \mu\text{m}$ (b, c, e, f, h, i, k and l).

Osteoarthritis
and Cartilage

osteocytes and bone marrow cells were positive for both CSF1R and PTPRZ1. In addition, mesenchymal cells of the fibrous tissue, which often covered the osteophyte surface, were also positive for PTPRZ1 immunostaining (Fig. 5(B), panels j and k).

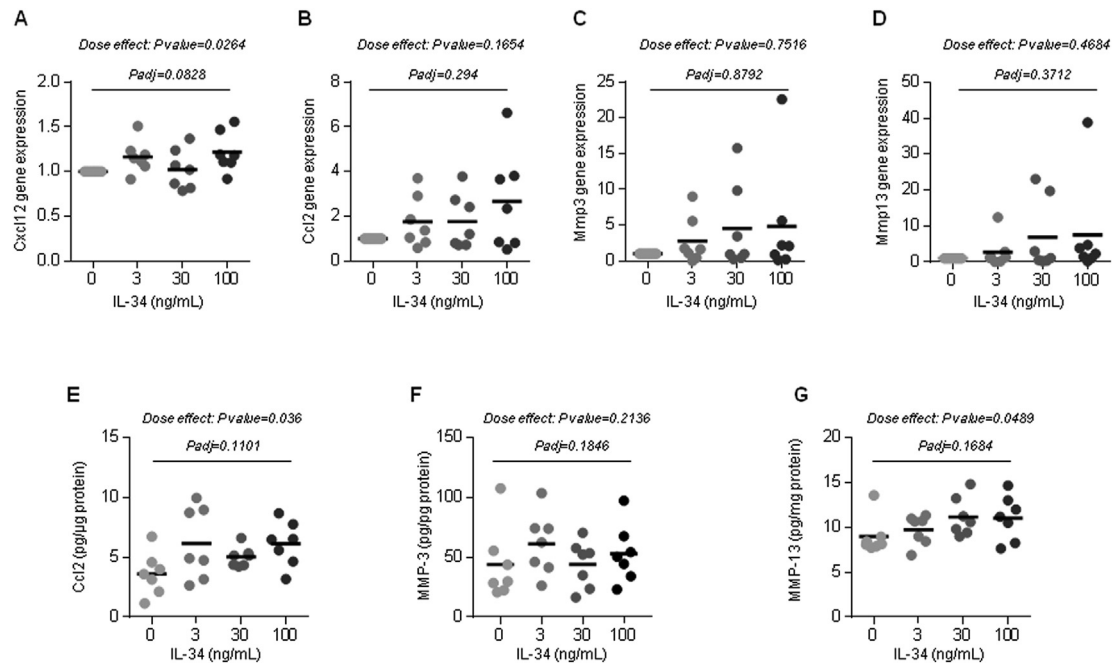
IL-34 increases the remodeling potential of hypertrophic chondrocytes and osteoblasts

We next determined the chondrocyte ($n = 7$) and osteoblast response ($n = 5$) to IL-34. No effect of IL-34 on iMACs and pre-hypertrophic chondrocytes was observed (data not shown). In contrast, both hypertrophic chondrocytes and osteoblasts were sensitive to IL-34 stimulation. A dose-dependent increase in the mRNA expression of *Ccl2*, *Cxcl12* and *Mmp 13* by hypertrophic chondrocytes was observed in response to IL-34 [Fig. 6(A)–(C)]. This was associated with a dose-dependent increase in the release of CCL2 and MMP-13 ($P = 0.0360$ and $P = 0.0489$ for CCL2 and MMP-13, respectively) [Fig. 6(E) and (F)]. No increase in MMP-3 expression and release was observed [Fig. 6(D) and (G)]. Similarly, IL-34 tended to stimulate the expression of *Ccl2* ($P = 0.0911$), *Mmp 3* ($P = 0.129$), *Mmp13* ($P = 0.141$) and *Tnfa* ($P = 0.1301$), by

osteoblasts [Fig. 7(A)–(D)]. Consistently, IL-34 stimulated the release of CCL2 ($P = 0.0005$), MMP-3 ($P = 0.0085$) and MMP-13 ($P = 0.0052$) by IL-34 in a dose-dependent manner [Fig. 7(G)–(I)]. IL-34 induced also a dose-dependent decrease in the mRNA expression of both *Pedf* ($P = 0.0084$) and *Ptprz1* ($P = 0.0917$) by osteoblasts [Fig. 7(E) and (F)]. IL-34 had no observable effect on the mRNA expression of *Vegf*, *Rankl* and *Csf1r* in both hypertrophic chondrocytes and osteoblasts (data not shown).

Discussion

OA is characterized at the cellular level by deep phenotypic modifications of cells from the different joint tissues. Notably, there is a hypertrophic differentiation of chondrocytes leading to the accumulation of calcified depots within cartilage¹⁹ and an advancement of the mineralization front in the deeper part of the cartilage. Hypertrophic differentiation of chondrocytes during OA is thought to play an important role in cartilage disappearance and subchondral bone remodeling^{20,21}. Therefore, the identification of molecular factors produced by hypertrophic chondrocytes and involved in cartilage and bone damage in OA could be of

**Fig. 6**

Increased remodeling potential of hypertrophic chondrocytes in response to IL-34. Hypertrophic chondrocytes ($n = 7$) were stimulated by increasing concentrations of IL-34 before RT-qPCR analysis of the mRNA expression of Cxcl12 (A), Ccl2 (B), Mmp 3 (C) and Mmp 13 (D). The release of CCL2 (E), MMP-3 (F) and MMP-13 (G) into cell conditioned medium in response to increased concentrations of IL-34 was measured by ELISAs.

Osteoarthritis
and Cartilage

therapeutic interest. However, no current model of chondrocyte hypertrophic differentiation is able to lead such investigations. None use articular chondrocytes to obtain hypertrophic chondrocytes able to calcify their matrix. Either they do not provide sufficient quantities of hypertrophic chondrocytes or are based on cell lines rather than primary cultures.

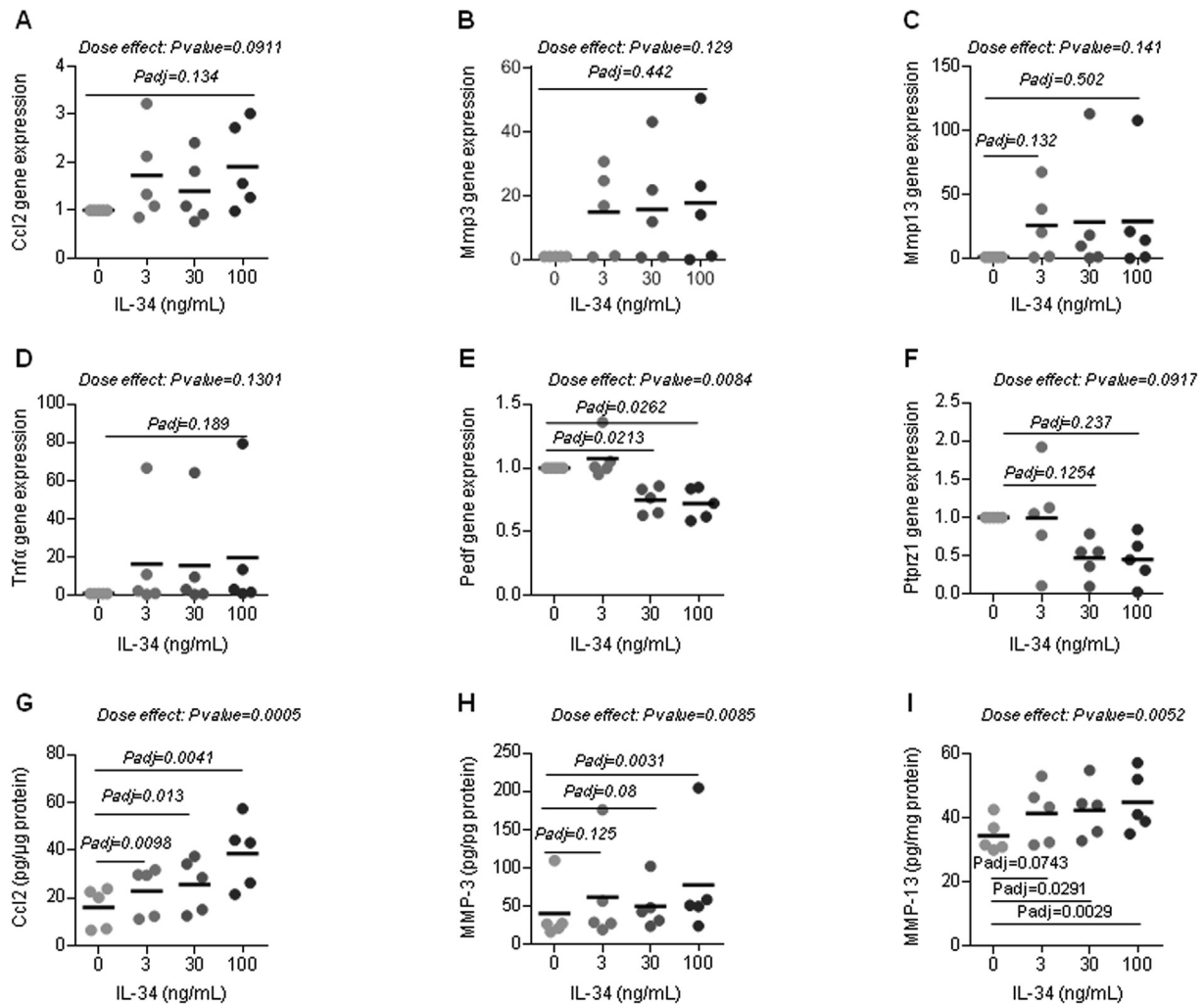
Thus, developing such a model that combines all these features represents a real need and a great challenge. Here, we have developed an original model of progressive articular chondrocyte hypertrophic differentiation and identified the recently discovered IL-34 as a factor with putative osteochondral remodeling activity.

Our model of chondrocyte hypertrophic differentiation was achieved starting with primary cultures of iMACs. Calcification was only observed after culturing iMACs successively in Medium 1, Medium 2 and then in Medium 3. In addition, only a faint expression of osteocalcin, Osterix and Tnap was observed in the iMAC cultures, suggesting that matrix calcification was not due to contamination of cultures by osteoblasts. Although a trans-differentiation of some chondrocytes into osteoblast-like cells during the culture time cannot be totally ruled out, we consider that the features we observed are attributable to hypertrophic chondrocytes rather than osteoblast-like cells since the expression of Col10a1, a specific marker of hypertrophic chondrocytes, was strongly increased during the culture time.

Chondrocyte hypertrophy is generally only determined by the combination of an increased expression of some hypertrophic markers with the decreased expression of chondrocyte markers^{22–25}. Nevertheless, in addition to these criteria, matrix calcification appears necessary to ascertain that chondrocytes reach hypertrophy. Indeed, chondrocytes cultured in Medium 2 never calcified, although they showed a mRNA expression of

hypertrophic markers. The current published culture models of hypertrophic differentiation reaching matrix calcification include primary cultures of chondrocytes isolated from limb buds and growth plate, ATDC5 cells and mesenchymal stem cells (MSCs)^{26–30}. However, neither ATDC5 cells nor MSCs are chondrocytes, and despite the similarities between chondrocytes from growth plates and articular cartilage, they have distinct molecular phenotypes^{31–33}. These models are therefore not suitable for studying hypertrophic articular chondrocytes. Yahara *et al.* also reported matrix calcification with cultures of articular chondrocytes¹⁷. Pellet cultures of human OA articular chondrocytes expressed hypertrophic markers and showed calcifications¹⁷ (and this study). However, only sparse calcifications were observed, suggesting that only a subset of chondrocytes reach hypertrophy. Nevertheless, this model appears useful to validate our results obtained with iMACs.

In addition to iMACs and hypertrophic chondrocytes, our model provides insight into a third chondrocyte phenotype, which we considered as prehypertrophic chondrocytes considering its gene expression pattern. This chondrocyte population expressed intermediate levels of chondrocyte and hypertrophic markers compared to those expressed in iMACs and hypertrophic chondrocytes, and they did not calcify their matrix. These cells also expressed known prehypertrophic markers, including snorc and osteomodulin^{9,34}, whose expression was stronger than that in both iMACs and hypertrophic chondrocytes. The prehypertrophic phenotype corresponded to a specific population of chondrocytes showing a homogeneous molecular pattern, as revealed by PCA of the microarray results. The whole genome transcriptomic analysis indeed revealed that two phenotypically distinct populations of chondrocytes were obtained from iMACs. We characterized them

**Fig. 7**

Increased remodeling potential of osteoblasts in response to IL-34. Osteoblasts ($n = 5$) were stimulated by increasing concentrations of IL-34 before RT-qPCR analysis of the mRNA expression of Cxcl12 Ccl2 (A), Mmp 3 (B), Mmp 13 (C), Tnfa (D), Pedf (E) and Ptpnz1 (F). The release of CCL2 (G), MMP-3 (H) and MMP-13 (J) into cell conditioned medium in response to increased concentrations of IL-34 was measured by ELISAs.

Osteoarthritis
and Cartilage

as prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes based on their gene expression pattern and their ability to calcify or not their extracellular matrix. Investigating other features, including the cell shape and the composition and the organization of the extracellular matrix, would be of interest to validate prehypertrophic and hypertrophic states.

The presence of several populations of cells with molecularly distinct phenotypes within articular cartilage has recently been described in human OA cartilage^{35,36}. Ji *et al.* characterized seven different chondrocyte populations, including prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes³⁶. Their results suggest that prehypertrophic chondrocytes localized in the deeper part of articular cartilage play an important role in OA progression. Here, we show that prehypertrophic chondrocytes is the most sensitive chondrocyte population to an inflammatory stimulus. Inflammatory stress is a hallmark of OA, and IL-1 β induced a more potent global response by prehypertrophic chondrocytes than by iMACs and hypertrophic chondrocytes. In addition, the prehypertrophic to

hypertrophic differentiation of chondrocytes is associated with an increase in the bone remodeling and angiogenic potential of chondrocytes, as evaluated by their molecular pattern. Functional studies will be needed to ascertain the increased potential for tissue remodeling of hypertrophic chondrocytes.

The microarray analysis for cytokines/chemokines overexpressed with chondrocyte hypertrophic differentiation and able to act in an autocrine and paracrine manner highlighted the recently discovered IL-34³⁷. RT-qPCR results confirmed this increased mRNA expression, and we also showed that murine and human chondrocytes produced IL-34 at higher rates when chondrocytes were hypertrophic. In OA, hypertrophic chondrocytes are localized within articular cartilage and osteophytes, where they are suspected to play a major role in the pathological remodeling of the osteochondral junctions. Both articular and osteophytic cartilages from OA patients released IL-34. A differential transcriptomic analysis of articular and osteophytic cartilage from paired OA patients revealed a higher expression of genes with functions in

terminal chondrocyte differentiation by osteophytic cartilage³⁸. Interestingly, we found that osteophytic cartilage released higher amounts of IL-34 than articular cartilage. In addition, PTRZ1 was among the most upregulated genes in osteophytic cartilage compared to its gene expression in articular cartilage³⁸. Both osteophytic and articular cartilages showed positive immunostaining of PTPRZ1. In particular, OA cartilage PTPRZ1-positive chondrocytes were preferentially located in the deeper zone of joint cartilage or in the chondrocyte clusters, the two areas where hypertrophic chondrocytes are usually found^{7,19}. Osteoblasts and osteocytes of the subchondral bone also express PTPRZ1, as described³⁹, as well as cells present in vascular channels, including vessels and mesenchymal stromal cells. We found a similar expression pattern for CSF1R, whose expression by bone cells and the increased expression in OA cartilage has been already reported by others^{40,41}.

Considering the expression of IL-34 and its receptors by cells of the cartilage/subchondral bone interface, IL-34 may act as a paracrine and autocrine factor on cartilage and bone cells in OA. IL-34 is indeed a known osteoclastogenesis factor^{42,43} and has been reported to stimulate angiogenesis⁴⁴. Its biological activity on both chondrocytes and osteoblasts has never been investigated. Neither iMACs nor prehypertrophic chondrocytes responded to IL-34 stimulation. This may be explained by the differential expression of IL-34 receptors on iMACs, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. However, the involvement of other molecular partners differentially produced by the phenotypically distinct chondrocytes cannot be excluded as IL-34 displays some of its biological activities independently to Ptpz1 and Csf1r. It may also bind to other cytokines to form heteromeric cytokines^{45,46}. In hypertrophic chondrocytes and osteoblasts, IL-34 stimulated the mRNA expression and the release of some tissue remodeling factors, especially the mRNA expression of Cxcl12 in hypertrophic chondrocytes, the secretion of CCL2 and MMP-13 by hypertrophic chondrocytes and osteoblasts and the release of MMP-3 by osteoblasts. Although IL-34 did not stimulate VEGF expression, it may indirectly induce angiogenesis by stimulating the expression of CXCL12 and by inhibiting that of the angiostatic factor PEDF. In addition to its reported direct action on osteoclastogenesis and angiogenesis^{42–44}, IL-34 may thus indirectly stimulate these two processes by acting on hypertrophic chondrocytes and osteoblasts. Cartilage-derived IL-34 may also explain the positive association between IL-34 concentration in synovial fluid and the radiographic and symptomatic severity of knee OA⁴⁷. Further studies are needed to explore the specific role of IL-34, especially on human hypertrophic chondrocytes and osteoblasts, and more precisely that of hypertrophic-derived IL-34 in OA.

Some limitations emerge from our study. They include the characterization of our model of iMAC hypertrophic differentiation, which would be enriched with the study of the cell shape and the extracellular matrix composition and organization. Functional studies are also needed to ascertain the increased potential for tissue remodeling of hypertrophic chondrocytes and the role of IL-34.

To conclude, we have developed a new model of articular chondrocyte hypertrophic differentiation, which allows obtaining three molecularly distinct populations: iMACs, prehypertrophic chondrocytes and matrix calcifying hypertrophic chondrocytes. Our results support the hypothesis that the phenotypic alterations of prehypertrophic chondrocytes in articular cartilage are critical for the loss of cartilage homeostasis observed in OA. The prehypertrophic to hypertrophic differentiation of chondrocytes induced the expression of a subset of genes, which together may favor the pathological remodeling of cartilage and bone, as observed in OA. Notably, the increased production of IL-34 by

hypertrophic chondrocytes could act locally on hypertrophic chondrocytes and osteoblasts to indirectly stimulate osteoclastogenesis and angiogenesis. Therefore, according to the tissue remodeling potential of the recently discovered IL-34, further investigations are needed to determine whether IL-34 could be targeted in OA and/or may be used as a synovial biomarker to determine the severity of OA.

Author contributions

- Conception and design: MHL, PP, GRV, FDC, FB, XH
- Analysis and interpretation of the data: SVE, MLPL, IT, DV, CB, SCG, LG, MHL, PP, GRV, FDC, FB, XH
- Drafting of the article: SVE, DV, FB, XH
- Critical revision of the article for important intellectual content: DV, FB, XH
- Final approval of the article: SVE, MLPL, IT, DV, AP, DC, CB, SCG, LG, DC, SM, GN, AS, MHL, PP, GRV, FDC, FB, XH
- Provision of study materials or patients: AS
- Statistical expertise: DV
- Obtaining of funding: FP, MHL, FDC, FB, XH
- Collection and assembly of data: SVE, MLPL, IT, AP, DC, CB, DC, SM, GN, AS, XH

Conflict of interest

None.

Role of the funding source

This work was supported by grants from the Société Française de Rhumatologie and the Fondation Arthritis Courtin. Sandy van Eegher was supported by a PhD grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Indira Toillon was supported by a PhD grant from the region Ile de France (ARDoC program). Stéphanie Malbos was supported by a grant from the Société Française de Rhumatologie.

Appendix A Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.10.013>.

References

1. Tøeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1824(1):133–45.
2. Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12(11):632–44.
3. Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(1):43–9.
4. Mahjoub M, Berenbaum F, Houard X. Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int* 2012;23(Suppl 8):841–6.
5. Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest* 2008;118(2):429–38.
6. Aigner T, Bertling W, Stoss H, Weseloh G, von der Mark K. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1993;91(3):829–37.
7. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S, Swoboda B. Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis:

- expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int* 2000;67(3):230–40.
8. Wachsmuth L, Soder S, Fan Z, Finger F, Aigner T. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol* 2006;21(5):477–85.
 9. Belluoccio D, Etich J, Rosenbaum S, Frie C, Grskovic I, Stermann J, et al. Sorting of growth plate chondrocytes allows the isolation and characterization of cells of a defined differentiation status. *J Bone Miner Res* 2010;25(6):1267–81.
 10. Muller C, Khabut A, Dudhia J, Reinholt FP, Aspberg A, Heinegard D, et al. Quantitative proteomics at different depths in human articular cartilage reveals unique patterns of protein distribution. *Matrix Biol* 2014;40:34–45.
 11. Semevolos SA, Nixon AJ, Fortier LA, Strassheim ML, Haupt J. Age-related expression of molecular regulators of hypertrophy and maturation in articular cartilage. *J Orthop Res* 2006;24(8):1773–81.
 12. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273(5275):613–22.
 13. Priam S, Bougault C, Houard X, Gosset M, Salvat C, Berenbaum F, et al. Identification of soluble 14-3-3 as a novel subchondral bone mediator involved in cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65(7):1831–42.
 14. Sanchez C, Gabay O, Salvat C, Henrotin YE, Berenbaum F. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(4):473–81.
 15. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* 2008;3(8):1253–60.
 16. 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;13(3):243–9.
 17. Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, et al. Pterisin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting *Sik3*. *Nat Commun* 2016;7:10959.
 18. Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 2001;19(4):342–7.
 19. Kirsch T, Swoboda B, Nah H. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8(4):294–302.
 20. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther* 2010;12(5):216.
 21. Singh P, Marcu KB, Goldring MB, Otero M. Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1442(1):17–34.
 22. 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;175(12):8296–302.
 23. Pesesse L, Sanchez C, Delcour JP, Bellahcene A, Baudouin C, Msika P, et al. Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21(12):1913–23.
 24. Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, Liu F, Wells JW, Muller PE, et al. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum* 2009;60(3):801–12.
 25. Zhang X, Crawford R, Xiao Y. Inhibition of vascular endothelial growth factor with shRNA in chondrocytes ameliorates osteoarthritis. *J Mol Med (Berl)* 2016;94(7):787–98.
 26. James CG, Ulici V, Tuckermann J, Underhill TM, Beier F. Expression profiling of Dexamethasone-treated primary chondrocytes identifies targets of glucocorticoid signalling in endochondral bone development. *BMC Genom* 2007;8:205.
 27. Stanton LA, Sabari S, Sampaio AV, Underhill TM, Beier F. p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *Biochem J* 2004;378(Pt 1):53–62.
 28. Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 1997;137(5):1149–60.
 29. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2008;58(5):1377–88.
 30. Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res* 1997;12(8):1174–88.
 31. Chau M, Lui JC, Landman EB, Spath SS, Vortkamp A, Baron J, et al. Gene expression profiling reveals similarities between the spatial architectures of postnatal articular and growth plate cartilage. *PLoS One* 2014;9(7), e103061.
 32. Hissnauer TN, Baranowsky A, Pestka JM, Streichert T, Wiegandt K, Goepfert C, et al. Identification of molecular markers for articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(12):1630–8.
 33. Matsusaki T, Aoyama T, Nishijo K, Okamoto T, Nakayama T, Nakamura T, et al. Expression of the cadherin-11 gene is a discriminative factor between articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14(4):353–66.
 34. Heinonen J, Taipaleenmaki H, Roering P, Takatalo M, Harkness L, Sandholm J, et al. Snorc is a novel cartilage specific small membrane proteoglycan expressed in differentiating and articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19(8):1026–35.
 35. Jayasuriya CT, Hu N, Li J, Lemme N, Terek R, Ehrlich MG, et al. Molecular characterization of mesenchymal stem cells in human osteoarthritis cartilage reveals contribution to the OA phenotype. *Sci Rep* 2018;8(1):7044.
 36. Ji Q, Zheng Y, Zhang G, Hu Y, Fan X, Hou Y, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2018;78(1):100–10.
 37. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 2008;320(5877):807–11.
 38. Gelse K, Ekici AB, Cipa F, Swoboda B, Carl HD, Olk A, et al. Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage—clues for a transient and permanent chondrocyte phenotype. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20(2):162–71.
 39. Kaspiris A, Mikelis C, Heroult M, Khaldi L, Grivas TB, Kouvaras I, et al. Expression of the growth factor pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta in the serum, cartilage and subchondral bone of patients with osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2013;80(4):407–13.
 40. Wittrant Y, Gorin Y, Mohan S, Wagner B, Abboud-Werner SL. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) directly inhibits receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression by osteoblasts. *Endocrinology* 2009;150(11):4977–88.
 41. Rai MF, Tycksen ED, Cai L, Yu J, Wright RW, Brophy RH. Distinct degenerative phenotype of articular cartilage from knees with

- meniscus tear compared to knees with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2019;27(6):945–55.
42. Baud'huin M, Renault R, Charrier C, Riet A, Moreau A, Brion R, *et al.* Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Pathol* 2010;221(1):77–86.
 43. Chen Z, Buki K, Vaaraniemi J, Gu G, Vaananen HK. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One* 2011;6(4), e18689.
 44. Segaliny AI, Mohamadi A, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Lanel R, *et al.* Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. *Int J Canc* 2015;137(1):73–85.
 45. Segaliny AI, Brion R, Brulin B, Maillason M, Charrier C, Teletchea S, *et al.* IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization. *Cytokine* 2015;76(2):170–81.
 46. Segaliny AI, Brion R, Mortier E, Maillason M, Cherel M, Jacques Y, *et al.* Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853(5): 1010–21.
 47. Wang SL, Zhang R, Hu KZ, Li MQ, Li ZC. Interleukin-34 synovial fluid was associated with knee osteoarthritis severity: a cross-sectional study in knee osteoarthritis patients in different radiographic stages. *Dis Markers* 2018;2018: 2095480.

Rôle des chondrocytes hypertrophiques dans le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose : implication du SDF-1 dans l'angiogenèse

Résumé

L'arthrose est la pathologie musculosquelettique la plus fréquente et touche l'ensemble des tissus de l'articulation. Au cours de cette pathologie, une dégradation progressive du cartilage articulaire est observée suite à la protéolyse de sa matrice extracellulaire mais également suite à la réactivation du processus d'ossification endochondrale. En effet, l'articulation arthrosique est le siège d'une différenciation hypertrophique des chondrocytes, d'une minéralisation du cartilage articulaire, d'une angiogenèse à la jonction os/cartilage et d'un remodelage pathologique de l'os sous-chondral. L'angiogenèse ostéochondrale pourrait jouer un rôle central dans la progression de la pathologie mais les acteurs moléculaires responsables de la vascularisation du cartilage sont encore méconnus. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'angiogenèse par l'Aflibercept, qui cible le VEGF, ne limitait que partiellement la progression de l'arthrose dans un modèle d'arthrose post-traumatique chez le rat. Nous pensons que la différenciation des chondrocytes de la couche profonde du cartilage, les chondrocytes pré-hypertrophiques, en chondrocytes hypertrophiques pourrait contribuer au remodelage de la jonction ostéochondrale.

Grâce à un nouveau modèle de différenciation progressive de chondrocytes murins en culture primaire qui permet l'obtention de chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, nous avons évalué le potentiel angiogénique et ostéoclastogénique des différents phénotypes chondrocytaires. L'expression de facteurs pro-angiogéniques et ostéoclastogéniques augmentent avec la différenciation hypertrophique des chondrocytes tandis que celle de facteurs anti-angiogéniques diminue. Nous avons examiné le rôle biologique des chondrocytes dans le remodelage de la jonction ostéochondrale en comparant les capacités angiogéniques et ostéoclastogéniques des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Nous avons montré que les chondrocytes hypertrophiques stimulaient davantage la différenciation de monocytes RAW264.7 en ostéoclastes que les chondrocytes pré-hypertrophiques. A l'aide de différents tests fonctionnels modélisant *in vitro* les différentes étapes du processus d'angiogenèse, nous avons évalué la capacité angiogénique des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Par un test d'adhérence de cellules endothéliales fluorescentes aux chondrocytes en culture, nous avons montré que les cellules HUVEC adhèrent davantage aux matrices extracellulaires de chondrocytes hypertrophiques qu'aux matrices de chondrocyte pré-hypertrophiques. Nos résultats montrent également que les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques stimulent la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules HUVEC tandis que les milieux conditionnés de chondrocytes pré-hypertrophiques ne présentent que peu d'effets sur l'angiogenèse. Nous avons identifié le facteur SDF-1, présent dans le cartilage arthrosique et notamment au niveau des clusters de chondrocytes hypertrophiques, comme étant à l'origine des effets pro-angiogéniques des chondrocytes hypertrophiques et démontré son implication dans l'angiogenèse en inhibant l'axe SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100.

Ainsi, la différenciation hypertrophique des chondrocytes pourrait participer aux mécanismes de remodelage de la jonction ostéochondrale au cours de l'arthrose.

Mots clés

Arthrose – Différenciation hypertrophique – Chondrocyte – Angiogenèse – Ostéoclastogenèse

Role of hypertrophic chondrocytes in the pathological remodeling of the osteochondral junction during osteoarthritis: involvement of SDF-1 in angiogenesis

Abstract

Osteoarthritis is the most common musculoskeletal disease and affects all tissues of the joint. During the pathology, a progressive degradation of the articular cartilage is observed following the proteolysis of its extracellular matrix but also following the reactivation of endochondral ossification process. Indeed, the osteoarthritic joint is the site of hypertrophic differentiation of chondrocytes, mineralization of articular cartilage, angiogenesis at the bone/cartilage junction and pathological remodeling of the subchondral bone. Osteochondral angiogenesis could play a pivotal role in the progression of the pathology but the molecular actors responsible for cartilage vascularization are still unknown. We have shown that inhibition of angiogenesis by Aflibercept, which targets VEGF, only partially limited the progression of osteoarthritis in a rat model of post-traumatic osteoarthritis. We believe that differentiation of pre-hypertrophic chondrocytes, present in the deep layer of cartilage, into hypertrophic chondrocytes may contribute to the remodeling of the osteochondral junction.

Using a new model of progressive differentiation of murine chondrocytes in primary culture, which allows the production of pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes, we evaluated the angiogenic and osteoclastogenic potential of the different phenotypes of chondrocyte. The expression of pro-angiogenic and osteoclastogenic factors increase with hypertrophic differentiation of chondrocyte while that of anti-angiogenic factors decrease. We examined the biological role of chondrocytes in the remodeling of the osteochondral junction by comparing the angiogenic and osteoclastogenic capacities of pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes. We showed that hypertrophic chondrocytes stimulated more the differentiation of RAW264.7 monocytes into osteoclast than pre-hypertrophic chondrocytes. Using different functional assays modelling the different steps of the angiogenic process *in vitro*, we evaluated the angiogenic capacity of pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes. With an adherence assay of fluorescent endothelial cells to chondrocytes in culture, we showed that HUVEC cells adhere more to hypertrophic chondrocyte extracellular matrices than to pre-hypertrophic chondrocytes matrices. Our results also show that hypertrophic chondrocyte-conditioned media stimulate HUVEC cell proliferation, migration and tube formation, whereas pre-hypertrophic chondrocyte-conditioned media show little effect on angiogenesis. We identified the SDF-1 factor, present in osteoarthritic cartilage and particularly in hypertrophic chondrocyte clusters, as the source of the pro-angiogenic effects of hypertrophic chondrocytes and demonstrated its involvement in angiogenesis by inhibiting the SDF-1/CXCR4 axis by AMD3100.

Thus, hypertrophic differentiation of chondrocytes could participate in the remodeling mechanisms of the osteochondral junction during osteoarthritis.

Keywords

Osteoarthritis – Hypertrophic differentiation – Chondrocyte – Angiogenesis – Osteoclastogenesis