

Contribution à l'étude de la **NÉO-VASCULARISATION** du **CARTILAGE ARTHROSIQUE**

Identification de la ***BONE SIALOPROTEIN*** comme
FACTEUR CLÉ dans l'arthrose



Laurence Pesesse

Licenciée en Sciences Biologiques

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques



Année académique 2013-2014

Contribution à l'étude de la **NÉO-VASCULARISATION** du **CARTILAGE ARTHROSIQUE**

Identification de la ***BONE SIALOPROTEIN*** comme
FACTEUR CLÉ dans l'arthrose

Laurence Pesesse

Licenciée en sciences biologiques

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques



Directeur de l'unité de recherche et Promoteur : Professeur Yves Henrotin

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	p.1
INDEX DES FIGURES & TABLES.....	p.5
OBJECTIFS.....	p.11
INTRODUCTION.....	p.13
1. Le cartilage articulaire.....	p.13
1.1. Origine.....	p.13
1.2. Composition.....	p.13
1.2.1. Les cellules.....	p.15
1.2.2. La matrice extracellulaire.....	p.15
1.3. Architecture.....	p.18
1.4. Propriétés mécaniques.....	p.19
2. Physiopathologie de l'arthrose.....	p.21
2.1. Modifications anatomo-pathologiques.....	p.23
2.1.1. Le cartilage.....	p.23
2.1.2. L'os sous-chondral.....	p.25
2.1.3. La membrane synoviale.....	p.26
2.2. Les boucles physiopathologiques.....	p.26
2.2.1. La boucle cartilagino-cartilagineuse.....	p.27
2.2.1.1. Dégradation.....	p.28
2.2.1.2. Ossification endochondrale.....	p.30
2.2.2. La boucle ostéo-cartilagineuse.....	p.32
2.2.2.1. Voies de communication.....	p.32
2.2.2.2. Echanges.....	p.33
2.2.2.3. Changements phénotypiques.....	p.33
2.2.2.4. Néo-vascularisation.....	p.35
2.2.2.4.1. Angiogenèse et remodelage de l'os sous-chondral.....	p.35
2.2.2.4.2. Angiogenèse et ossification endochondrale.....	p.36
2.2.2.4.3. Effet des médiateurs de l'inflammation sur l'angiogenèse.....	p.36
2.2.2.4.4. Présence d'un déséquilibre entre facteurs angiogéniques.....	p.37
2.2.2.4.5. Facteurs anti-angiogéniques.....	p.37

2.2.2.4.6.	Facteurs po-angiogéniques	p.39
2.2.2.4.7.	Les métalloprotéinases matricielles	p.40
2.2.2.5.	Minéralisation de la matrice extracellulaire.....	p.42
2.2.3.	La boucle synovio-cartilagineuse	p.44
2.3.	Les facteurs biochimiques de l'arthrose.....	p.44
2.3.1.	Les facteurs locaux.....	p.46
2.3.2.	Les cytokines	p.46
2.3.3.	Les formes activées de l'oxygène et les prostanoïdes.....	p.48
2.3.4.	Les adipokines	p.48
MATÉRIEL & MÉTHODES		p.51
1.	Culture primaire de chondrocytes arthrosiques	p.52
2.	Collecte des milieux conditionnés par les chondrocytes.....	p.54
3.	Tests fonctionnels d'étude de l'angiogenèse.....	p.55
3.1.	<i>Wound healing</i> ou cicatrisation	p.56
3.2.	Migration et invasion en temps réel.....	p.57
3.3.	Adhésion	p.58
4.	Pré-traitement des HUVEC avec le peptide GRGDS.....	p.58
5.	Préparation des extraits cellulaires et analyses géniques	p.59
6.	Analyses biochimiques.....	p.60
6.1.	Mesure de l'activité transglutaminase	p.60
7.	Histologie	p.62
7.1.	Analyse de la dégradation du cartilage selon le <i>photographic chondropathy score</i>	p.62
7.2.	Analyse de la dégradation du cartilage selon le score de Mankin.....	p.63
8.	Immunohistochimie.....	p.65
8.1.	Analyse de la densité vasculaire	p.65
8.2.	Détection de la <i>bone sialoprotein</i>	p.65
9.	Analyses statistiques.....	p.66
RÉSULTATS & DISCUSSION		p.67
Partie 1 : Mise au point d'un modèle de culture de chondrocytes arthrosiques hypertrophiques		p.67

1. Influence du modèle de culture sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes	p.68
2. Influence de la composition du milieu sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes	p.70
2.1. Étude des gènes caractéristiques des chondrocytes matures	p.70
2.2. Étude des gènes caractéristiques des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques	p.72
2.3. Étude des enzymes impliquées dans la minéralisation de la matrice extracellulaire	p.74
3. Cinétique de l'expression/de l'activité des marqueurs spécifiques de l'hypertrophie ...	p.75
4. Étude de la morphologie des chondrocytes dans différentes conditions de culture	p.78
Partie 1 : Discussion.....	p.80
Partie 2 : Effet des milieux conditionnés par les chondrocytes arthrosiques hypertrophiques sur l'angiogenèse	p.87
1. Effet sur le <i>wound healing</i>	p.87
2. Effet sur la migration et l'invasion des HUVEC en temps réel	p.89
3. Effet sur l'adhésion des HUVEC	p.91
Partie 2 : Discussion	p.93
Partie 3 : Identification d'un facteur angiogénique associé à l'hypertrophie des chondrocytes arthrosiques	p.95
1. Criblage de facteurs angiogéniques	p.95
2. Étude de la production de la BSP	p.96
3. Corrélation entre la BSP et les marqueurs de l'hypertrophie	p.97
4. Implication d'une protéine à domaine RGD dans l'adhésion des HUVEC induite par les milieux conditionnés de chondrocytes hypertrophiques	p.99
Partie 3 : Discussion.....	p.100
Partie 4 : Étude de la régulation de la BSP et effet sur le métabolisme des chondrocytes	p.105
1. Effet du PTHrP sur l'expression et la production de la BSP par les chondrocytes arthrosiques	p.105

2. Effet de l'IL-1 β et du TNF α sur l'expression et la production de la BSP par les chondrocytes arthrosiques.....	p.108
3. Effet de la BSP sur le métabolisme des chondrocytes arthrosiques.....	p.110
Partie 4 : Discussion	p.113
Partie 5 : Étude de l'association entre la présence de BSP et la sévérité des lésions du cartilage articulaire arthrosique	p.115
1. Analyse de la dégradation du cartilage articulaire.....	p.116
2. Détection de la BSP dans le cartilage articulaire	p.118
3. Évaluation de l'association entre la présence de BSP et la sévérité des lésions du cartilage articulaire.....	p.119
Partie 5 : Discussion	p.123
Partie 6 : Étude de l'association entre la présence de la BSP et la néo-vascularisation du cartilage articulaire	p.125
1. Analyse de la densité vasculaire au niveau de la <i>tidemark</i>	p.125
2. Évaluation de l'association entre la présence de BSP et la densité vasculaire au niveau de la <i>tidemark</i>	p.126
Partie 6 : Discussion	p.127
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	p.129
BIBLIOGRAPHIE.....	p.137
ANNEXES.....	p.151

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADAMTS :	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANK :	<i>progressive ankylosis protein</i>
ANKH :	<i>progressive ankylosis protein homolog</i>
bFGF :	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bFGF :	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP :	<i>bone morphogenic protein</i>
BMP :	<i>bone morphogenic protein</i>
BSA :	<i>bovine serum albumin</i>
BSP :	<i>bone sialoprotein</i>
CH :	chondrocyte hypertrophique
CI :	<i>cell index</i>
CII :	<i>cell invasion index</i>
CNH :	chondrocyte non-hypertrophique
Col10a1 :	gène codant le collagène de type X
Col2a1 :	gène codant le collagène de type II
CPB :	phosphate de calcium basique
CTGF :	<i>connective tissue growth factor</i>
DMEM :	<i>Dubbelco's modified Eagle medium</i>
ELISA :	dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
Epi :	phosphate inorganique extracellulaire
Eppi :	pyrophosphate inorganique extracellulaire
FBS :	<i>fœtal bovine serum</i>
GAPDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GRGDS :	Glycine-Arginine-Glycine-Acide aspartique-Sérine
HIF :	<i>hypoxia-inductible factor</i>
HPRT :	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HUVEC :	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IGF :	<i>insulin-like growth factor</i>
Ihh :	<i>indian hedgehog</i>
IL :	interleukine
ITS :	insuline-transférine-sélénium
MMP :	métalloprotéinase matricielle
NO :	monoxyde d'azote
NTPPPH :	<i>nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase</i>
PA :	phosphatase alcaline
PCS :	<i>photographic chondropathy score</i>
PG :	protéoglycane
PGE ₂ :	prostaglandine E ₂
PPCD :	pyrophosphate de calcium dihydraté
Ppi :	pyrophosphate inorganique
PTH-R :	récepteur de l'hormone parathyroïdienne
PTHrP :	<i>parathyroid hormone related peptide</i>
rBSP :	<i>bone sialoprotein</i> recombinante
RGD :	Arginine-Glycine-Acide aspartique
RTCA :	<i>real-time cell analyser</i>
Runx :	<i>runt-related factor</i>
Saos-2 :	<i>human osteosarcoma cell line</i>
SM :	syndrome métabolique
Sox :	<i>SRY (sex determining region on Y)-box</i>

TG : transglutaminase
TGF : *transforming growth factor*
TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinase*
TNF : *tumor necrosis factor*
TSP : thrombospondine
UG : ultroser G
VEGF : *vascular endothelial growth factor*
VEGFR : *vascular endothelial growth factor receptor*
VM : vésicule matricielle

INDEX DES FIGURES & TABLES

INTRODUCTION

<u>Figure I1</u> : Etapes de la différenciation de chondrocytes et principaux facteurs impliqués	p. 14
<u>Figure I2</u> : Schéma de la composition du tissu cartilagineux.....	p.16
<u>Figure I3</u> : Schéma d'une molécule de protéoglycan	p.16
<u>Figure I4</u> : Schéma des compartiments de la matrice extracellulaire.....	p.17
<u>Figure I5</u> : Schéma de l'architecture du cartilage articulaire	p.18
<u>Figure I6</u> : Mise en évidence du cartilage articulaire, de la plaque ostéochondrale et de l'os sous-chondral dans une coupe histologique.....	p.19
<u>Figure I7</u> : Schéma explicatif du syndrome métabolique	p.22
<u>Figure I8</u> : Mise en évidence de fissurations et fractures, <i>clusters</i> de chondrocytes et multiplication de la <i>tidemark</i> dans des coupes histologiques	p.24
<u>Figure I9</u> : Schéma des étapes de la formation des clusters de chondrocytes.....	p.29
<u>Figure I10</u> : Mise en évidence de canaux au niveau de la <i>tidemark</i>	p.34
<u>Figure I11</u> : Schéma du mécanisme de formation des cristaux de la matrice extracellulaire	p.43
<u>Figure I12</u> : Schéma des mécanismes physiopathologiques de l'arthrose.....	p.45
<hr/>	
<u>Table I1</u> : Principaux facteurs impliqués dans l'ossification endochondrale	p.31
<u>Table I2</u> : Régulateurs de l'angiogenèse dans le cartilage articulaire arthrosique ou sain	p.41

Table I3 : Principales cytokines impliquées dans la régulation du métabolisme du cartilage p.47

MATÉRIEL & MÉTHODES

Figure M1 : Schéma des méthodes de culture des chondrocytes arthrosiques..... p.53

Figure M2 : Schéma de la méthode de collecte des milieux conditionnés par les chondrocytes arthrosiques..... p.54

Figure M3 : Principe de réalisation du test de *wound healing*..... p.56

Figure M4 : Schéma des puits utilisés pour la migration et l'invasion en temps réel..... p.57

Figure M5 : Principe d'utilisation du GRGDS p.58

Figure M6 : Illustration du système de classement des articulations de genou selon le *photographic chondropathy score* p.62

Table M1 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées en PCR p.59

Table M2 : Méthodes de dosage p.61

Table M3 : Critères d'évaluation pour l'établissement du score de Mankin p.64

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Figure R1 : Comparaison de l'expression de gènes caractéristiques des chondrocytes matures, pré-hypertrophiques et hypertrophiques et de l'activité d'enzymes impliquées dans la minéralisation par les chondrocytes arthrosiques dans les modèles de culture en monocouche et en billes d'alginate p.69

Figure R2 : Expression des gènes caractéristiques du phénotype mature par des chondrocytes cultivés en billes d'alginate dans différents milieux de culture p.71

<u>Figure R3</u> : Expression des gènes caractéristiques du phénotype pré-hypertrophique et hypertrophique par des chondrocytes cultivés en billes d'alginate dans différents milieux de culture.....	p.73
<u>Figure R4</u> : Activité des enzymes de minéralisation par des chondrocytes cultivés en billes d'alginate dans différents milieux de culture.....	p.74
<u>Figure R5</u> : Cinétique d'expression des marqueurs de l'hypertrophie et d'activité des enzymes impliquées dans la minéralisation par les chondrocytes cultivés en billes d'alginate dans un milieu enrichi en sérum pendant 28 jours.....	p.77
<u>Figure R6</u> : Comparaison de la morphologie des chondrocytes arthrosiques cultivés en billes d'alginate dans différentes conditions de culture.....	p.79
<u>Figure R7</u> : Evaluation de l'effet des milieux conditionnés par les chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques ou hypertrophiques sur la migration des HUVEC dans un test de <i>wound healing</i>	p.88
<u>Figure R8</u> : Evaluation de l'effet des milieux conditionnés par les chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques ou hypertrophiques sur la migration et l'invasion des HUVEC en temps réel.....	p.90
<u>Figure R9</u> : Evaluation de l'effet des milieux conditionnés par les chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques ou hypertrophiques sur l'adhésion des HUVEC	p.92
<u>Figure R10</u> : Détection de BSP dans les extraits cellulaires et les milieux conditionnés par les chondrocytes hypertrophiques	p.96
<u>Figure R11</u> : Corrélation du niveau d'expression de BSP avec les marqueurs de l'hypertrophie et les enzymes de la minéralisation.....	p.98
<u>Figure R12</u> : Effet du pré-traitement des HUVEC avec le peptide GRGDS sur l'adhésion des HUVEC en présence des milieux conditionnés par les chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques ou hypertrophiques.....	p.99
<u>Figure R13</u> : Effet de l'addition du PTHrP au milieu de culture sur l'expression et la production de BSP par les chondrocytes hypertrophiques.....	p.107

<u>Figure R14</u> : Effet de l'addition d'IL-1 β ou de TNF α au milieu de culture sur l'expression et la production de BSP par les chondrocytes hypertrophiques.....	p.109
<u>Figure R15</u> : Effet de l'addition de différentes concentrations de BSP recombinante au milieu de culture de chondrocytes arthrosiques stimulés ou non par l'IL-1 β sur la production de la TSP-1	p.111
<u>Figure R16</u> : Effet de l'addition de différentes concentrations de BSP recombinante au milieu de culture de chondrocytes arthrosiques stimulés ou non par l'IL-1 β sur la production de l'IL-8	p.112
<u>Figure R17</u> : Photographies de coupes histologiques représentatives de différents niveaux du score de Mankin.....	p.117
<u>Figure R18</u> : Détection de la BSP dans des coupes de cartilage articulaire humain arthrosique	p.118
<u>Figure R19</u> : Comparaison du PCS des articulations selon l'absence ou la présence de la BSP dans les coupes histologiques de cartilage articulaire	p.120
<u>Figure R20</u> : Comparaison du score de Mankin du cartilage selon l'absence ou la présence de la BSP dans les coupes histologiques de cartilage articulaire	p.120
<u>Figure R21</u> : Comparaison des scores de critères composants le score de Mankin du cartilage selon l'absence ou la présence de la BSP dans les coupes histologiques de cartilage articulaire.....	p.122
<u>Figure R22</u> : Identification d'un vaisseau sanguin traversant la <i>tidemark</i> et aboutissant dans la couche profonde du cartilage dans une coupe histologique de cartilage articulaire humain arthrosique.....	p.125
<u>Figure R23</u> : Comparaison de la densité vasculaire au niveau de la <i>tidemark</i> selon l'absence ou la présence de la BSP dans les coupes histologiques de cartilage articulaire	p.126
<hr/>	
<u>Table R1</u> : Analyse du niveau d'expression de facteurs pro- et anti-angiogéniques par les chondrocytes non-hypertrophiques et hypertrophiques.....	p.96

Table R2 : Moyenne d'âge et proportion de genre des individus inclus dans l'étude
histologique p.115

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Figure C1 : Schéma du rôle de la BSP dans le cartilage arthrosique..... p.135

OBJECTIFS

L'arthrose est une pathologie articulaire d'origine plurifactorielle touchant une proportion grandissante de la population. A ce jour, il n'existe pas de traitement permettant d'interagir significativement avec la progression de la maladie. Les traitements sont essentiellement symptomatiques. Ils ne modifient pas sensiblement l'évolution naturelle de la maladie et leurs effets structurels sont controversés. Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, et de développer des traitements avec une action bénéfique sur les altérations métaboliques et structurelles des tissus articulaires. Parmi ceux-ci, le cartilage articulaire est une cible privilégiée car la dégénérescence de ce tissu est un élément important à la pathogénie de l'arthrose.

Dans les conditions normales, le cartilage est avasculaire et non innervé. Ces caractéristiques permettent au tissu de supporter les contraintes mécaniques importantes générées par les mouvements, plus particulièrement par la locomotion. Cependant, chez les patients souffrant d'arthrose, des structures vasculaires ont été identifiées dans le cartilage. L'ensemble de notre travail repose sur l'hypothèse que la néo-vascularisation du cartilage est liée à la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques et à la minéralisation de la matrice extracellulaire. Ce phénomène présente de nombreuses similitudes avec l'ossification endochondrale observée au niveau du cartilage de croissance. Les chondrocytes s'hypertrophient, synthétisent de la phosphatase alcaline (PA), puis des bourgeons conjonctivo-vasculaires envahissent le cartilage. Cet aspect particulier de la physiopathologie de l'arthrose est très peu étudié et les mécanismes qui sous-entendent la néo-vascularisation du cartilage sont méconnus.

L'objectif principal de notre travail était d'établir le lien entre le phénotype hypertrophique des chondrocytes et la néo-vascularisation du cartilage. Dans ce but, nous avons mis au point un modèle de culture de chondrocytes permettant d'étudier les conditions expérimentales qui favorisaient la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques. Il s'est avéré que la présence de sérum était un facteur déterminant. Cette observation suggérait un lien entre la vascularisation cartilage et la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Ensuite, nous avons tenté d'identifier parmi quelques facteurs pro- et anti-angiogéniques connus ceux qui étaient modulés de façon importante avec la différenciation hypertrophique. Nous avons également recherché le lien entre ces facteurs angiogéniques et quelques marqueurs de l'hypertrophie et démontré l'implication de la *bone sialoprotein* (BSP). L'activité pro-angiogénique des chondrocytes hypertrophiques a été mise en évidence grâce à l'utilisation de plusieurs tests fonctionnels permettant d'étudier la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules endothéliales. Enfin, une étude histologique de biopsies de cartilage sain et arthrosique a permis d'établir une association de la présence de BSP avec la sévérité des lésions du cartilage et avec le nombre de structures vasculaires.

INTRODUCTION

1. LE CARTILAGE ARTICULAIRE

1.1. Origine

Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé qui recouvre les extrémités des os pour permettre le mouvement de l'articulation. Il est issu de cellules mésenchymateuses qui prolifèrent et se différencient en chondrocytes. Dans le cartilage articulaire adulte, les chondrocytes restent quiescents et possèdent une activité métabolique faible qui leur permet de renouveler les composants de la matrice extracellulaire qui les entoure. Au contraire, dans le cartilage de croissance, les chondrocytes continuent à se différencier et participent au processus d'ossification endochondrale aboutissant à la formation des os longs. Au cours de ce processus, les chondrocytes de la plaque de croissance entrent dans une phase proliférative puis deviennent pré-hypertrophiques et ensuite hypertrophiques. Ils secrètent alors des composants nécessaires à la minéralisation de la matrice et entrent finalement en apoptose pour être remplacés par des ostéoblastes qui vont venir apposer l'os. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la régulation des voies de différenciation des chondrocytes. Sox9 est le facteur de transcription qui initie la différenciation chondrocytaire avec l'aide des cofacteurs L-Sox5 et Sox6. Ils forment ensemble un complexe qui se lie au promoteur du gène codant le collagène de type II (col2a1) et active son expression [14]. Au

stade de chondrocyte différencié, le *fibroblast growth factor* (FGF) et son récepteur le *fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3) contrôlent l'entrée dans la phase proliférative en induisant un blocage de l'*indien hedgehog* (ihh) et en agissant sur l'expression du gène *sox9*. L'ihh est produit par les chondrocytes pré-hypertrophiques et induit la prolifération des chondrocytes en favorisant la sécrétion de la *bone morphogenic protein* (BMP)-2. L'ihh stimule également l'expression du *parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) qui agit en inhibant la conversion des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes hypertrophiques. L'ihh et le PTHrP établissent en fait une boucle de *feedback* négatif dans laquelle l'ihh stimule l'expression du PTHrP qui lui-même inhibe la différenciation des chondrocytes vers l'hypertrophie. L'action inhibitrice du PTHrP consiste à augmenter l'activité transcriptionnelle de *Sox9* ce qui contribue à maintenir le phénotype des cellules de la zone pré-hypertrophique [15]. Le facteur de transcription *runx2*, est responsable de l'engagement des chondrocytes vers la voie de l'hypertrophie (Figure 11) [16].

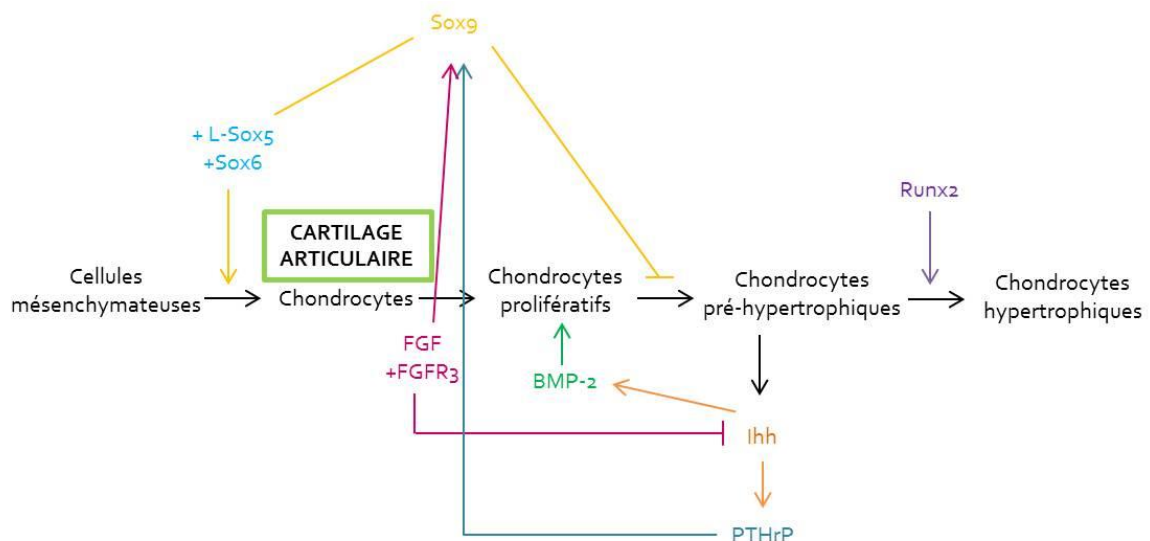


Figure 11 : Principales étapes et mode d'action des facteurs impliqués dans la coordination des étapes de la différenciation des chondrocytes à partir des cellules mésenchymateuses. Dans le cartilage articulaire adulte sain, les chondrocytes sont maintenus dans un état quiescent et ne se différencient plus.

1.2. Composition

Le cartilage articulaire est un tissu d'environ 2,5 millimètres d'épaisseur [17] constitué d'un seul type de cellules enchâssées dans la matrice extracellulaire. Une des particularités du cartilage articulaire est qu'il est dépourvu de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et d'innervation.

1.2.1. Les cellules

Le cartilage articulaire est constitué d'un seul type de cellules spécialisées, les chondrocytes. Ils occupent 1 à 10% du volume du cartilage et leur densité varie en fonction du type d'articulation, de la localisation des cellules au sein du cartilage et en fonction de l'âge de l'individu [18]. Dans l'environnement avasculaire que représente le cartilage, le chondrocyte privilégie la glycolyse anaérobie en utilisant essentiellement le glucose provenant du liquide synovial comme substrat énergétique ainsi que pour assurer la synthèse de la glucosamine, un constituant majeur des protéoglycanes (PG) [19]. Les chondrocytes sont responsables de la synthèse et du renouvellement de la matrice extracellulaire du cartilage [20], ils assurent ainsi un équilibre dynamique et participent au maintien de l'homéostasie du tissu.

1.2.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du cartilage est essentiellement composée d'eau (70 à 80% du poids frais), d'un réseau de fibres de collagène de type II (10-20% du poids frais, 90% des fibres de collagène du cartilage) et d'une substance fondamentale riche en molécules d'agrécan (AGG) (10% du poids frais, 90% des PG du cartilage) [21]. On trouve également des molécules minoritaires telles que des collagènes de type IV et IX, de petits PG (biglycane, décorine et fibromoduline), de l'acide hyaluronique ainsi que d'autres protéines

non-collagéniques comme la fibronectine et la *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) (Figure I2) [3]. Les molécules d'AGG sont constituées d'une protéine axiale sur laquelle se fixent deux types de glycosaminoglycanes, le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératane. La protéine axiale se lie à l'acide hyaluronique par une protéine de liaison (Figure I3). Dans les conditions normales, la matrice est sujette à un processus de remodelage dynamique dans lequel des niveaux faibles de facteurs anaboliques et d'enzymes de dégradation (métalloprotéinases (MMP) et protéases) sont équilibrées pour que le volume du cartilage soit maintenu.

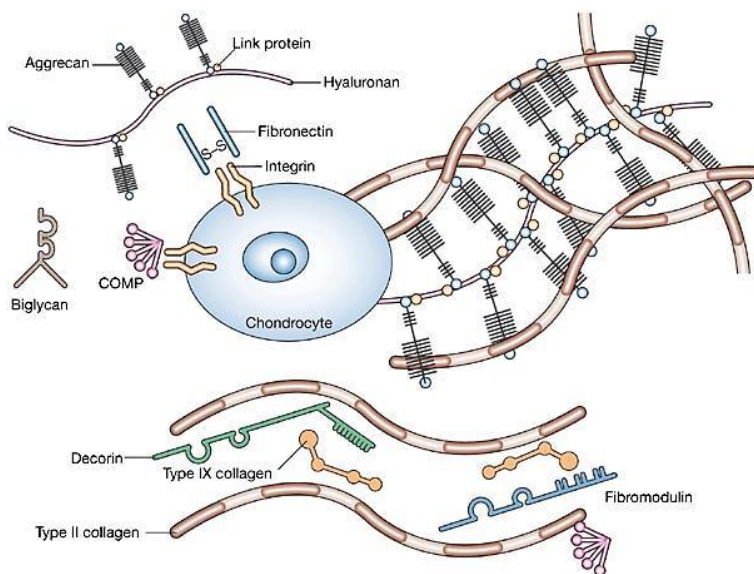


Figure I2 : Représentation schématique des composants du tissu cartilagineux, le chondrocyte et les composants de la matrice extracellulaire qui l'entoure (d'après Chen *et al.*, 2006 [3]).

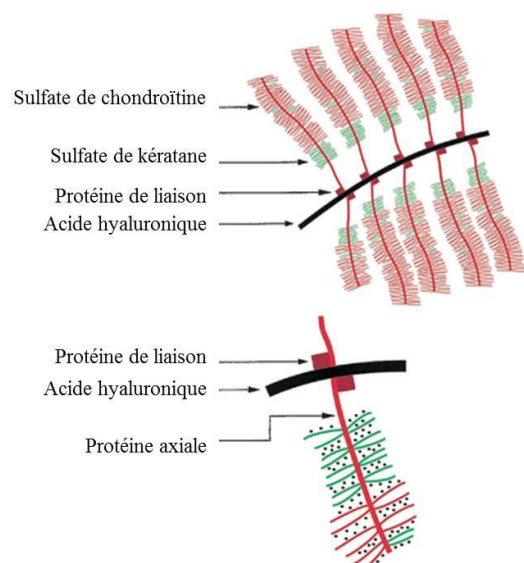


Figure I3 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire d'une molécule de protéoglycane (modifié d'après Jeffrey *et al.*, 2003 [7]).

Différents compartiments peuvent être identifiés dans la matrice sur base de la proximité avec le chondrocyte (Figure I4).

- La matrice pérircellulaire est la zone directement adjacente à la membrane du chondrocyte. Elle contient de grandes quantités d'acide hyaluronique, de PG sulfatés, de biglycane et de glycoprotéines, incluant les protéines de liaison et la laminine. Elle contient par contre une faible teneur en COLII. La matrice pérircellulaire est bordée d'une capsule pérircellulaire composée principalement de collagène de type IV et de fibronectine. La matrice pérircellulaire et la capsule pérircellulaire forment ensemble le chondron qui constitue une protection hydrodynamique contre les forces de pression et contrôle en partie la distribution spatio-temporelle des molécules nouvellement synthétisées [8].
- La matrice territoriale se situe autour de la matrice pérircellulaire, elle est riche en fibrilles de collagène de type II et IV. Les chondrocytes établissent des contacts avec la matrice territoriale grâce à des extensions cytoplasmiques riches en microfilaments [21].
- La matrice interterritoriale constitue l'environnement des chondrocytes, elle est riche en collagènes de type II, IX et XI et en AGG [22].

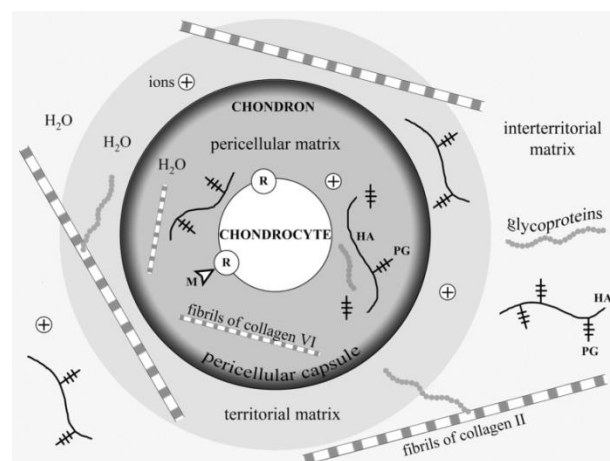


Figure I4 :
Représentation schématique des différents compartiments matriciels du cartilage (d'après Sobol *et al.*, 2011 [8])

1.3. Architecture

L'épaisseur du cartilage articulaire est divisée en quatre couches qui se différencient principalement par le contenu en PG et la disposition des fibres de collagène (Figure 15) [21].

- La couche superficielle du cartilage articulaire est directement en contact avec le liquide synovial. Son épaisseur varie de 4 à 8 μm , ce qui représente 5 à 10% de la hauteur totale du cartilage. Elle renferme des chondrocytes de forme aplatie qui secrètent de la lubriline ou PG-4, une glycoprotéine qui abaisse le coefficient de friction du cartilage [23]. Son contenu en AGG est relativement faible mais elle est enrichie en petits PG (décorine et biglycane).
- La couche moyenne représente 40 à 45% de la hauteur totale du cartilage. Dans cette couche, les chondrocytes adoptent une forme sphérique et se trouvent au sein d'un réseau de fibrilles de collagène qui s'entrecroisent obliquement [19].
- La couche profonde du cartilage articulaire représente elle aussi 40 à 45% de la hauteur du cartilage. Elle est composée d'épaisses fibrilles de collagène, orientées perpendiculairement à la surface. On observe dans cette couche des chondrocytes de forme sphérique disposés en colonnes [21]. La couche profonde est la plus riche en PG et la densité cellulaire y est la plus faible du cartilage [19].

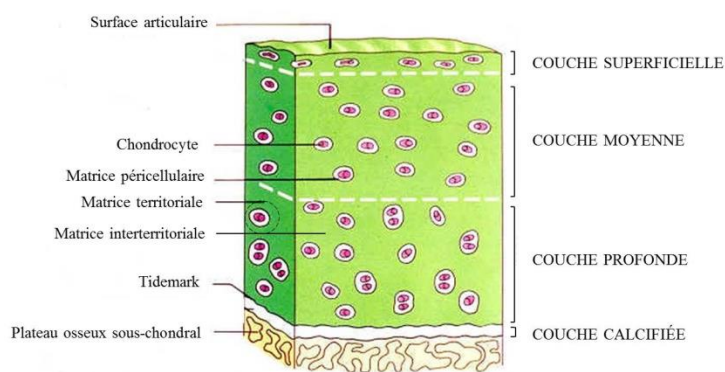


Figure 15 : Représentation schématique de l'architecture du cartilage articulaire. La *tidemark* sépare la couche profonde de la couche calcifiée. Le cartilage articulaire repose sur une couche d'os cortical, le plateau osseux sous-chondral.

La limite entre la couche profonde et la couche calcifiée du cartilage est marquée par une zone basophile nommée *tidemark*, représentant le front de minéralisation de la matrice extracellulaire. L'ensemble fonctionnel formé par la couche calcifiée du cartilage et le plateau osseux sous-chondral est appelé plaque ostéochondrale (Figure I6) [24]. Le plateau sous-chondral est une couche d'os compact très vascularisé de plus ou moins 0,6 mm située entre le cartilage calcifié et l'os trabéculaire [25]. La fonction principale du plateau sous-chondral est d'absorber les contraintes mécaniques exercées sur l'articulation. Il assure également une partie des apports nutritifs du cartilage. En effet, les vaisseaux terminaux présents au niveau du plateau sous-chondral sont en contact direct avec la couche profonde du cartilage [26, 27]. Ils délivrent au cartilage environ 50% de ses besoins en glucose et en oxygène [25].

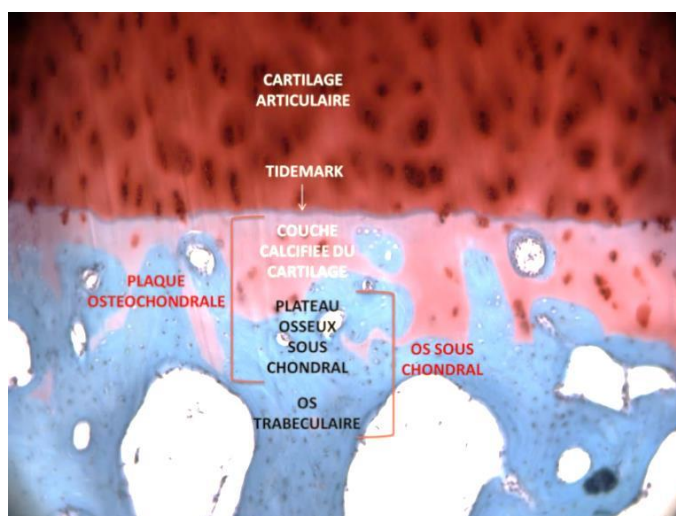


Figure I6 : Coupe de cartilage sain coloré à l'hématoxyline/vert lumière/safranine-O. La *tidemark* sépare la couche profonde et la couche calcifiée du cartilage articulaire. La plaque ostéochondrale est constituée de la couche calcifiée du cartilage et du plateau osseux sous-chondral. L'os sous-chondral est composé du plateau osseux sous-chondral et d'une portion d'os trabéculaire (grossissement 10x) (d'après Henrotin, 2012 [4]).

1.4. Propriétés mécaniques

Le cartilage est à la fois résistant et élastique, il est conçu pour absorber les contraintes mécaniques auxquelles l'articulation est soumise. Ses propriétés s'expliquent par sa composition et son architecture. En effet, la grande résistance du cartilage aux pressions appliquées au niveau des articulations est assurée par le réseau dense de fibres de collagènes. Les fibres sont orientées de façon parallèle à la surface dans la couche

superficielle, de façon aléatoire dans la couche moyenne et perpendiculairement à la surface dans la couche profonde du cartilage afin d'ancrer fermement le tissu dans la couche d'os sous-chondral. L'élasticité du tissu s'explique par le caractère hydrophile des PG qui permet la sortie des molécules d'eau hors de la zone de compression lors de l'application d'une charge et le retour vers le cartilage lors du relâchement. Le cartilage articulaire possède un coefficient de friction extrêmement faible, ce qui permet le glissement des extrémités épiphysaires des os. Ces propriétés lui permettent d'assurer ses fonctions principales à savoir de participer à la transmission et à l'amortissement des contraintes mécaniques exercées sur l'articulation [19].

2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ARTHROSE

L'arthrose est la forme de maladie articulaire la plus répandue, elle a été définie par le collège américain de rhumatologie (ACR) comme « un groupe de conditions hétérogènes qui conduisent à des signes et symptômes articulaires qui sont associés à une intégrité défective du cartilage articulaire en plus de changements relatifs dans l'os sous-jacent aux marges de l'articulation ». Bien que souvent associée au vieillissement, l'arthrose n'est pas une maladie directement liée à l'âge [28]. Elle peut être usuellement classifiée comme une maladie primaire (arthrose idiopathique) ou secondaire lorsque des causes de prédisposition évidentes ont été identifiées (traumatisme, facteurs endocriniens, neurologiques et métaboliques) [29]. Les différentes formes cliniques d'arthroses peuvent résulter de l'action de facteurs mécaniques, génétiques, traumatiques ou encore systémiques. L'influence de facteurs généraux a effectivement été mise en évidence par la contribution du tissu graisseux dans la réaction inflammatoire observée dans l'articulation arthrosique. L'obésité constitue un des facteurs de risque majeur de l'arthrose, elle favorise sa survenue d'une part à cause des contraintes mécaniques élevées sur les articulations portantes liées au surpoids de l'individu et d'autre part par la production de cytokines au niveau des tissus adipeux, les adipokines (leptine, résistine, adiponectine et visfatine), qui contribuent à l'inflammation des tissus de l'articulation. Cette idée est appuyée par l'augmentation de la fréquence de l'arthrose digitale chez les patients obèses avec l'adiponectine représentant un marqueur prédictif de la progression structurale de l'arthrose [30, 31]. Au-delà de ces observations, le concept récent qui catégorise certaines formes d'arthrose au rang de maladie métabolique résulte de la constatation d'une association entre l'arthrose et le syndrome métabolique. Le syndrome métabolique (SM) désigne un ensemble de troubles liés à la présence d'anomalies glucido-lipidiques associées à l'insulino-résistance, à l'hypertension et à l'obésité

abdominale. Lorsqu'ils surviennent conjointement, ces troubles métaboliques accroissent le risque de diabète de type II, de troubles cardio-vasculaires et d'accident vasculaire cérébral [32]. Plusieurs études ont été menées sur des cohortes de patients et les résultats ont montré que le risque de gonarthrose augmentait avec le nombre de facteur définissant un syndrome métabolique [33-35] (Figure 17).

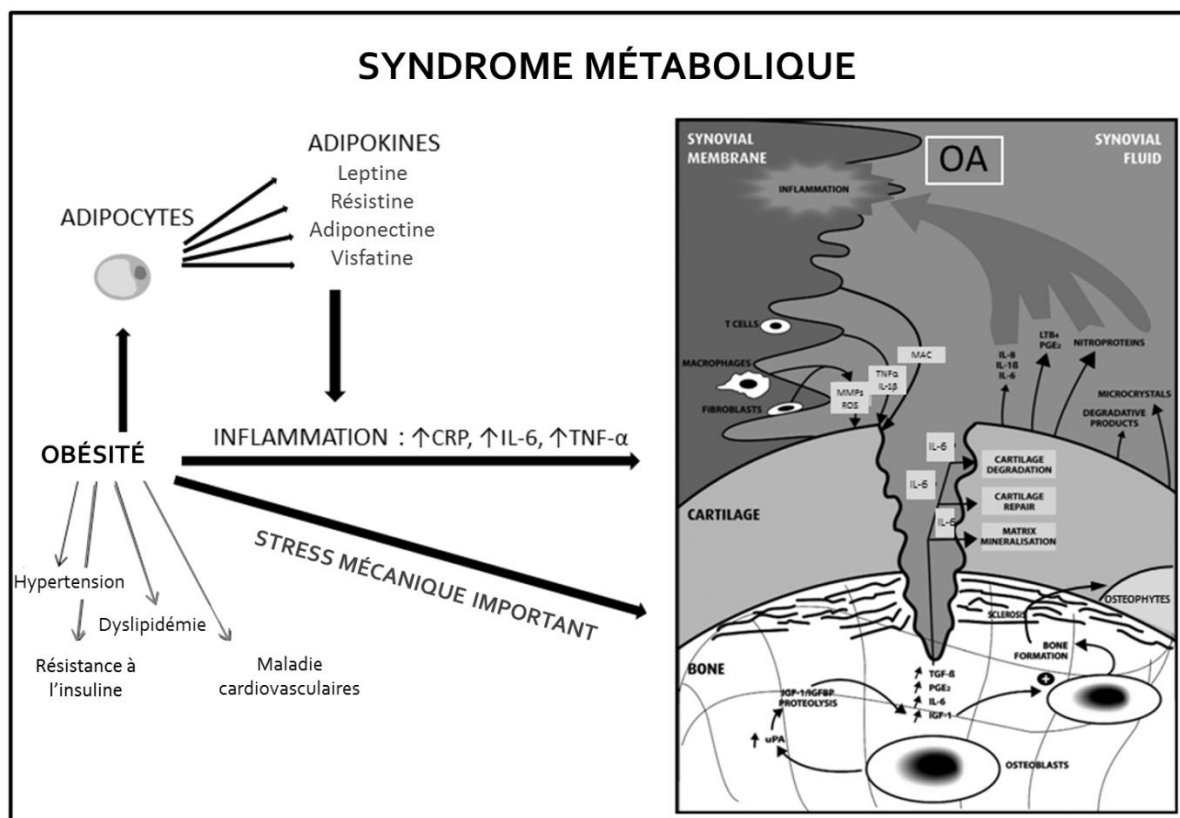


Figure 17 : Le syndrome métabolique est lié à l'obésité et résulte en un ensemble de troubles métaboliques qui augmentent les risques d'hypertension, de résistance à l'insuline, de dyslipidémie et de maladies cardiovasculaires. L'obésité joue un double rôle dans l'arthrose, elle incite sa survenue par le stress mécanique important appliqué aux articulations portantes et par la production d'adipokines qui favorisent la réaction inflammatoire en augmentant certaines cytokines (modifié d'après Henrotin, 2005 [12]).

2.1. Modifications anatomo-pathologiques

L'arthrose constitue un processus dynamique impliquant tous les tissus de l'articulation et également les tissus péri-articulaires. Elle est caractérisée par des modifications principalement au niveau des tissus osseux, synoviaux et cartilagineux et touche également les tendons, la moelle osseuse, les muscles péri-articulaires, les ligaments et les tissus nerveux [36]. Nous nous contenterons ici de décrire en détails les modifications observables dans le cartilage, l'os et la membrane synoviale arthrosique.

2.1.1. Le cartilage

Le cartilage articulaire arthrosique subit une dégradation progressive causée par le déséquilibre entre l'activité anabolique et catabolique des chondrocytes qui entraîne le bouleversement de la composition de la matrice extracellulaire. Il est effectivement largement admis que l'arthrose résulte d'un déséquilibre métabolique causé par les tentatives de réparation initiées par les cellules en réponse aux processus de dégradation tissulaires [37]. Les modifications structurelles et fonctionnelles aboutissant à la dégradation du cartilage arthrosique résultent d'un stress, la plupart du temps mécanique, appliqué à un cartilage articulaire normal ou de sollicitations mécaniques normales exercées sur un cartilage déjà fragilisé [38]. L'analyse du cartilage articulaire arthrosique révèle immédiatement l'état détérioré du cartilage qui dans la plupart des cas avancés d'arthrose peut disparaître complètement laissant entrevoir l'os sous-chondral. Les dommages observés sont principalement des fissures et des fibrillations qui apparaissent au niveau de la surface articulaire (Figure I8A) et dont la profondeur augmente avec la sévérité de la maladie [39-41]. Microscopiquement, la densité cellulaire est modifiée. Une hypercellularité s'identifie par la présence d'agrégats de chondrocytes (ou *clusters*) (Figure I8B).

Par contre, dans les formes sévères d'arthrose la densité de chondrocytes diminue consécutivement à l'apoptose des cellules [42]. La quantité de PG présents dans la matrice extracellulaire est également un marqueur de la dégradation du cartilage puisqu'elle diminue progressivement avec la sévérité de la maladie [43]. Des zones de minéralisation de la matrice extracellulaire peuvent apparaître [44]. Quant à la *tidemark*, elle apparaît multipliée dans le cartilage arthrosique [45] (Figure I8C). Ce phénomène est un indicateur de progression et de l'avancée du front de minéralisation vers le cartilage non-calcifié qui se traduit par un épaissement de la couche calcifiée du cartilage. Le dédoublement de la *tidemark* serait la conséquence d'une réactivation du système d'ossification endochondrale associée à une différenciation hypertrophique des chondrocytes et à la minéralisation de la matrice du cartilage. En effet, l'étude histologique de cette zone met en évidence la présence de chondrocytes hypertrophiques (CH) au voisinage de la *tidemark*. Notons que la réplication de la *tidemark* précède l'apparition des lésions du cartilage et constitue donc un signe précoce de l'arthrose. Enfin, l'intégrité de la *tidemark* peut être compromise par la traversée de canaux provenant de l'os sous-chondral vers le cartilage [46]. Il existe plusieurs méthodes d'évaluation histopathologiques établies à partir d'observations macroscopiques [10, 47] ou microscopiques [39, 48] qui tiennent compte des modifications structurelles observées dans le cartilage arthrosique.



Figure I8 : Modifications structurelles du cartilage arthrosique. A) Fissurations et fractures de la surface articulaire, B) Clusters de chondrocytes, C) Multiplication de la *tidemark*. Les flèches indiquent la *tidemark*.

2.1.2. L'os sous-chondral

Les ostéoblastes de l'os sous chondral, lorsqu'ils sont soumis à de fortes contraintes mécaniques, expriment un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique contribuant aux changements structurels observables dans l'os sous-chondral arthrosique. Il subit un remodelage accru qui résulte en l'augmentation de l'épaisseur du plateau osseux sous chondral, un phénomène appelé sclérose de l'os sous-chondral, correspondant à l'accumulation de substance ostéoïde [49]. De plus, la formation d'os nouvellement synthétisé aux marges de l'articulation aboutit à la formation d'excroissances osseuses observables en radiographie, les ostéophytes. Notons aussi l'apparition de kystes intra-osseux à contenu liquidien fibreux ou nécrotique [50]. On peut également observer l'apparition de lésions de la moelle osseuse au niveau de l'os trabéculaire, visibles uniquement à la résonance magnétique nucléaire [51]. Au niveau du genou arthrosique, ces lésions sont visibles en regard des lésions cartilagineuses, dans les régions où les contraintes mécaniques sont les plus importantes. Par contre, du côté opposé, une ostéopénie est souvent observée [52]. La sclérose osseuse est associée à un épaissement des travées osseuses et de la plaque ostéochondrale, à l'augmentation de la porosité du plateau osseux, à une diminution locale de la minéralisation de l'os et donc de sa rigidité. Il s'agit d'une adaptation de l'os sous chondral aux contraintes mécaniques anormales exercées sur l'articulation. Récemment, il a été démontré que les ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous chondral exprimaient un phénotype particulier, différent sous de nombreux aspects de celui des zones non sclérosées voisines. Ce phénotype est caractérisé par une production anormalement élevée de collagène de type I, d'ostéocalcine, d'ostéopontine, de *progressive ankylosis protein homolog* (ANKH) et de cytokines inflammatoires dont les interleukines (IL)-6 et -8 [53].

2.1.3. La membrane synoviale

La membrane synoviale arthrosique est le siège d'une inflammation qui contribue au gonflement et à la rigidité articulaire. Lorsqu'elle a lieu, cette réaction inflammatoire est secondaire à la dégradation du cartilage. Elle débute en regard des lésions cartilagineuses, et s'étend ensuite à l'ensemble de la membrane synoviale. Les modifications caractéristiques dans la membrane synoviale enflammée observables histologiquement sont une hypertrophie des franges synoviales (replis flottant dans la cavité articulaire) et une augmentation de la densité vasculaire qui s'accompagnent en général d'une infiltration de cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes/macrophages) dans le tissu épaissi par du tissu fibreux [54, 55]. La fibrose de la synoviale est en effet un processus commun, essentiellement observée dans les étapes tardives de l'arthrose [56]. Un processus d'angiogenèse associé à l'inflammation a lieu dans la membrane synoviale arthrosique mais il n'est pas associé à l'angiogenèse observée au sein de la plaque ostéochondrale [57]. Quoique généralement plus importante dans les formes sévères d'arthrose, l'inflammation de la membrane synoviale peut aussi être observée dans les étapes précoces de la progression de la maladie [58].

2.2. Les boucles physiopathologiques

Le chondrocyte occupe une position centrale dans les mécanismes physiopathologiques de l'arthrose. Les principales modifications biologiques responsables du développement de la maladie sont résumées dans trois boucles pathologiques qui impliquent l'activité de facteurs biochimiques au sein du cartilage, de la membrane synoviale et de l'os sous-chondral. Ce sont les boucles cartilagino-cartilagineuse, synovio-cartilagineuse et ostéo-cartilagineuse.

2.2.1. La boucle cartilagino-cartilagineuse

D'un point de vue métabolique, les chondrocytes arthrosiques peuvent exprimer des phénotypes différents selon leur localisation et l'évolution de la pathologie. Le phénotype dit « anabolique » est caractérisé par la synthèse accrue de collagène de type II et de molécules d'AGG. Cette hyperactivité est limitée aux chondrocytes des zones moyennes et profondes du cartilage arthrosique [26] et est observée au stade précoce de la maladie [59]. Dans les stades avancés de la maladie, l'activité catabolique des chondrocytes est prédominante [59]. Le phénotype « catabolique » est caractérisé par la synthèse accrue de MMP. Enfin, les chondrocytes peuvent exprimer un phénotype « hypertrophique » marqué par la production de phosphatase alcaline tissu non spécifique (PA), d'ostéocalcine et de collagène de type X [60, 61] et par l'expression de PTHrP [62], d'annexines [63] et de molécules de la minéralisation [64]. Cette différenciation hypertrophique s'accompagne d'une minéralisation de la matrice extracellulaire, d'un épaissement de la couche calcifiée du cartilage et de la multiplication de la *tidemark*. Il s'agit d'un phénomène d'ossification endochondrale responsable de l'augmentation de la rigidité du cartilage et en conséquence des contraintes mécaniques exercées sur le cartilage sus-jacent. La boucle cartilagino-cartilagineuse se déroule plusieurs phases plus ou moins imbriquées mais distinctes par le phénotype des chondrocytes. Dans une première phase réactionnelle, le déséquilibre métabolique des chondrocytes entraîne la dégradation du cartilage à travers une réponse anabolique suivie d'événements cataboliques. Ensuite, on observe une répétition des événements observables lors de l'ossification endochondrale par des CH.

2.2.1.1. Dégradation

Les chondrocytes entrent premièrement dans une phase anabolique subséquente à un stimulus d'origine mécanique, hormonal, ou autre appliqué au cartilage. Ils prolifèrent, forment des *clusters* et secrètent des molécules de la matrice comme l'AGG, le collagène de type II [65, 66]. Ils produisent également des facteurs de croissance tels que le TGF- β , les BMP et l'*insulin-like growth factor* (IGF)-1 ainsi que des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) qui agissent en stimulant la synthèse des molécules de la matrice [67]. En parallèle, les chondrocytes produisent des molécules du catabolisme, principalement des MMP dont la synthèse est induite par l'IL-1, qui dégradent la matrice péri-cellulaire. Cette phase dite « réactionnelle » est interprétée comme une tentative des chondrocytes à réparer les lésions de la matrice causée par l'initiation du processus arthrosique. Puisque les chondrocytes arthrosiques possèdent un plus grand nombre de récepteurs à l'IL-1 β et moins de récepteurs au TGF- β que les chondrocytes normaux, ils sont plus réceptifs aux signaux cataboliques de l'IL-1 β et moins sensibles à l'effet anabolique du TGF- β [68, 69]. Les clusters de chondrocytes peuvent contenir plus de 20 cellules, ils sont souvent localisés près des fissures et fractures de la couche supérieure du cartilage. Les clusters se forment par prolifération des chondrocytes et la quantité de chondrocytes prolifératifs augmente pendant la progression de l'arthrose [70]. Plusieurs facteurs de croissance peuvent stimuler la formation de *clusters in vitro* et le FGF2 semble être le facteur prédominant [71], il agit en induisant l'expression des protéinases MMP-13 et ADAMTS-4 [72]. Le TGF β et le TGF α peuvent aussi induire la formation de clusters [73, 74]. De la même façon, il a été montré que les stress mécaniques appliqués à des chondrocytes cultivés en suspension pouvaient aussi favoriser la formation de clusters [75]. Les clusters expriment un très grand nombre de protéines qui ne sont pas détectées dans les cellules normales du cartilage et qui suggère

que l'activation inclut principalement des enzymes de dégradation de la matrice et des médiateurs de l'inflammation. Un ensemble de facteurs de croissance exprimés dans les clusters dirige probablement aussi la prolifération dans les clusters et dans les zones de cartilage avoisinantes [11] (Figure I9). La différenciation anormale des chondrocytes est également une voie qui semble impliquée dans l'activation des cellules, cette information se base sur l'observation de marqueurs de l'hypertrophie, tel que le collagène de type X [76], la MMP-13 et runx2 [77] qui sont co-localisés dans presque tous les chondrocytes des clusters observés dans le cartilage arthrosique. Des cellules apoptotiques ont été observées dans les clusters cellulaires [42, 78].

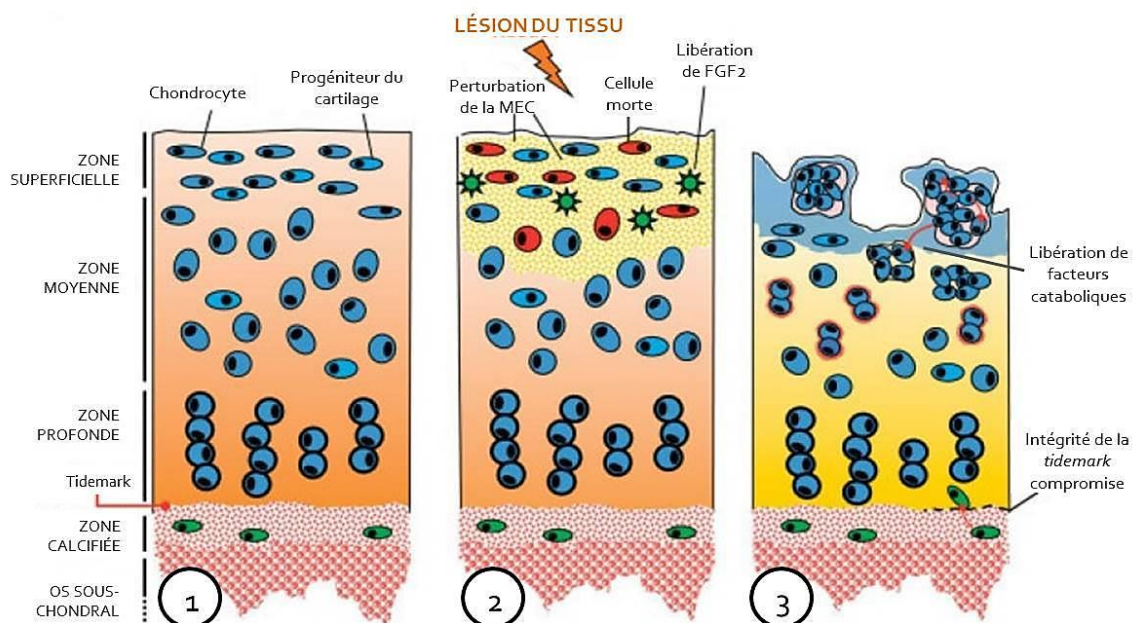


Figure I9 : Représentation schématique des phases de la formation de clusters 1) Organisation du cartilage normal, 2) Cartilage lésé avec mort cellulaire et libération de facteur de croissance à partir de la matrice extracellulaire (MEC), 3) Destruction importante de la MEC, prolifération cellulaire, formation de clusters, libération de facteurs cataboliques (cytokines et MMP) (modifié d'après Lotz, 2010 [11]).

2.2.1.2. Ossification endochondrale

En résultat de la phase réactionnelle, le processus arthrosique s'installe car la tentative de réparation menée par les éléments cellulaires de l'articulation est vaine, ce qui s'explique entre autres par le fait que la production de facteurs de croissance actifs n'est pas suffisante pour pallier la surexpression des cytokines et des enzymes protéolytiques [79]. La prolifération excessive des chondrocytes va aboutir à leur différenciation terminale lors de laquelle les CH vont entraîner l'invasion du cartilage par des vaisseaux sanguins, le remodelage et la minéralisation de la matrice extracellulaire et enfin l'apoptose. Cette suite d'événements est semblable à celle observée lors de la croissance osseuse. Des études génomiques ont permis de mettre en évidence des polymorphismes ou des mutations dans les gènes encodant les molécules de la matrice extracellulaire et de molécules de signalisation associées aux voies de TGF β , des BMP et de Wnt et qui pourraient déterminer la différenciation des chondrocytes. La perturbation de ces voies de signalisation pourrait induire les chondrocytes à récapituler le développement moléculaire, incluant l'expression de marqueurs de l'hypertrophie tels que le collagène de type X, la MMP-13 et runx2 [80]. L'HIF-2 α est un régulateur transcriptionnel important des événements des étapes centrale de l'ossification endochondrale (hypertrophie, dégradation et vascularisation) et pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante [81, 82]. Un grand nombre de facteurs sont impliqués dans le processus de d'ossification endochondrale observée dans l'arthrose (Table 1), ils contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage et puisque le phénotype des chondrocytes quiescent du cartilage articulaire est en partie maintenu par la composition de la matrice extracellulaire et notamment le collagène de type IX [83] et les PG [84] qui agissent sur l'organisation des cellules, la destruction de la matrice du cartilage arthrosique pourrait favoriser la différenciation des chondrocytes. A ce stade, les

chondrocytes des clusters situés près des fissures expriment des gènes liés à la différenciation terminale tels que le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), le syndecan-3, la phosphatase alcaline et l'annexine VI [85]. Les annexines II, V et VI sont de composants majeurs des vésicules matricielles (VM) libérées à partir de la membrane plasmique et où s'initie le processus de minéralisation de la matrice [85]. La diminution des facteurs anti-angiogéniques qui maintiennent normalement l'état avasculaire du cartilage, associée à la surproduction de facteurs activateurs de l'angiogenèse permet l'invasion vasculaire du cartilage, une étape nécessaire pour initier la minéralisation de la matrice visible dans le processus d'ossification endochondrale qui conduit ensuite à l'apoptose des cellules.

Table 11 : Rôle des principaux facteurs impliqués dans le processus d'ossification endochondrale dans l'articulation arthrosique (modifié d'après Dreier, 2010 [5]).

FACTEUR DE SIGNALISATION	RÔLE DANS L'ARTHROSE
Bone morphogenic proteins	Stimulation de MMP-13
Fibroblast growth factors	Stimulation d'ADAMTS-5
TGFβ	Stimulation de MMP-13
Wnt/β-catenine	Activation des gènes de maturation Induction de la dégradation de la matrice Induction des MMP et aggrécases (via WNT1-inducible-signaling pathway protein 1)
Indien hedgehog	Induction d'ADAMTS-5 via runx2
Acide rétinoïque	Induction de MMP-13 et des aggrécases
Discoidin domain receptor	Induction de MMP-13 et des fragments de collagène II dérivés de MMP
MMP/ADAMTS	Facteurs clés dans la dégradation de la matrice arthrosique La dégradation de la matrice s'accompagne d'une différenciation terminale des chondrocytes: mécanisme de feedback positif?
Sox9	Impliqué dans l'expression de MMP-13
Runx2/3	Induction de l'hypertrophie des chondrocytes Induction de l'expression de MMP-13

2.2.2. La boucle ostéo-cartilagineuse

L'apparition de la sclérose sous-chondrale caractéristique du remodelage osseux qui se produit dans l'arthrose pourrait, selon les différentes théories, être causée par les microfractures observables au niveau de la jonction ostéochondrale arthrosique [86] ou être la conséquence d'un trouble métabolique général de l'os [87, 88]. Certaines études laissent croire que les modifications de l'os sous-chondral précèdent celles du cartilage et d'autres suggèrent que la sclérose sous-chondrale est la conséquence de l'altération des propriétés mécaniques du cartilage. L'attribution du phénomène déclencheur reste controversé [89].

2.2.2.1. Voies de communication

La plaque ostéochondrale constitue une unité dans laquelle des structures permettant la communication biochimique entre l'os et le cartilage ont été décrites assez récemment. La présence de ces structures suggère un rôle de l'unité biomécanique os-cartilage dans le développement et la progression de l'arthrose [90]. En effet, dans l'articulation arthrosique, des microfractures sont visibles au niveau de la plaque ostéochondrale. Certaines microfractures sont envahies par des structures conjonctivo-vasculaires ou par des vaisseaux sanguins, qui par cette voie pénètrent la couche calcifiée du cartilage. La présence de ces connections (microfractures, canaux vasculaires, vaisseaux sanguins) entre l'os sous-chondral et le cartilage suggère que des médiateurs produits par les ostéoblastes sous-chondraux peuvent atteindre le cartilage sus-jacent et agir sur les chondrocytes. L'irrégularité de la *tidemark* favorise la communication par l'existence de zones de cartilage non-calcifié pénétrant dans la couche calcifiée du cartilage articulaire. Ces zones viennent en contact direct avec l'os sous-chondral et la moelle osseuse ce qui génère des endroits de moindre résistance à l'écoulement de fluide à travers l'unité os-cartilage [90, 91].

2.2.2.2. Échanges

Le passage de facteurs biochimiques entre l'os et le cartilage a été démontré par une équipe canadienne. Ces chercheurs ont révélé la présence du *hepatocyte growth factor* (HGF) dans les couches profondes du cartilage arthrosique, alors que les chondrocytes ne produisent pas ce facteur sous sa forme native [92]. D'autre part, des marqueurs du remodelage osseux, tel que l'ostéocalcine, ont été trouvés dans le fluide synovial des patients arthrosiques [93]. Récemment, en utilisant un système de co-culture ostéoblastes/chondrocytes, nous avons montré que les ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral arthrosique, contrairement aux ostéoblastes des zones non-sclérosées, diminuaient la synthèse d'AGG et de collagène de type II et augmentaient l'expression des MMP-3 et -13 par les chondrocytes [94]. Le médiateur responsable de ces effets semble être l'IL-6. L'ensemble de ces éléments démontre l'existence d'une communication entre le cartilage et l'os sous-chondral, et suggère que des médiateurs provenant de l'os sous chondral contribuent à la dégradation du cartilage.

2.2.2.3. Changements phénotypiques

La modification du phénotype des chondrocytes participe à la dégradation du cartilage arthrosique notamment parce que les CH sécrètent de grandes quantités de MMP. Le phénotype hypertrophique est caractérisé par un niveau d'expression élevé de marqueurs spécifiques qui sont le collagène de type X [76], le facteur de transcription runx2 [95] et la MMP-13 [96]. Un réseau de facteurs de transcription, de facteurs de croissance, d'hormones, de molécules de la matrice et de protéases régulent l'hypertrophie de façon positive ou négative [5]. A tout moment dans la progression de la maladie, des chondrocytes quiescents du cartilage articulaire peuvent s'activer et acquérir des caractères

semblables à ceux des chondrocytes de la plaque de croissance. En effet, la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques est considérée comme une réitération du processus d'ossification endochondrale définie par une succession de processus semblables à ceux observés durant l'ostéogenèse. La jonction ostéochondrale est également concernée par ce processus pathologique d'ossification endochondrale, il s'en suit un épaissement de la couche calcifiée du cartilage qui se traduit par l'avancée du front de minéralisation observable par la multiplication de la *tidemark* [97, 98]. Les marqueurs caractéristiques de l'ossification endochondrale sont exprimés par les chondrocytes arthrosiques. De plus, le changement de phénotype s'accompagne d'une néo-vascularisation du cartilage en provenance de l'os sous-chondral. Des études antérieures ont démontré la présence de canaux contenant des structures vasculaires traversant la *tidemark* et aboutissant au sein du cartilage articulaire (Figure I10) [57]. Ces structures sont généralement accompagnées d'une invasion nerveuse impliquant une perception de la douleur [99]. L'invasion vasculaire est également associée à la calcification de la matrice extracellulaire dans certains cas d'arthrose [100].

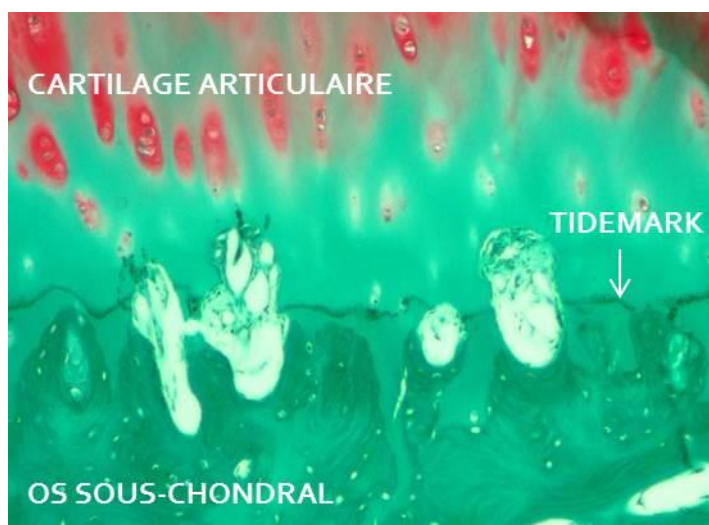


Figure I10 : Mise en évidence de canaux provenant de l'os sous-chondral, traversant la *tidemark* et aboutissant dans le cartilage articulaire (grossissement 10x).

2.2.2.4. Néo-vascularisation

Le cartilage articulaire normal est un tissu non vascularisé. Cette propriété particulière provient de la richesse du cartilage en facteur dits « anti-angiogéniques » comme la chondromoduline-1 et la thrombospondine-1 [101, 102]. Le maintien de l'état avasculaire du tissu sain résulte d'un avantage des facteurs inhibiteurs sur les activateurs de l'angiogenèse. La néo-vascularisation du cartilage arthrosique se produit par le biais du processus d'angiogenèse qui par définition consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. La présence d'une plus grande densité vasculaire dans le cartilage de patients arthrosiques a été démontrée [103].

2.2.2.4.1. Angiogenèse et remodelage de l'os sous-chondral

Les ostéoblastes et les ostéoclastes expriment les différentes isoformes du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et de ses récepteurs, ainsi qu'un inhibiteur de l'angiogenèse, le *pigment epithelium-derived factor* (PEDF) [104]. Ces facteurs jouent un rôle crucial dans l'angiogenèse et le remodelage osseux. De plus, diverses protéines produites par les ostéoblastes, comme l'ostéocalcine, la *bone sialoprotein* (BSP) et la *bone morphogenetic protein* (BMP)-7, ont montré des propriétés pro-angiogéniques [105-107]. Récemment, nous avons montré que les ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral arthrosique produisent davantage de VEGF et d'ostéocalcine que les ostéoblastes des zones non sclérosées [108]. La synthèse accrue de ces facteurs localement pourraient expliquer l'invasion de la plaque osseuse sous-chondrale arthrosique par des vaisseaux sanguins.

2.2.2.4.2. Angiogénèse et ossification endochondrale

Dans le cartilage normal, la présence de vaisseaux sanguins a été observée dans la couche calcifiée du cartilage. Par contre, la présence de tels vaisseaux au-dessus de la *tidemark*, dans les couches non calcifiées du cartilage, est un phénomène anormal [109]. Dans le cartilage arthrosique, il y a une augmentation du nombre de vaisseaux et de terminaisons nerveuses sensibles et sympathiques qui franchissent la *tidemark* [110]. L'apparition de vaisseaux sanguins au sein de la jonction ostéochondrale pourrait être un élément déclencheur de l'ossification endochondrale, caractérisée par la différenciation hypertrophique des chondrocytes, l'augmentation de l'activité phosphatase alcaline dans le cartilage et l'accumulation de microcristaux [100]. Ce phénomène expliquerait, en tout cas en partie, l'épaississement de la couche calcifiée du cartilage et la réplication de la *tidemark*.

2.2.2.4.3. Effet des médiateurs de l'inflammation sur l'angiogénèse

L'inflammation est étroitement liée à l'angiogénèse et est impliquée dans la néo-vascularisation tissulaire de plusieurs manières. Les tissus enflammés sont souvent hypoxiques et l'hypoxie peut induire l'angiogénèse en augmentant la production de VEGF. De plus, les cellules inflammatoires telles que les macrophages, présents en abondance dans la membrane synoviale arthrosique, produisent également des facteurs pro-angiogéniques [111]. Notons, que le TNF- α , une cytokine produite en abondance par les macrophages, est également un facteur pro-angiogénique [109]. Le mode d'action du TNF- α est indirect puisque celui-ci n'a pas une action mitogène sur les cellules endothéliales [112]. De plus, le TNF- α semble réguler, en partie, l'expression de deux enzymes protéolytiques, MMP-9 et MMP-14 qui sont connues pour être cruciales dans la progression des vaisseaux au sein de la matrice extracellulaire [113]. L'hypothèse commune est que

l'angiogenèse potentialise l'inflammation. En effet, certains facteurs angiogéniques tels que le VEGF et le *basic fibroblast growth factor* (bFGF) ont également un rôle pro-inflammatoire. La coexistence des deux phénomènes peut donc mener à une inflammation persistante [109].

2.2.2.4.4. Présence d'un déséquilibre entre facteurs angiogéniques

De manière générale, l'angiogenèse tissulaire résulterait d'un déséquilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ce déséquilibre peut résulter d'une augmentation de production des facteurs pro-angiogéniques et/ou d'une diminution de production des facteurs anti-angiogéniques. De nombreux facteurs impliqués dans l'angiogenèse ont été identifiés dans le cartilage sain et arthrosique (Table I2). Plusieurs études ont montré la présence de molécules pro-angiogéniques, comme le bFGF et le VEGF dans le cartilage sain [114, 115] bien que ce tissu soit non-vascularisé. Ces observations suggèrent que le cartilage normal est potentiellement angiogénique bien qu'il maintient un phénotype angiostatique.

2.2.2.4.5. Facteurs anti-angiogéniques

Les PG jouent un rôle anti-angiogénique très important. Smith et ses collaborateurs ont montré que la diminution du contenu en PG de la matrice extracellulaire était associée à l'invasion vasculaire du cartilage [116]. Des PG peuvent également agir en se fixant à certains facteurs angiogéniques. Par exemple, l'héparine et l'héparan sulfate sont capables de lier le bFGF ainsi que le VEGF, empêchant ainsi la liaison de ces facteurs à leurs récepteurs tyrosine-kinase [114, 117, 118] et bloquant de cette façon leur diffusion dans la matrice extracellulaire. Les chondrocytes produisent de nombreux facteurs anti-angiogéniques. La thrombospondine-1 (TSP-1) a été largement décrite, il s'agit d'une glycoprotéine impliquée dans les interactions matrice-chondrocyte [102]. Dans le cartilage

normal, le facteur TSP-1 est principalement présent dans les zones moyenne et profonde et l'expression des ARN messagers est prédominante au niveau des chondrocytes de la zone moyenne. Elle est présente en quantité moins importante dans le cartilage arthrosique que dans le cartilage normal. La TSP-1 est un facteur activateur du TGF- β 1 [119]. Cette protéine inhibe l'angiogenèse en empêchant la migration des cellules endothéliales [120] et en induisant leur apoptose [121] ainsi qu'en inhibant la liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-2 [122]. La ténascine, une autre protéine impliquée dans les interactions matrice-cellule, jouerait également un rôle dans le phénomène d'angiogenèse. Contrairement à la thrombospondine, la ténascine aurait un rôle pro-angiogénique [123]. Il a été montré que l'expression de la ténascine augmente dans le cartilage arthrosique mais qu'elle est faiblement exprimée dans le cartilage normal [124]. Cette protéine pourrait dès lors jouer un rôle dans la néo-vascularisation du cartilage arthrosique. Un autre facteur anti-angiogénique qui a été activement étudié est la chondromoduline 1 (ChM-1). Elle a été identifiée dans le cartilage à plusieurs reprises [125, 126] et différentes études ont montré qu'elle inhibait la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* [127] et *in vivo* [125]. Selon une étude immunohistologique récente, l'expression de ChM-1 diminue dans la zone superficielle du cartilage dans les stades précoces de l'arthrose et elle est réduite dans toutes les zones du cartilage articulaire dans les stades les plus sévères. La réduction de ChM-1 coïncide avec l'invasion vasculaire du cartilage [128]. De façon concomitante, on peut observer une augmentation de l'expression du VEGF et des MMP-9 et MMP-13, deux MMP favorisant l'invasion vasculaire du cartilage arthrosique. Il est important de souligner qu'à ce jour, les régulateurs de l'expression des inhibiteurs de l'angiogenèse au sein du cartilage sont méconnus.

2.2.2.4.6. Facteurs pro-angiogéniques

Un certain nombre de facteurs pro-angiogéniques ont été identifiés au sein du cartilage. Le plus étudié est le VEGF. C'est pour cette raison que nous avons choisi de centrer notre attention sur ce facteur. Le VEGF est une glycoprotéine homodimérique, avec une masse moléculaire de 34-45 kDa, qui existe sous cinq isoformes différentes (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆) qui fixent 3 récepteurs (VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3) [129]. Trois isoformes sont produits par les chondrocytes, sains et arthrosiques (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉). Les trois récepteurs sont exprimés par les chondrocytes arthrosiques, alors qu'aucun récepteur pour le VEGF n'a été détecté sur les chondrocytes sains [130]. Les principaux facteurs induisant l'expression du VEGF par les chondrocytes en culture sont l'hypoxie et *l'hypoxia-inductible factor* (HIF-1), le stress mécanique ainsi que divers facteurs tels que l'IL-1, l'IL-17, le TNF- α , le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [131]. Une étude immuno-histochimique a montré que le VEGF n'est pas présent dans le cartilage normal. Par contre, la présence de ce facteur autour des chondrocytes augmente avec la sévérité des lésions histologiques déterminée sur l'échelle de Mankin [60, 116, 130]. Dans le cartilage arthrosique, la présence du VEGF est particulièrement importante autour des clones de chondrocytes arthrosiques près de la surface du tissu. A l'inverse, Brew et Coll. ont montré que le taux d'ARNm codant pour le VEGF dans l'ARN total extrait de cartilage était plus faible dans les chondrocytes arthrosiques en comparaison avec les chondrocytes sains [115]. Une hypothèse avancée par ces chercheurs pour expliquer cette diminution est que les chondrocytes produiraient du VEGF principalement au début de la pathologie et que, ensuite, le VEGF s'accumulerait dans la matrice extracellulaire. Le VEGF stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il stimule également la synthèse des MMP -1 et -3 par les chondrocytes

arthrosiques [130]. L'activité du VEGF est contrôlée par le *connective tissue growth factor* (CTGF), qui se lie au VEGF₁₆₅ et bloque son activité angiogénique. Les MMP digèrent sélectivement le CTGF dans le complexe CTGF/VEGF₁₆₅ et réactivent l'activité angiogénique du VEGF [132]. Il est donc tentant de spéculer que dans le cartilage normal le CTGF bloque l'activité angiogénique du VEGF en se complexant avec lui et que dans le cartilage arthrosique, les MMP activent le VEGF en le libérant du complexe CTGF/VEGF [132].

2.2.2.4.7. Les métalloprotéinases matricielles

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins requiert la dégradation de la membrane basale vasculaire et le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces étapes sont un préalable nécessaire à la migration des cellules endothéliales à travers la matrice. Les principales MMP impliquées dans ces processus sont la MMP-2, -7 et la MT1-MMP. Elles favorisent l'angiogenèse en libérant des péricytes des vaisseaux en croissance, en relâchant les facteurs de croissance angiogéniques liés à la matrice (VEGF et bFGF), en exposant des sites de liaisons pour les intégrines pro-angiogéniques dans la matrice (notamment $\alpha V\beta 3$), en générant des fragments angiogéniques à partir de la fibrine et en clivant les liaisons entre les cellules endothéliales [133-135]. De façon paradoxale, les MMP peuvent aussi exercer un contrôle négatif sur l'angiogenèse, en clivant le site de liaison des facteurs pro-angiogéniques à leur récepteur. Par exemple, la MMP-2 peut cliver l'ectodomaine de FGFR1 qui maintient l'activité de liaison du FGF [136]. Les MMP peuvent également avoir un rôle anti-angiogénique en générant des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse à partir de protéines circulantes ou matricielle. Les MMP-2, -7, -9 et -12 libèrent de l'angiostatine, à partir du plasminogène [137, 138] ou de certains collagènes matriciels. Par exemple, l'endostatine est libérée de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type XVIII, la tumstatine de la

chaîne α_3 du collagène de type IV, et l'arrestine de la chaîne α_1 du collagène de type IV et enfin la canstatine de la chaîne α_2 du collagène de type IV [139]. Citons de plus la chondrostatine, un fragment du pro-collagène de type II, qui est libéré dans la matrice du cartilage au cours du processus de synthèse des fibres de collagène de type II [140].

Table 12 : Régulateurs de l'angiogenèse localisés ou libérés par les chondrocytes articulaires **arthrosiques** (modifié d'après Bonnet et Walsh, 2004 [6]) et **sains** (modifié d'après Gerber et Ferrara, 2000 [13]). CTGF: *Connective tissue growth factor* ; Cyr61: *Cysteine-rich angiogenic inducer 61* ; EGF: *Epidermal growth factor* ; ESAF: *Endothelial cell stimulating angiogenic factor* ; FGF: *Fibroblast growth factor* ; HGF: *Hepatocyte growth factor* ; IGF: *Insulin-like growth factor* ; IL: *Interleukine* ; MMP : *Métalloprotéinase matricielle* ; PDGF-A: *Platelet-derived growth factor A* ; PGE2: *Prostaglandine E2* ; TGF β : *Transforming growth factor β* ; TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinases* ; TNF α : *Tumor necrosis factor α* ; VEGF: *Vascular endothelial growth factor*.

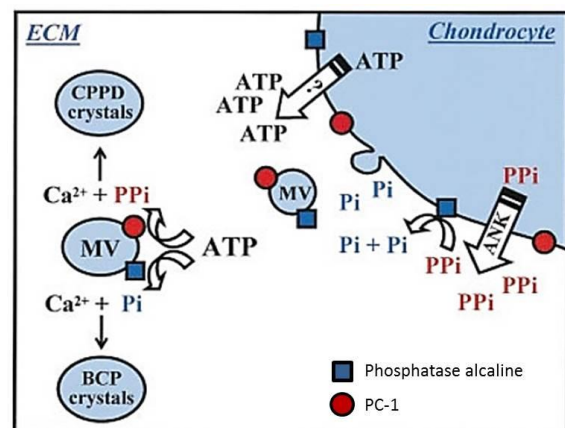
ACTIVATEURS	INHIBITEURS
<p><u>VEGF</u>_{121/189}</p> <p>Endoglin</p> <p>HGF</p> <p>IL-1, -8, -18</p> <p><u>TGFβ</u>_{1/2/3}</p> <p>TNFα</p> <p><u>CTGF</u></p> <p>Substance P</p> <p>PG E₂</p> <p>Nitric oxide</p> <p>Histamine</p> <p><u>FGF-2</u></p> <p><u>FGF-1</u></p> <p>ESAF</p> <p><u>IGF-1</u></p> <p>EGF</p> <p>PDGF-A</p> <p><u>Transferrine</u></p> <p><u>Cyr61</u></p> <p><u>MMP-9/gélatinase B</u></p>	<p><u>Thrombospondine-1</u></p> <p>Leukaemia Inhibitory Factor</p> <p><u>TIMP-1 et -2</u></p> <p><u>TGF-β</u></p> <p>TNF-α</p> <p>Chondrocyte inhibitor of angiogenesis</p> <p><u>Chondromoduline-1</u></p> <p><u>Troponine-I</u></p> <p><u>Thrombospondine-3</u></p>

2.2.2.5. Minéralisation de la matrice extracellulaire

Le cartilage athrosique peut être le siège d'une minéralisation ectopique de la matrice extracellulaire du cartilage, liée à la réactivation du processus d'ossification endochondrale [141] mais dont l'élément déclencheur reste inconnu à ce jour [142]. La minéralisation se présente sous la forme d'une déposition intra-articulaire de microcristaux de calcium qui incluent à la fois du pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD), synonyme de chondrocalcinose ainsi que des cristaux de phosphate de calcium basique (CPB) essentiellement l'hydroxyapatite. Les chondrocytes sont des cellules minéralocompétentes. Dans l'arthrose, elles exercent leur activité en générant à partir de leur membrane plasmique des vésicules matricielles (VM) et en produisant des protéines pro-minéralisantes comme les annexines ou encore les phosphatases alcalines (PA) [63]. Les VM sont des particules extracellulaires où s'initient les dépôts des CPB et des PPCD à partir du phosphate inorganique extracellulaire (ePi) et du pyrophosphate inorganique extracellulaire (ePPi), respectivement. Le PPi (pyrophosphate inorganique) et l'adénosine triphosphate (ATP) sont transportés du chondrocyte vers le milieu extracellulaire grâce à l'intervention de la protéine transmembranaire ANK [143, 144]. L'ePi est formé dans la matrice extracellulaire par conversion à partir de l'ePPi sous l'action de la phosphatase alcaline qui participe de cette façon à la formation des cristaux d'hydroxyapatite [145]. Les ectonucléotidases *nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase* (NTPPPH) sont responsables de l'hydrolyse des nucléosides triphosphates extracellulaires en ester de monophosphate et en ePPi [146]. Dans le cartilage articulaire, c'est la *plasma cell membrane glycoprotein-1* (PC-1) qui catalyse cette réaction [147] (Figure I11). Dans les conditions pathologiques, l'excès d'ePPi engendre la formation de cristaux de PPCD et la présence de PA participe à la formation de cristaux de CPB. La libération de ces cristaux stimule la synthèse et la sécrétion de MMP et de cytokines

pro-inflammatoires, ce qui contribue à la dégradation du cartilage articulaire [9]. Cependant, le lien entre l'arthrose et la présence de microcristaux n'est pas clairement établi. D'une part, le dépôt de microcristaux pourrait précéder et constituer un facteur de risque de l'initiation de l'arthrose et d'autre part, ils pourraient être produits en réaction de la maladie et favoriser son évolution [148]. Les CH possèdent une activité de type transglutaminase (TG) accrue [149]. Il existe deux formes de TG, la transglutaminase 2 (TG2) et le facteur XIIIa, toutes deux présentent une activité importante dans le cartilage arthrosique [150, 151]. Leur mode d'action consisterait à stabiliser la matrice extracellulaire et à la préparer aux dépôts de PPCD et de CPB [152]. La minéralisation de la matrice du cartilage dépend des concentrations endogènes en ePi, et ePPI, en calcium et de l'activité TG. De plus, certains facteurs présents dans le cartilage agissent sur la minéralisation. C'est le cas du TGF- β 1 qui stimule la production d'ePPI notamment en induisant la libération de VM ayant une activité NTPPPH plus importante que l'activité PA. Le TGF- β 1 agit par ailleurs sur la minéralisation en augmentant l'expression de ANK [153]. Au contraire, l'IGF-1 et l'IL-1 β diminuent la synthèse d'ePPI en inhibant l'expression des NTPPPH et de ANK [153, 154]. De plus, il a été montré que l'IL-1 β active les TG dans les zones superficielles et profondes du cartilage articulaire arthrosique [155].

Figure 111 : Mécanisme de formation des cristaux de pyrophosphate de calcium (CPPD) et de phosphate de calcium (CPB).
MV= vésicules matricielles (modifié d'après Picher, 2003 [9]).



2.2.3. La boucle synovio-cartilagineuse

La membrane synoviale arthrosique est le siège d'une inflammation qui contribue au gonflement et à la rigidité articulaire de même qu'au relargage de cytokines inflammatoires, en particulier l'IL-1 β et le TNF α , deux facteurs connus pour leur rôle inducteur de la production d'enzymes protéolytiques par les chondrocytes articulaires [156, 157]. Cette réaction inflammatoire est causée par la libération des débris peptidiques issus de la dégradation des composants matriciels du cartilage et de microcristaux de pyrophosphate ou d'hydroxyapatite [158]. De plus, des cytokines produites par les chondrocytes arthrosiques stimulent la production de facteurs cataboliques par les synoviocytes et les cellules de la réaction inflammatoire de la membrane synoviale. L'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α , le NO et des MMP sont de cette façon produits en réaction par la membrane synoviale et agissent à leur tour en s'attaquant à la couche superficielle du cartilage et en induisant la production accrue de facteurs cataboliques par les chondrocytes [159]. Par conséquent, la destruction du cartilage entretient l'inflammation de la membrane synoviale et inversement, ce qui conduit à la progression de l'arthrose.

2.3. Les facteurs biochimiques de l'arthrose

Le métabolisme des chondrocytes est régulé par l'équilibre d'action entre les facteurs anaboliques et cataboliques. Suite à un stimulus, le plus souvent d'origine mécanique, les chondrocytes s'activent et leur métabolisme normal est modifié, en même temps, la matrice extracellulaire subit un remodelage intense entraînant l'altération de ses propriétés. Le déséquilibre métabolique des chondrocytes entraîne l'augmentation des processus de synthèse et du catabolisme qui se traduit par la production locale d'enzymes protéolytiques, de cytokines, de formes activées de l'oxygène et de PGE₂ qui sont synthétisées par les

cellules de l'os sous-chondral, par les synoviocytes [160] ou par les chondrocytes eux-mêmes. La boucle fonctionnelle formée par l'entretien de ses processus pathologiques entraîne la destruction du cartilage, la rigidité de l'os sous-chondral et l'inflammation de la membrane synoviale correspondant à l'installation du processus arthrosique (Figure I12). De plus, des facteurs systémiques pourraient être impliqués dans les processus biochimiques de dégradation des tissus articulaires.

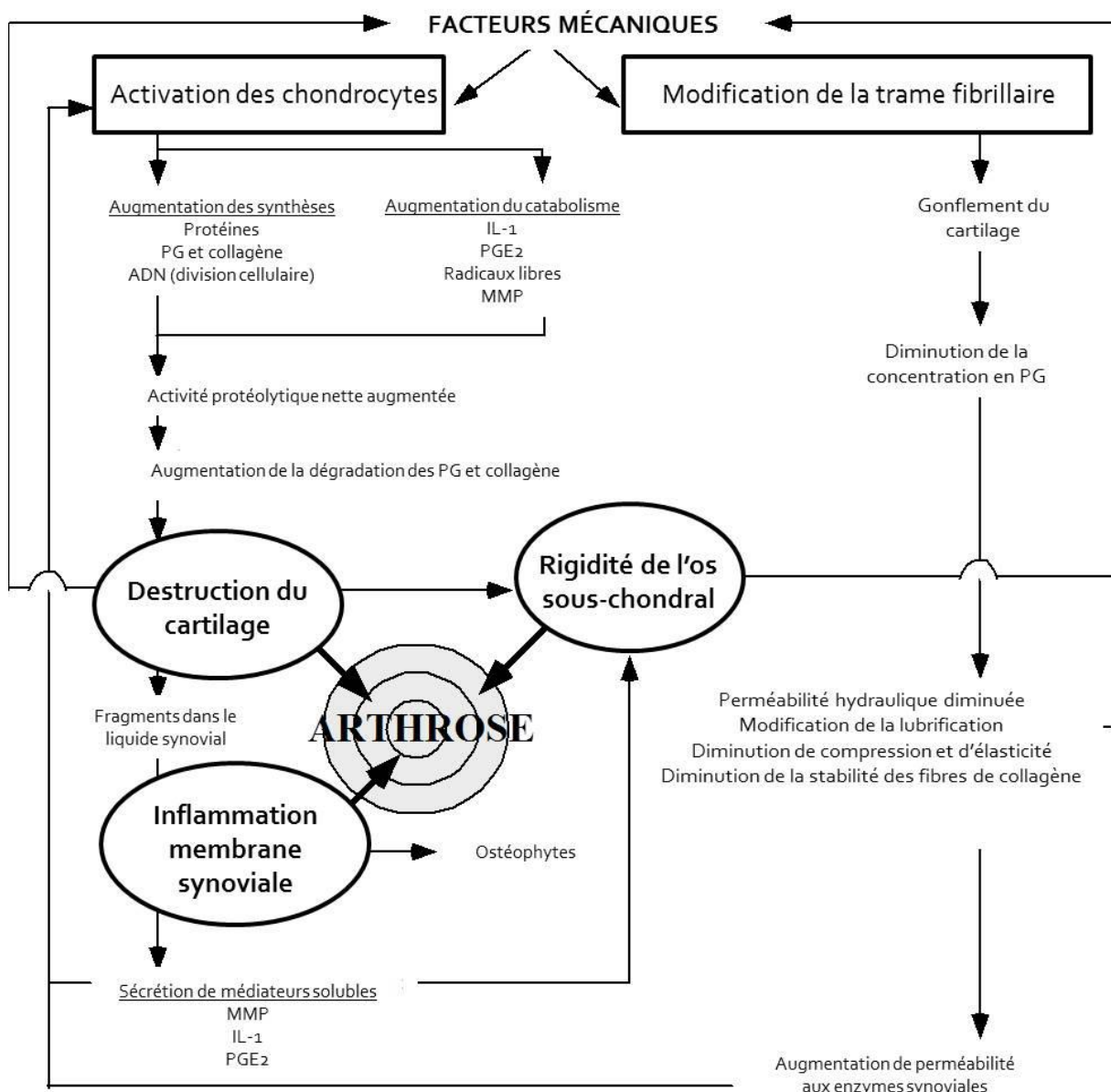


Figure I12 : Mécanismes de la physiopathologie de l'arthrose et principaux facteurs biochimiques impliqués dans le processus arthrosique (d'après Mazière [1]).

2.3.1. Les facteurs locaux

Les enzymes responsables de la dégradation du cartilage articulaire sont principalement de MMP et des agrécanases (ADAMTS). Les MMP sont de plusieurs types : les collagénases (MMP-1, -8, -13) qui sont responsables de la dégradation du collagène natif, des stromélysine (MMP-3, -10, -11) qui dégradent les composés non collagéniques, des gélatinases (MMP-2, -9) impliquées dans la dégradation du collagène dénaturé et également des MMP membranaires (MMP-14, -15, -16, -17) responsables de la dégradation non spécifique de certaines molécules matricielles et de l'activation d'autres MMP [161]. Des concentrations importantes de MMP ont été trouvées dans le cartilage et le fluide synovial de patients arthrosiques [162, 163]. Les chondrocytes secrètent des formes inactives de MMP qui sont ensuite activées dans l'espace extracellulaire. L'activité enzymatique des MMP nécessite la présence d'ions zinc et calcium au niveau de leur site catalytique [164]. L'action des MMP est régulée par une catégorie d'inhibiteurs naturels, les *tissue inhibitors of MMP* (TIMP) qui ne parviennent cependant pas à contrecarrer les effets des concentrations anormalement élevées de MMP détectées dans le cartilage arthrosique [67].

2.3.2. Les cytokines

Les cytokines produites au niveau de l'articulation peuvent être de nature anabolique, régulatrice ou catabolique (Table I3). L'IL-1 β est la principale cytokine incriminée dans l'arthrose. Cette cytokine est capable d'inhiber la synthèse du collagène de type II et des PG [165] et induit à la fois la dégradation des composants de la matrice en stimulant l'expression des MMP et des ADAMTS [166]. De plus, elle stimule la production des prostaglandines pro-inflammatoires, notamment la prostaglandine E₂ (PGE₂) [167]. Le

TNF- α apparaît aussi comme un important médiateur de la dégradation du cartilage. Il agit en synergie avec l'IL-1 β dans l'arthrose [166, 168]. Comme l'IL-1 β , il inhibe le déséquilibre métabolique entre synthèse et dégradation des constituants matriciels et à la modification du statut enzymatique du cartilage notamment par diminution de la production de TIMP1 [169]. Ces deux cytokines majeures dans la progression de l'arthrose se trouvent en quantité très faibles dans l'articulation arthrosique [157] et l'utilisation de biothérapie ciblant l'action de ces cytokines dans l'arthrose n'ont pas montré d'effet efficace à ce jour [170].

Table 13 : Principales cytokines impliquées dans la régulation du métabolisme du cartilage (d'après Sanchez, 2005 [2]). IL : interleukine, MIP : *macrophage inflammatory protein*, LIF : *leukemia inhibitory factor*, IFN : interféron, OSM : oncostatine M, BMP : *bone morphogenic protein*, FGF : *fibroblast growth factor*, GDF : *growth differentiation factor*, IGF : *insulin-like growth factor*, PDGF : *platelet-derived growth factor*, TGF : *transforming growth factor*.

CYTOKINES CATABOLIQUES	CYTOKINES REGULATRICES	CYTOKINES ANABOLIQUES
IL-1 α et β	IL-5	BMP-2, -4, -7, -9, -13
TNF α	IL-6	FGF-2, -4, -8
IL-8	IL-10	GDF-5
IL-17	IL-13	IGF-1
IL-18	IFN- γ	PDGF
MIP-1 β	OSM	TGF β -1, -2, -3
LIF		

2.3.3. Les formes activées de l'oxygène et les prostanoïdes

La transformation enzymatique de l'oxygène peut aboutir à la production de molécules très réactionnelles qui sont définies comme formes activées de l'oxygène. Les chondrocytes produisent du NO et l'anion superoxyde (O_2^-) de façon constitutive. D'autres formes activées de l'oxygène peuvent être formées à partir du NO et de l' O_2 , il s'agit de l' H_2O_2 , du peroxyde d'azote ($ONOO^-$) et du radical hydroxyl (OH). Dans l'arthrose, ces molécules réactionnelles ne sont plus normalement éliminées par des systèmes de défense antioxydante enzymatiques ou biochimiques, ce qui conduit à un stress oxydatif. L'excès de formes activées de l'oxygène résultant participe à la dégradation du cartilage articulaire en altérant la structure des protéines matricielles principales par oxydation et en favorisant l'activation des MMP [171-173]. Les prostanoïdes, prostaglandines (PG) et thromboxanes sont produits à partir d'acides gras par une cascade enzymatique faisant intervenir la phospholipase A₂, les cyclo-oxygénases (COX) et les PGE synthétases (PGES). Les chondrocytes, les ostéoblastes et les synoviocytes arthrosiques expriment des quantités accrues de COX-2 et de PGES et en conséquence, le taux de PGE₂ dans le liquide synovial de patients arthrosique est anormalement élevé [174].

2.3.4. Les adipokines

Au cours des quinze dernières années, le rôle des adipokines a été étudié dans l'arthrose. L'attention dirigée vers ces facteurs résulte du constat que le lien entre obésité et arthrose ne semblait pas s'expliquer uniquement par l'augmentation des contraintes imposées aux articulations mais aussi par l'action de médiateurs solubles produits par les tissus graisseux, les adipokines. La leptine, la résistine, l'adiponectine, la visfatine et la chémérine semblaient en effet jouer un rôle pro-inflammatoire dans l'arthrose. La leptine

peut induire l'expression des MMP-3 et -9 [175] et est positivement corrélée au niveau de MMP-1 et -3 mesuré dans le fluide synovial de patients arthrosiques [176]. Une association de la concentration plasmatique de leptine avec la sévérité de l'arthrose a récemment été mise en évidence [177]. L'adiponectine est aussi impliquée dans l'arthrose, elle induit plusieurs médiateurs pro-inflammatoires tels que le NO, l'IL-6, les MMP-3 et -9 et l'Il-8, ce qui génère un environnement pro-inflammatoire au niveau de l'articulation [178, 179]. De plus, le niveau d'adiponectine dans le fluide synovial était corrélé avec la sévérité de l'arthrose [180] et la dégradation de l'AGG [181]. La résistine inhibe la synthèse des PG dans des cultures d'explants de cartilage humain [182] mais son niveau sérique n'est pas associé à la perte de cartilage [183]. La visfatine jouerait un rôle pro-inflammatoire dans l'arthrose en stimulant la synthèse et inhibe l'enzyme de dégradation de la PGE₂ [184]. Plus récemment, la chémerine a été décrite [185]. Cette adipokine ainsi que son récepteur sont exprimés par les chondrocytes et favorise la production de TNF- α , Il-1 β , Il-8, IL-6 et des MMP-1, -2, -3, -8, -13 dans les chondrocytes articulaires [186, 187]. Ces données laissent croire que les adipokines pourraient jouer un rôle dans la composante métabolique de l'arthrose, notamment en stimulant l'inflammation systémique résultant en une accélération de la dégradation du cartilage arthrosique. Les études menées sur ce sujet devront donc être poursuivies afin de préciser le rôle exact des adipokines dans l'arthrose.

MATÉRIEL & MÉTHODES

AVANT-PROPOS :

La plupart des protocoles et des méthodes employées dans ce travail ont été décrits en détails dans les articles scientifiques qui se trouvent en annexe 1 et 2. Dans ce chapitre, nous décrivons les protocoles et méthodes utilisés dans le cadre d'analyses complémentaires non présentées dans les articles. Par soucis de clarté, un résumé succinct des méthodes se trouvant dans les articles a été proposé.

Annexe 2 : Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage : potential effect on angiogenesis. Osteoarthritis and cartilage, 2013, sous presse.

Annexe 3 : Bone sialoprotein as a potential key factor implicated in the pathophysiology of osteoarthritis. Osteoarthritis and cartilage, 2013, en révision.

1. CULTURE PRIMAIRE DE CHONDROCYTES ARTHROSIQUES

Les cultures de chondrocytes ont été réalisées à partir de cartilage de genou de patients arthrosiques. La méthode de culture est représentée schématiquement sur la figure M1. Chaque culture a été réalisée trois fois en utilisant des cellules provenant de plusieurs donneurs différents. Chaque condition expérimentale a été produite en triple. Les chondrocytes ont été cultivés en monocouche ou en billes d'alginate pendant 12 ou 28 jours dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de boeuf fœtal (FBS) ou 2% d'Ultroser G (UG) ou 1% d'insuline-transferrine-sélénium, acide linoléique et *bovin serum albumin* (BSA) (ITS+). Les détails de la culture cellulaire se trouvent dans les annexes 2 et 3.

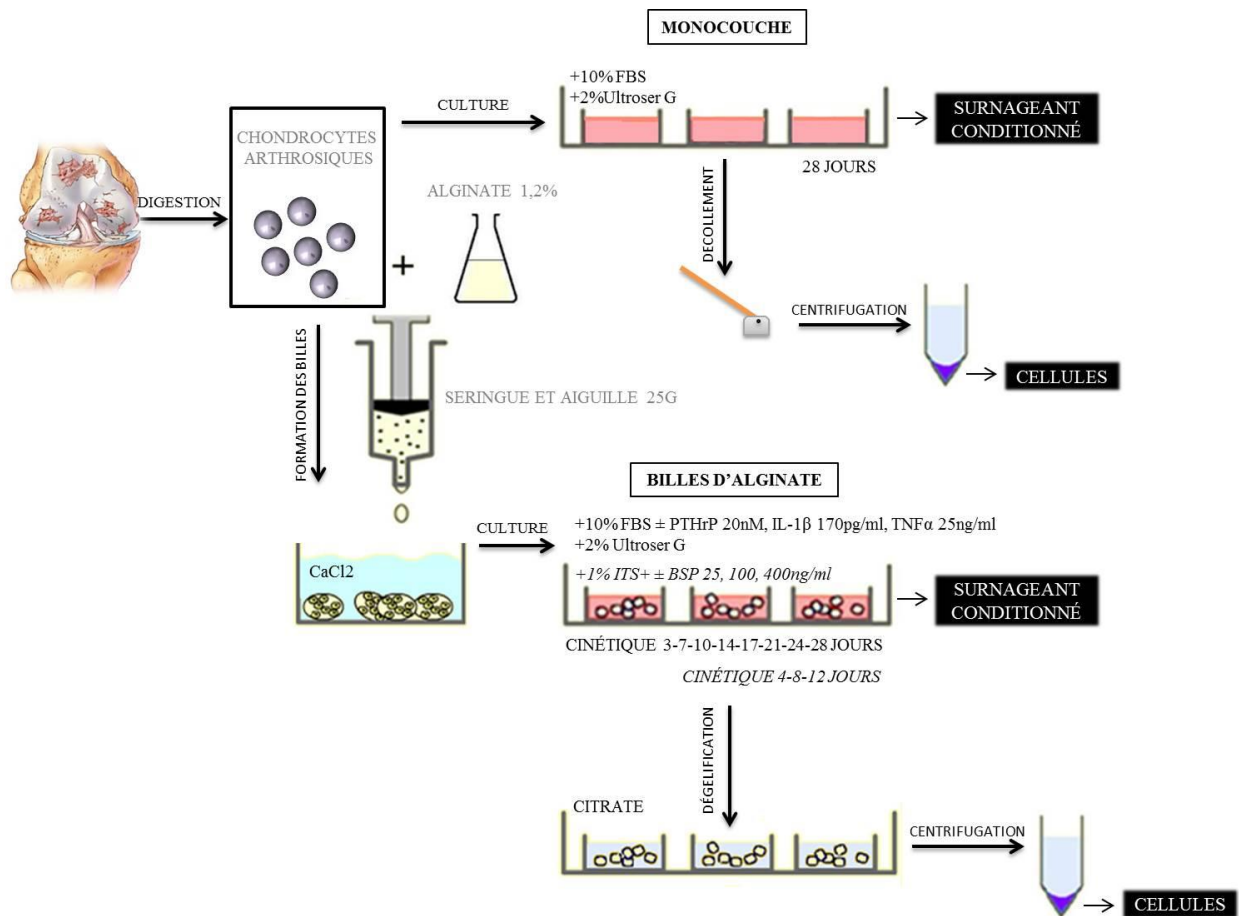


Figure M1 : Méthodes de culture de chondrocytes à partir de cartilage de patients arthrosiques. Les chondrocytes étaient soit cultivés en monocouche soit inclus en billes d'alginate et maintenu en culture pendant 12 ou 28 jours, leur milieu de culture était enrichi en ITS+ à 1%, en Ultrosor G à 2% ou en FBS à 10%. L'influence de l'ajout de *parathyroid hormone related peptide* (PTHrP), d'interleukine (IL)-1 β et de *tumor necrosis factor* (TNF) α a été évaluée sur des chondrocytes cultivés en billes d'alginate pendant 28 jours dans un milieu enrichi en FBS à 10%. L'effet d'une dose-réponse de BSP sur des chondrocytes cultivés en billes

2. COLLECTE DES MILIEUX CONDITIONNÉS PAR LES CHONDROCYTES

Une différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques était observée lorsqu'ils étaient cultivés en billes d'alginate dans un milieu enrichi en FBS à 10%. Dans ces conditions, ils étaient considérés comme non-hypertrophiques après 3 jours de culture alors qu'après 21 jours ils étaient considérés comme hypertrophiques. Les milieux de culture conditionnés par les chondrocytes arthrosiques ont été prélevés après 3 jours et 21 jours et ensuite utilisés dans les tests fonctionnels de « *wound healing* », de la migration, de l'invasion et de l'adhésion des cellules endothéliales. Pour ces études, un milieu de culture Dubbelco's modified Eagle medium (DMEM, Lonza, Verviers, Belgique) sans serum de boeuf foetal avait été conditionné pendant 24 h par les chondrocytes (Figure M2).

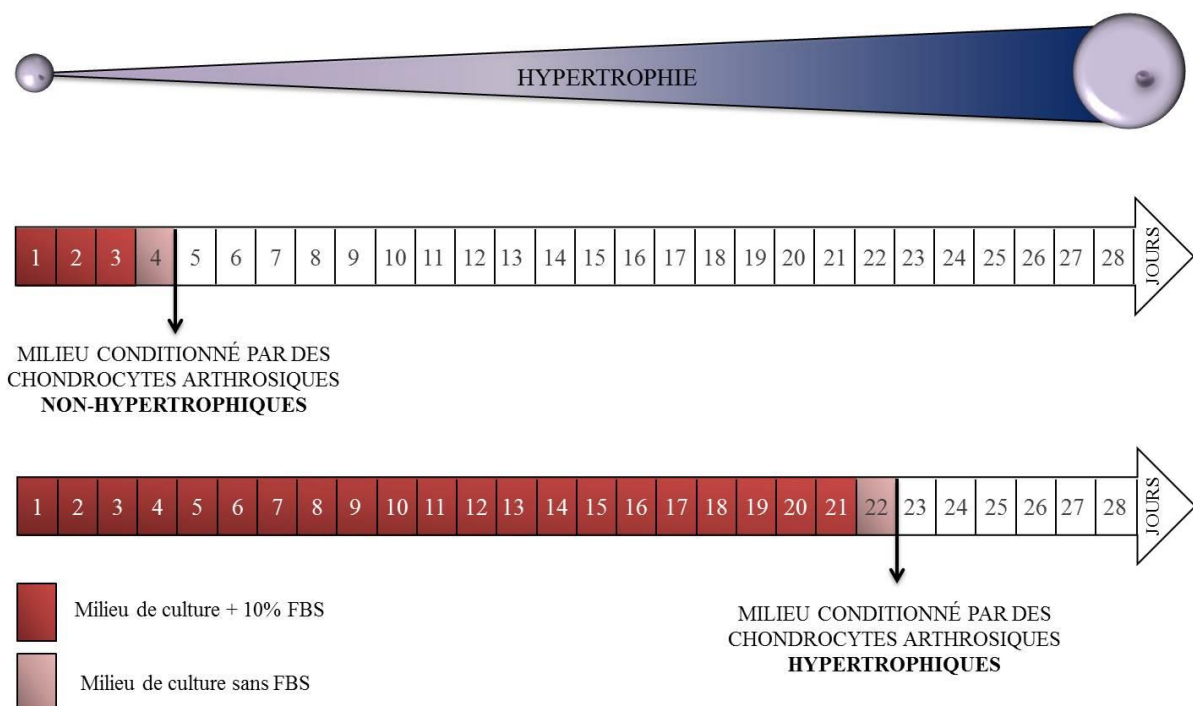


Figure M3 : Collecte des milieux conditionnés par les chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques après 3 jours de culture ou hypertrophiques après 21 jours de culture. Les cellules étaient cultivées en billes d'alginate dans un milieu enrichi en 10% FBS pendant 28 jours. Une période d'incubation de 24h dans un milieu identique au milieu de culture mais sans FBS était appliquée avant la récolte des milieux.

3. TESTS FONCTIONNELS D'ÉTUDE DE L'ANGIOGÈNE

L'objectif des tests fonctionnels consistait à évaluer l'effet des milieux conditionnés par des CNH ou des CH sur différentes étapes du processus d'angiogène. Pour cela, des cellules endothéliales de type HUVEC ont été mises en présence des milieux conditionnés ou de milieux contrôles dans des expériences menant à observer la migration, l'invasion et l'adhésion des HUVEC. La condition contrôle des tests de *wound healing* et de tests de migration et invasion en temps réel était constituée de milieu non conditionné enrichi en FBS à 10%, ce milieu contenait donc de grandes quantités de facteurs de croissance qui stimulent naturellement la migration et l'invasion des cellules endothéliales. Pour le test d'adhésion, le contrôle était fait de milieu contenant 10 µg/ml de BSP recombinante car il s'agit d'un facteur connu pour son effet positif sur l'adhésion des HUVEC [105]. Un contrôle négatif contenant 10 µg/ml de BSA était également intégré dans l'expérience. Ces expériences sont présentées dans l'annexe 2.

3.1. *Wound healing* ou cicatrisation

Le *wound healing* représente le phénomène de cicatrisation d'une lésion par des cellules endothéliales. En pratique, des HUVEC étaient ensemencées et cultivées en monocouche jusqu'à confluence dans les deux compartiments d'un insert en silicone déposé sur une boîte de culture. L'insert était séparé en deux compartiments par une paroi de 500 μm d'épaisseur, ce qui permettait d'obtenir, après retrait de l'insert, une zone sans cellule (Figure M3). Du milieu conditionné de CNH ou de CH ou du milieu contrôle (non conditionné contenant 10% de FBS) était alors déposé dans la boîte de culture de façon à recouvrir les deux zones de cellules endothéliales. La cicatrisation de la lésion par migration des HUVEC était observée sous microscope après 24h d'incubation et la largeur de la zone sans cellule mesurée à l'aide de l'outil de mesure disponible dans le logiciel Image J (rsbweb.nih.gov/ij/).

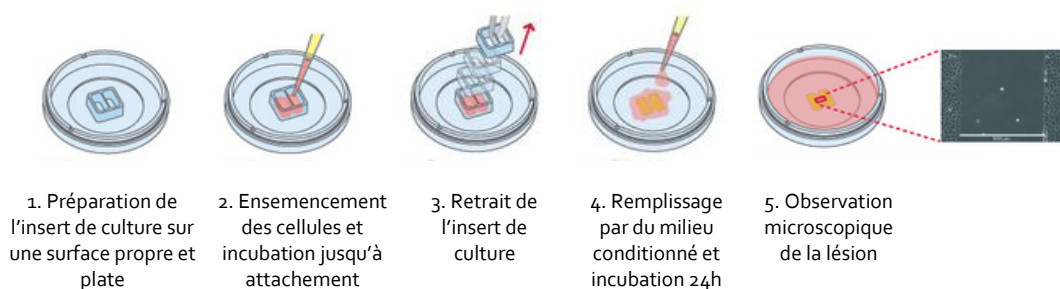
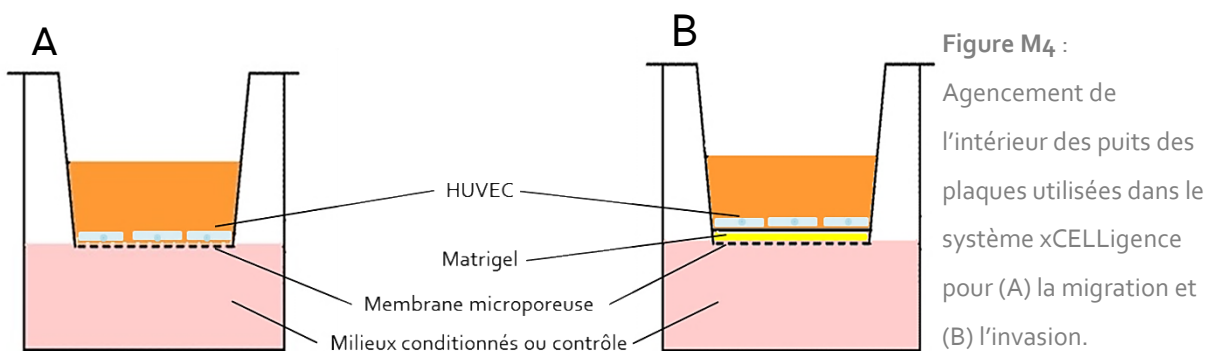


Figure M3 : Principe d'utilisation des inserts de culture dans le test de *wound healing* (modifié d'après idibi.com).

3.2. Migration et invasion en temps réel

Les analyses en temps réel de la migration et de l'invasion des HUVEC sous l'influence des milieux conditionnés par des CNH ou de CH ou de milieu contrôle ont été effectuées à l'aide du système *xCELLigence* (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgique). Il s'agit d'un instrument d'analyse des cellules en temps réel (RTCA) permettant un suivi continu de la réponse cellulaire tout au long de l'expérience. Pratiquement, dans ce système, les cellules étaient placées dans les puits de plaques (*cell invasion-migration plate* : CIM-plate) reliées au système RTCA et placées dans un incubateur humide à 37°C et 5% de CO₂. Les puits de la plaque étaient divisés en deux compartiments séparés par une membrane percée de pores de 8 µm et couverte d'électrodes. De cette façon, les cellules endothéliales déposées dans le compartiment supérieur pouvaient migrer vers le compartiment inférieur à travers la membrane en entraînant des variations de l'impédance mesurée par les électrodes. Ces variations d'impédance étaient transformées en *cell index* (CI) pour la migration et *cell invasion index* (CII) pour l'invasion, par un logiciel fourni par le fabricant (Roche Diagnostics). Ces index étaient dérivés du changement relatif d'impédance électronique représentant le statut de migration ou d'invasion cellulaire. Pour l'étude de l'invasion, la membrane séparant les puits était préalablement recouverte d'une fine couche de Matrigel® que les cellules devaient envahir avant de traverser la membrane (Figure M4).



3.3. Adhésion

Le test consistait à évaluer l'adhésion des HUVEC sur des substrats conditionnés par les milieux provenant de culture de CNH ou de CH ou par des milieux contrôles. Plus précisément, chaque condition du test était réalisée à partir du dépôt d'une goutte de milieu conditionné ou contrôle dans les puits d'une plaque à fond plat qui étaient conservées une nuit à 4°C pour permettre l'adsorption des éléments présents dans ces milieux au fond des puits. Les puits étaient ensuite délicatement rincés et séchés. Des HUVEC en suspension étaient alors déposées dans les puits et incubées 2h en milieu humide à 37°C et 5% de CO₂. Au terme de cette période, les puits étaient rincés et les noyaux des cellules attachées étaient colorés avec du cristal violet afin d'observer l'adhésion des cellules sur les différentes conditions de substrats. La coloration était quantifiée par mesure de l'absorbance à 560 nm.

4. PRÉ-TRAITEMENT DES HUVECS AVEC LE PEPTIDE GRGDS

Afin de vérifier si l'effet pro-angiogénique des milieux conditionnés de CH était lié à la présence de protéines porteuses d'un domaine Arg-Gly-Asp (RGD), les HUVEC ont préalablement été incubées dans du milieu de culture en présence d'un peptide Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS, 50 nmoles/l) dont la propriété est de se fixer aux intégrines $\alpha_v\beta_3$. Cette liaison empêche l'interaction des protéines à domaine RGD présentes dans les milieux conditionnés avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ ce qui a pour conséquence de diminuer leur adhésion au substrat (Figure M5). Les détails de cette manipulation se trouvent dans l'annexe 2.

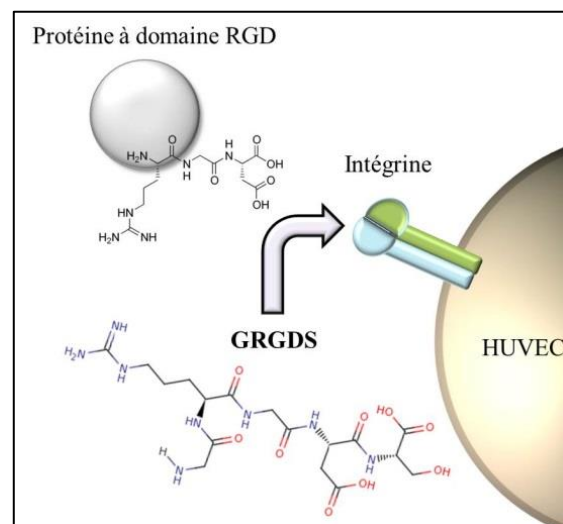


Figure M5 : Principe d'utilisation du GRGDS

5. PRÉPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES ET ANALYSES GÉNIQUES

L'ARN des chondrocytes a été isolé à partir de lysats cellulaires obtenus suite à la culture. Le niveau d'expression de certains gènes a été mesuré par RT-PCR quantitative en temps réel selon une technique précédemment décrite [188] et était normalisé par l'expression du gène de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT). Les amorces utilisées pour amplifier les séquences des gènes humains *col2a1*, *Sox9*, *ihh*, *ANKH* et *PTHrP* sont présentées dans la table M1. Les autres amorces se trouvent dans la table 1 de l'annexe 2.

Table M1 : Séquence nucléotidique des amorces sens et anti-sens utilisées pour amplifier les gènes humains codant le collagène de type II (*col2a1*), le facteur de transcription SRY-box9- (*Sox-9*), le facteur indien *hedgehog* (*ihh*), la *progressive ankylosis protein homolog* (*ANKH*) et le *parathyroid hormone related peptide* (*PTHrP*).

SEQUENCE	AMORCE SENS	AMORCE ANTI-SENS
<i>col2a1</i>	5'-GGATGCCCACTCAAG-3'	5'-TTGGGGTAGACGCAAG-3'
<i>Sox9</i>	5'-ACAACCCGTCTACACACAGC-3'	5'-ACGATTCTCCATCATCCTCC-3'
<i>ihh</i>	5'-GGAAGTCTGTACTGGG-3'	5'-AGGGGTCAACAACCAT-3'
<i>ANKH</i>	5'-GCTGCGTGCTATGTCT-3'	5'-GATGATGCCGAAGTGTC-3'
<i>PTHrP</i>	5'-CGGAGACTGGTTCAGC-3'	5'-GTGTGGATTTCTGCGATCA-3'

6. ANALYSES BIOCHIMIQUES

L'activité de la TG, de la PA et de la NTPPPH, trois enzymes impliquées dans les processus de minéralisation de la matrice extracellulaire du cartilage a été mesurée sur des extraits cellulaires dissociés par ultrasons dans un tampon tris. Les mesures d'activité de la PA et de NTPPPH sont présentées dans l'article 1. Des trousse de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) ont été utilisées pour mesurer l'AGG, le bFGF, l'IL-6, l'IL-8, la MMP-3, la TSP-1 et le VEGF dans le milieu conditionné par les chondrocytes arthrosiques. Ces dosages ont été réalisés selon le protocole du fabricant. Le NO a été mesuré par la méthode de Griess, [189]. Le niveau d'ADN des cellules a été mesuré à l'aide d'une méthode fluorométrique [190].

La BSP produite et sécrétée par les chondrocytes en culture a été évaluée par *western blot* à partir des extraits cellulaires et des milieux conditionnés (Table M2). Les résultats étaient normalisés par rapport au contenu en ADN des cellules mesuré par une méthode décrite [190] pour les dosages par méthode ELISA ou par rapport à la production de tubuline- α pour les *western blot* sur extraits cellulaires ou sur base d'observation des bandes colorées au rouge ponceau pour les *western blot* des milieux conditionnés. Les particularités techniques de ces analyses se trouvent dans les articles 2 et 3 en annexe.

6.1. Mesure de l'activité transglutaminase

Le substrat N-N-diméthylcaséine (VWR, Louvain, Belgique) était mis en solution dans un tampon tris 0,1M pH 8,5 à la concentration de 10 mg/ml. Après saturation dans une solution de 30g/L de lait écrémé en poudre, les échantillons ainsi que la courbe de référence préparée à partir de transglutaminase de cochon d'Inde (Sigma Aldrich, Bornem, Belgique), étaient incubés à 37°C en présence de CaCl₂ 10mM, tris 0,1M PH 8,5, 5-(biotinamido)

pentylamine 0,5mM (Thermo Scientific, Aalst, Belgique) et de dithiothreitol (DTT) 10mM (Sigma Aldrich, Bornem, Belgique). Au terme d'1h d'incubation en présence d'une solution de streptavidine-peroxydase, la une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) était ajoutée et la réaction stoppée après 20 minutes par l'ajout d'H₂SO₄. L'absorbance résultante était mesurée à 450 nm.

Table M2 : Méthodes de dosage utilisées pour mesurer l'ADN, la lactate deshydrogénase (LDH), l'agrécane (AGG), la *bone sialoprotein* (BSP), le basic fibroblast growth factor (bFGF), les interleukines (IL)-6 et -8, la *matrix metalloproteinase* (MMP)-3, l'oxyde nitrique (NO), la *nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase* (NTPPPH), la phosphatase alcaline (PA), la transglutaminase (TG), la thrombospondine-1 (TSP-1) et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF).

DOSAGES BIOCHIMIQUES		
FACTEUR ANALYSÉ	LOCALISATION	MÉTHODE
ADN	Extraits cellulaire	Fluorimétrie – Hoescht (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)
LDH	Extraits cellulaires Milieux de culture conditionnés	Enzymatique (activité, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)
AGG	Extraits cellulaires Milieux de culture conditionnés Alginate	ELISA (Invitrogen, Gand, Belgique)
BSP	Extraits cellulaires Milieux de culture conditionnés	Western blot (anticorps LFMb24, Santa Cruz Biotechnology, Allemagne)
bFGF	Milieux de culture conditionnés	ELISA (R&D systems, Abingdon, Angleterre)
IL-6	Milieux de culture conditionnés	ELISA (Invitrogen, Gand, Belgique)
IL-8	Milieux de culture conditionnés	ELISA (Invitrogen, Gand, Belgique)
MMP-3	Milieux de culture conditionnés	ELISA (Invitrogen, Gand, Belgique)
NO	Milieux de culture conditionnés	Réaction de Griess (?)
NTPPPH	Extraits cellulaires	Enzymatique (activité, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)
PA	Extraits cellulaires	Enzymatique (activité, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)
TG	Extraits cellulaires	Enzymatique (activité, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)
TSP-1	Milieux de culture conditionnés	ELISA (R&D systems, Abingdon, Angleterre)
VEGF	Milieux de culture conditionnés	ELISA (R&D systems, Abingdon, Angleterre)

7. HISTOLOGIE

L'étude histologique présentée dans l'article 2 a été réalisée à partir d'articulation de genou de trente-trois individus différents. Vingt-quatre de ces articulations étaient issues de patients arthrosiques opérés pour la pose d'une prothèse de genou et les neuf de cadavres. Des biopsies avaient été prélevées au niveau du plateau tibial médian des articulations et enchâssées en paraffine pour pouvoir préparer des coupes histologiques.

7.1. Analyse de la dégradation du cartilage selon le *photographic chondropathy score*

Le score macroscopique de dégradation du cartilage utilisé dans cette étude a fait l'objet d'une publication par l'équipe du Docteur D. Walsh en 2009 [10]. Ce système de classement se base sur l'analyse de l'apparence du cartilage de genou au niveau des condyles fémoraux et plateau tibiaux médians et latéraux. Le tissu arthrosique présente en effet des changements caractéristiques (modifications de la couleur et de la texture à la

surface du tissu) dont la sévérité se voit attribuer un grade (0 à 4 avec le grade 0 correspondant à un cartilage normal). Chaque pièce de l'articulation est observée afin d'estimer le pourcentage de la surface qui représente chaque grade (Figure M6).

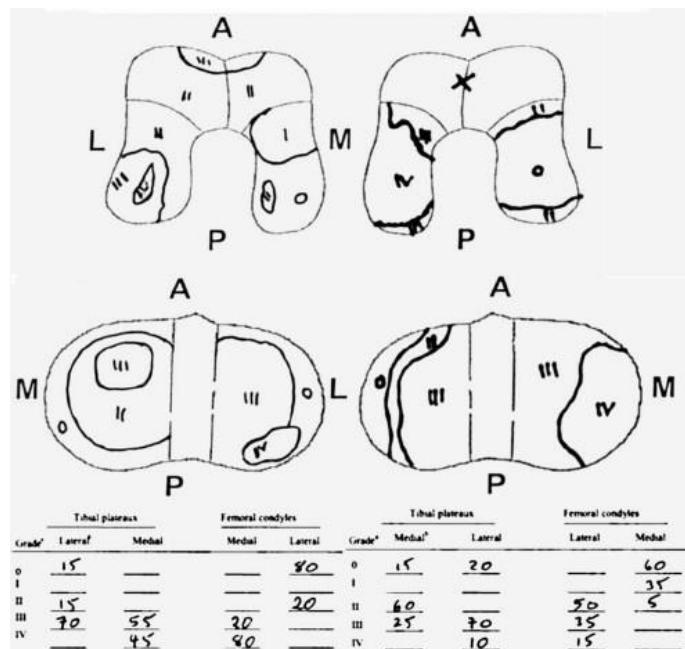


Figure M6 : Illustration du système de classement des articulations de genou selon le *photographic chondropathy score* (PCS) (d'après Walsh, 2009 [10])

7.2. Analyse de la dégradation du cartilage selon le score de Mankin

Il s'agit d'une méthode d'évaluation histopathologique de la dégradation du cartilage publiée en 1971 par Mankin *et al.* [39]. Elle repose sur l'analyse microscopique de l'apparence du cartilage suite à une coloration des coupes histologiques avec l'hématoxyline, la safranine-O et le vert lumière. La technique de coloration est décrite dans l'article 2. Le score de Mankin est établi sur l'observation des critères d'intégrité de la surface articulaire, d'apparence des chondrocytes, de perte du contenu en protéoglycanes de la matrice extracellulaire et d'intégrité de la *tidemark* (Table M3).

Table M₃ : Critères d'évaluation permettant d'établir un grade à une coupe histologique de cartilage selon le score de Mankin.

SCORE DE MANKIN		
COMPOSANT	SOUS-COMPOSANT	GRADE
Intégrité de la surface articulaire	Normal	0
	Irrégularités de la surface	1
	Irrégularités de la surface et du pannus	2
	≥ 2 fissures dans la zone moyenne	3
	≥ 2 fissures dans la zone profonde	4
	≥ 2 fissures dans la zone calcifiée	5
	Désorganisation complète	6
Apparence des chondrocytes	Normale	0
	Hyper-cellularité diffuse	1
	Clones (une cellule avec ≥ 5 noyaux)	2
	Hypo-cellularité	3
Perte de protéoglycans	Normale	0
	Réduction faible	1
	Réduction modérée	2
	Réduction sévère	3
	Plus de coloration	4
Intégrité de la tidemark	Intacte	0
	Traversée par des vaisseaux sanguins	1
SCORE TOTAL		0-14

8. IMMUNOHISTOCHIMIE

Des expériences de marquage immunohistochimique ont été menées afin de détecter la présence de structures vasculaires et de la BSP dans les coupes histologiques de cartilage. Chaque coupe de cartilage a été analysée en aveugle par deux observateurs différents. Les modalités techniques des marquages immunohistochimique se trouvent dans l'article en annexe 3.

8.1. Analyse de la densité vasculaire

La présence de vaisseaux au sein du cartilage a été mise en évidence par des anticorps dirigés contre la glycoprotéine membranaire CD34 selon une technique utilisée dans les travaux publiés par l'équipe du Dr D. Walsh (Nottingham, Royaume-Uni) [57, 99, 103] dont les détails sont décrits dans l'annexe 3. La densité vasculaire de chaque coupe a ensuite été calculée en divisant le nombre de structures vasculaires observée par la longueur de la *tidemark*, mesurée à l'aide d'un pied à coulisse directement sur la lame porte-objet. Par exemple, l'observation de 4 structures vasculaires sur une coupe de cartilage où la *tidemark* mesurait 10 millimètres donnait une densité vasculaire de 0,4 structures vasculaires par millimètre de *tidemark*.

8.2. Détection de la *bone sialoprotein*

La détection de BSP dans le cartilage a été effectuée à l'aide d'un monoclonal (LFMb25, Santa Cruz Biotechnology, Allemagne). Cette technique est décrite en détails dans l'article en annexe 3.

9. ANALYSES STATISTIQUES

L'ensemble des analyses statistiques de ce travail ont été effectuées avec le logiciel Graph Pad Prism version 6. Les ANOVA ont été suivies d'un post-test de Dunnett pour comparer chaque condition de l'expérience à une condition de référence ou d'un post-test de Tukey pour comparer toutes les conditions entre elles. Les résultats d'analyse ne présentant que deux conditions ont été comparés avec un test de Student. Le niveau de corrélations entre les données était évalué par un test de corrélation de Spearman.

RÉSULTATS & DISCUSSION

PARTIE 1 : MISE AU POINT D'UN MODÈLE DE CULTURE DE CHONDROCYTES

ARTHROSQUES HYPERTROPHIQUES

L'objectif de cette recherche consistait à mettre au point un modèle de culture permettant l'étude de la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques. Nous avons utilisé des chondrocytes provenant du cartilage articulaire de patients arthrosiques opérés pour la pose d'une prothèse totale de genou. Plusieurs conditions de culture ont été testées et comparées, afin de déterminer celles favorisant la différenciation hypertrophique des chondrocytes.

1. INFLUENCE DU MODÈLE DE CULTURE SUR LA DIFFÉRENCIATION HYPERTROPHIQUE DES CHONDROCYTES

Lors d'une première expérience, nous avons comparé le niveau d'expression de marqueurs de l'hypertrophie par des chondrocytes cultivés en monocouche ou en bille d'alginate, dans du milieu de culture enrichi en FBS à 10%. Les gènes codant le collagène de type II (*col2a1*), l'AGG et *Sox9*, exprimés spécifiquement par les chondrocytes matures ainsi que certains gènes caractéristiques du stade pré-hypertrophique (le récepteur de l'hormone parathyroïde (PTHR) et *ihh*) et du stade hypertrophique (le collagène de type X et *runx2*) ont été analysés dans toutes les conditions. L'activité d'enzymes impliquées dans les processus de minéralisation de la matrice extracellulaire du cartilage (TG, NTPPPH) a également été quantifiée. La viabilité cellulaire, mesurée par un dosage de l'activité lactate déshydrogénase, était inférieure à 5% dans toutes les conditions expérimentales. La durée de culture était de 21 jours et nous avons normalisé l'expression des gènes par rapport à l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), et l'activité enzymatique par la quantité d'ADN contenue dans les cultures. Nous avons observé que, au terme de 21 jours de culture en présence de 10 % de FBS, les chondrocytes présentaient un phénotype plus hypertrophique en billes d'alginate par rapport à la culture en monocouche. En effet, en culture en billes d'alginate, les chondrocytes exprimaient davantage de PTHR (11x), d'*ihh* (7x), de *cola10a1* (5x) et de *runx2* (2x) par rapport à la culture en monocouche (Figure R1). De plus, l'activité des enzymes impliquées dans la minéralisation était également plus élevée en billes d'alginate qu'en monocouche (TG 4,5x et NTPPPH 1,3x) (Figure R1).

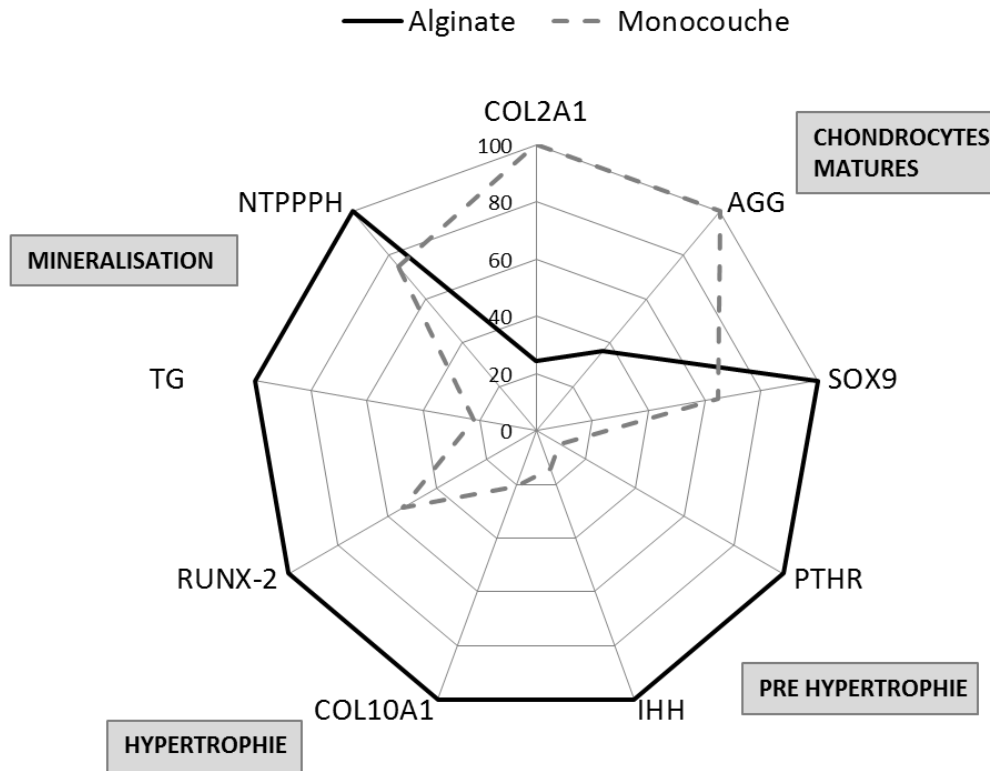


Figure R4 : Comparaison de l'expression par les chondrocytes arthrosiques de gènes caractéristiques du phénotype des chondrocytes matures, du phénotype pré-hypertrophique, du phénotype hypertrophique et de l'activité des enzymes de la minéralisation dans les modèles de culture, après 21 jours de culture en monocouche (pointillés) ou en billes d'alginate (trait plein) en présence de 10% de FBS. Les données sont présentées en pourcentage de la condition dans laquelle l'expression ou l'activité enzymatique est la plus élevée (n=1).

Suite à cette première expérience, nous avons décidé de continuer notre travail sur le modèle de culture en billes d'alginate.

2. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE SUR LA DIFFÉRENCIATION HYPERTROPHIQUE DES CHONDROCYTES

Nous avons ensuite comparé l'influence de différents milieux de culture sur l'expression de gènes caractéristiques du phénotype mature, pré-hypertrophique et hypertrophique par les chondrocytes et sur l'activité d'enzymes impliquées dans la minéralisation de la matrice extracellulaire:

- un milieu contenant 10% de FBS,
- un milieu contenant 2% d'Ultroser G, un substitut de sérum (UG),
- un milieu dépourvu de sérum et contenant 1% d'ITS+.

2.1. Étude des gènes caractéristiques du phénotype des chondrocytes matures

En présence d'UG, les chondrocytes exprimaient significativement plus de Col2a1 ($\times 1,4$; $p < 0,05$) qu'en présence de FBS. Les niveaux d'expression d'AGG et Sox-9 étaient similaires dans les deux groupes. En présence d'1% ITS+, les chondrocytes exprimaient significativement moins de Col2a1 (-94% ; $p < 0,001$) et de Sox-9 (-44% ; $p < 0,001$). Par contre, l'expression d'AGG était similaire à celle observée en présence de FBS (figure R2).

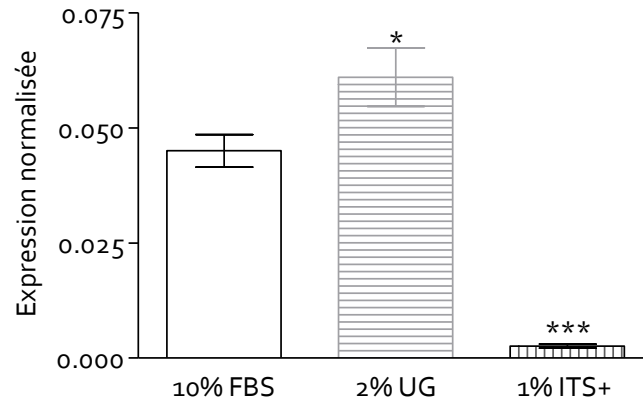
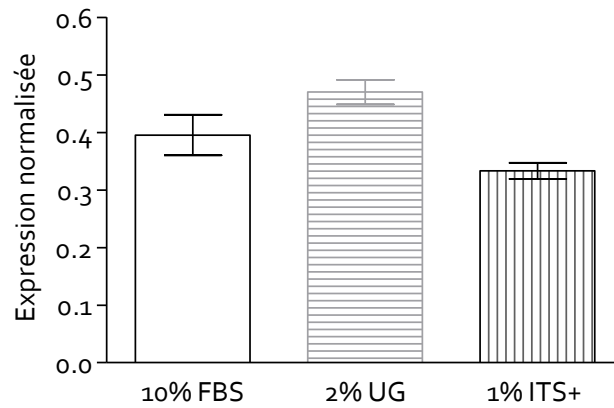
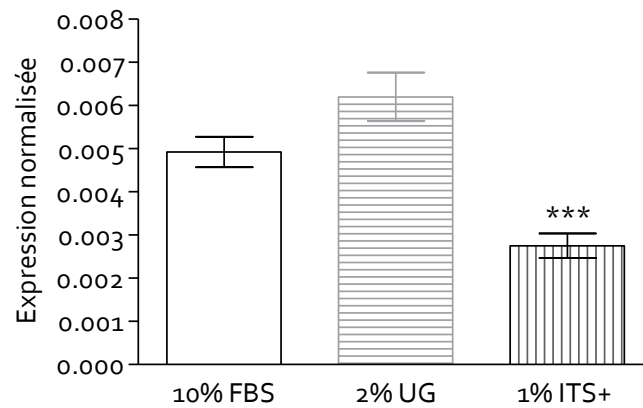
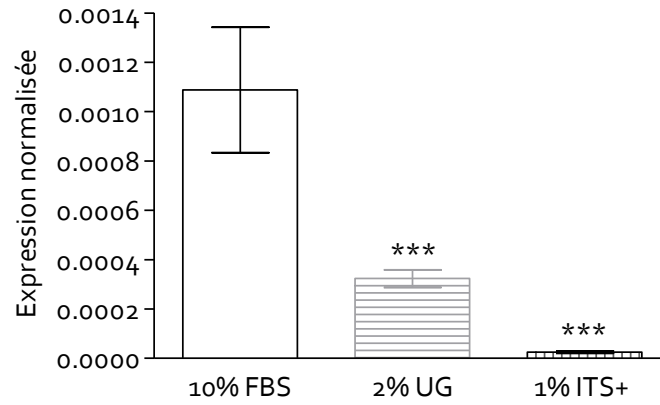
Col2a1**AGG****Sox9**

Figure R2 : Expression des gènes COL2A1, AGG et Sox-9 par les chondrocytes après 21 jours de culture en billes d'alginate dans un milieu contenant 10% de FBS, 2% d'UG ou 1% d'ITS+. Les résultats sont exprimés en nombre de copies de gène normalisé par rapport à GAPDH et sont représentés par la moyenne de deux cultures indépendantes avec chaque condition réalisée en triple (n=6) ± la déviation standard. Les significations statistiques ont été obtenues par le test de Student, * = $p < 0,05$ et *** = $p < 0,001$.

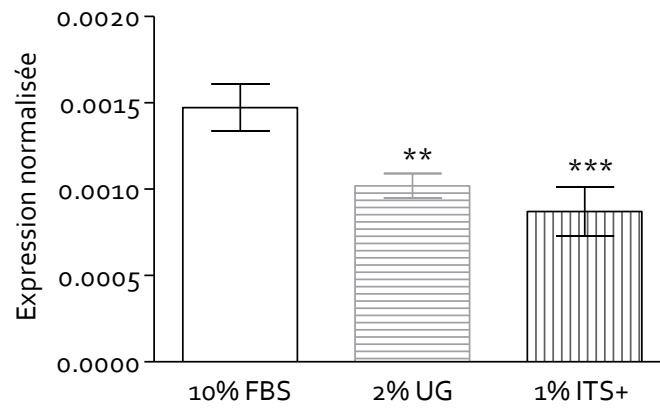
2.2. Étude des gènes caractéristiques du phénotype des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques

En présence d'UG, les chondrocytes exprimaient moins les gènes *col10a1* (-80%; $p < 0,001$), *runx2* (-31%; $p < 0,01$) et *lhh* (-70%; $p < 0,001$) qu'en présence de FBS. Les chondrocytes cultivés dans un milieu contenant 1% d'ITS+, exprimaient quant à eux moins de *col10a1* (-94%; $p < 0,001$), de *runx2* (-41%; $p < 0,001$) et d'*lhh* (-98%; $p < 0,001$) qu'en présence de FBS (Figure R3).

ihh



runx2



col10a1

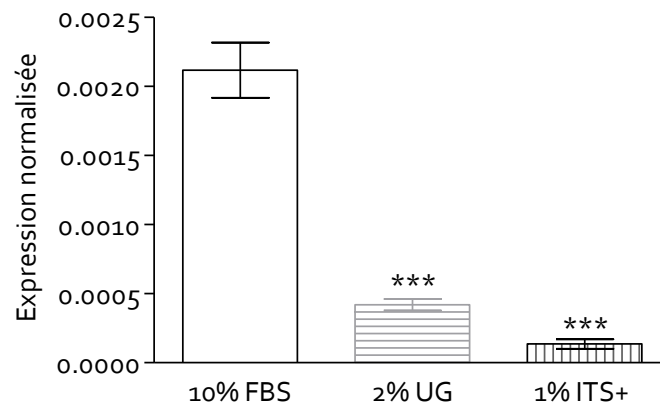
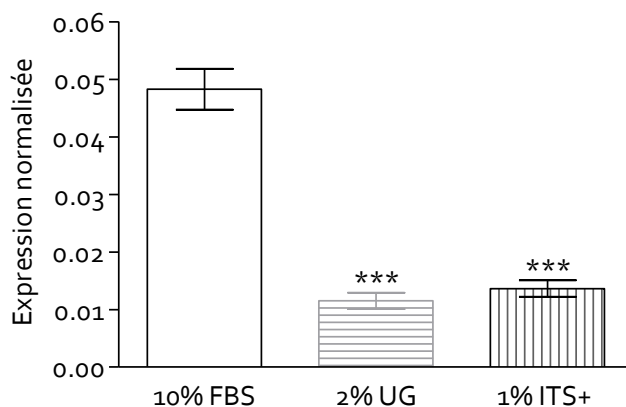


Figure R3: Expression des gènes *ihh*, *runx2* et *col10a1* par les chondrocytes après 21 jours de culture. Les cultures ont été réalisées en billes d'alginate dans un milieu contenant soit 10% de FBS, soit 2% d'UG, soit 1% d'ITS+. Les résultats sont exprimés en nombre de copies de gène normalisé par rapport au gène de GAPDH et sont représentés par la moyenne de deux cultures indépendantes avec chaque condition réalisée en triple (n=6) \pm la déviation standard. Les significations statistiques ont été obtenues par le test de Student, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$.

2.3. Étude des enzymes impliqués dans la minéralisation de la matrice extracellulaire

L'activité de type transglutaminase était similaire dans les trois conditions de culture (figure R4). L'activité des NTPPPH était plus faible en présence d'UG (-38%, $p < 0,001$) ou d'ITS+ (-90%, $p < 0,001$) en comparaison avec les cultures réalisées en FBS (figure R4).

TG



NTPPPH

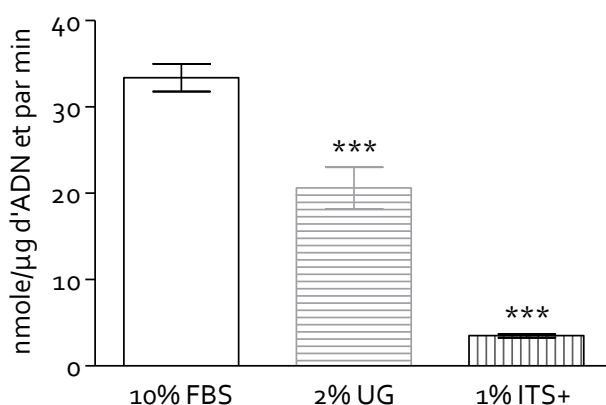
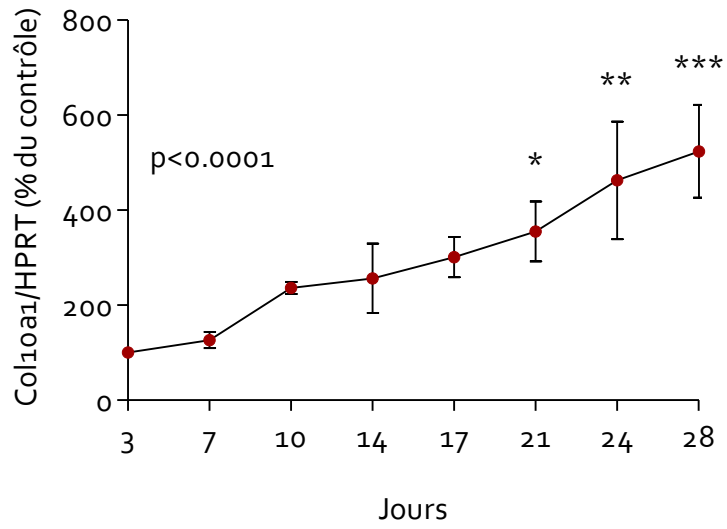
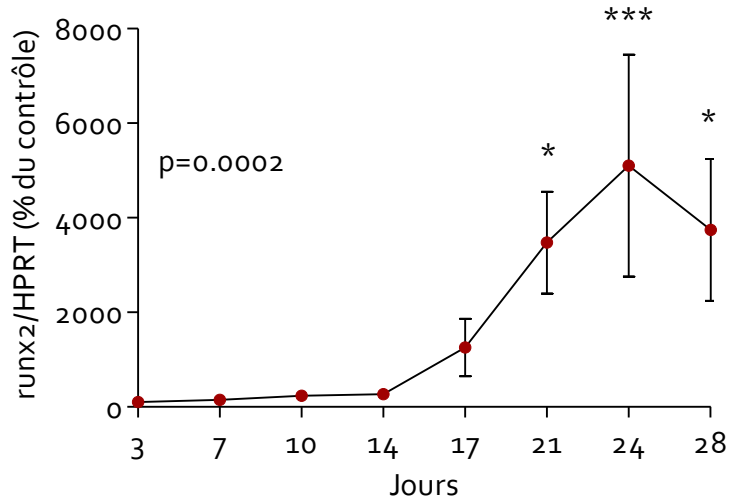
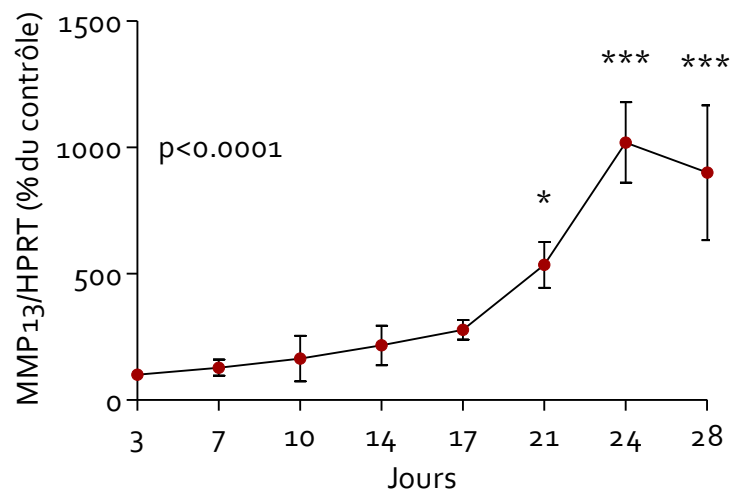


Figure R4: Activité enzymatique des TG et des NTPPPH par les chondrocytes après 21 jours de culture. Les cultures ont été réalisées en billes d'alginate dans un milieu contenant soit 10% de FBS, soit 2% d'UG, soit 1% d'ITS+. Les résultats sont normalisés par rapport au contenu en ADN des cultures et sont représentés par la moyenne de deux cultures indépendantes avec chaque condition réalisée en triple ($n=6$) \pm la déviation standard. Les significations statistiques ont été obtenues par le test t-Student, *** = $p < 0,001$.

3. CINÉTIQUE DE L'EXPRESSION/DE L'ACTIVITÉ DES MARQUEURS SPÉCIFIQUES DE L'HYPERTROPHIE

Les conditions de culture les plus favorables à l'expression marqueurs de l'hypertrophie étaient la culture en alginate en présence de 10% de sérum. Dès lors, nous avons utilisé ces conditions pour déterminer la cinétique d'expression de ces marqueurs (Figure R5). Quatre profils distincts ont été observés (Figure R5). L'expression de runx2 était faible jusqu'au 14^{ème} jour puis augmentait jusqu'au 24^{ème} jour et ensuite diminuait légèrement les 4 derniers jours de culture. L'activité PA était faible avant le 17^{ème} jour, augmentait fortement entre le 17^{ème} et le 21^{ème} jour et ensuite restait stable. L'expression de Col10a1 et l'activité NTPPPH augmentaient de façon presque linéaire avec les temps. La MMP-13 augmentait de façon exponentielle entre le 3^{ème} et le 21^{ème} jour.

Col10a1**runx2****MMP-13**

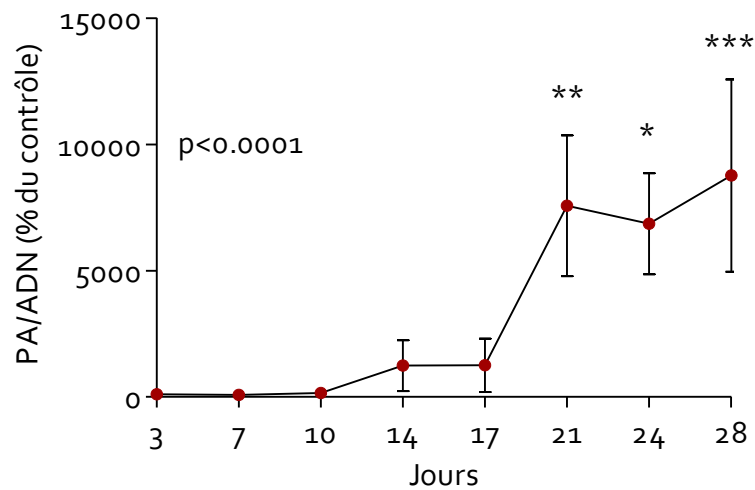
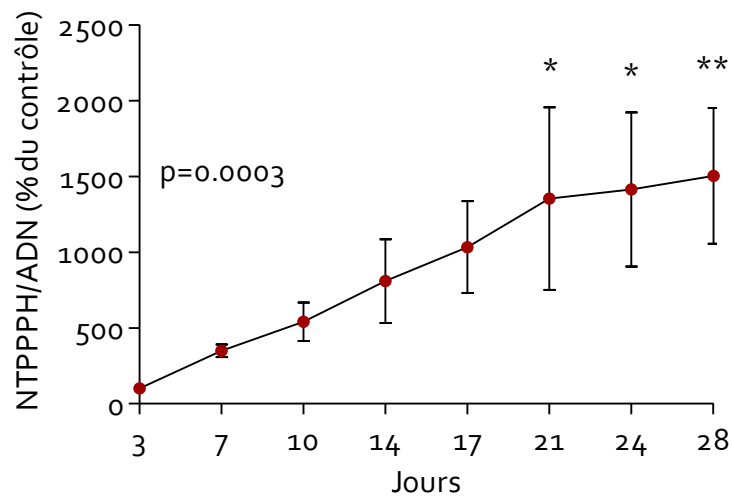
PA**NTPPPH**

Figure R5 : Evolution de l'expression ou de l'activité des marqueurs spécifiques de l'hypertrophie par les chondrocytes arthrosiques en culture pendant 28 jours dans un milieu enrichi en FBS à 10%. L'expression génique est normalisée par l'expression d'HPRT et l'activité enzymatique est rapportée à l'ADN contenu dans les cellules. Les résultats sont représentés par la moyenne de trois cultures indépendantes avec chaque condition réalisée en triple (n=9) \pm la déviation standard. Les données sont présentées en pourcentage du contrôle (jour 3). La signification statistique a été obtenue par un test ANOVA suivi d'un post-test de Tukey.

4. ÉTUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CHONDROCYTES DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE

L'observation de l'apparence des chondrocytes cultivés en billes d'alginate a permis de démontrer la présence de nombreuses cellules dont le volume intracellulaire était nettement augmenté lorsqu'elles étaient cultivées au moins 21 jours dans un milieu enrichi en FBS à 10% (Figure R6). Des photographies des coupes de billes ont été prises sous microscope dans des zones représentatives. La surface (moyenne±déviatiion standard) de tous les chondrocytes présents dans la zone de taille standardisée observée était de $119,5\pm 96,01 \mu\text{m}^2$ pour les chondrocytes cultivés 21 jours dans un milieu contenant 10% de FBS, alors qu'elle était seulement de $75,4\pm 23,33 \mu\text{m}^2$ (-36,9% ; $p=0,0083$) pour des chondrocytes cultivées 21 jours en milieu enrichi en UG à 2% et de $68,68\pm 19,72 \mu\text{m}^2$ (-42,5% ; $p=0,0003$) et $68,4\pm 25,12 \mu\text{m}^2$ (-42,74% ; $p=0,0026$) pour des chondrocytes cultivés 3 jours dans du milieu contenant 10% de FBS ou 2% d'UG, respectivement.

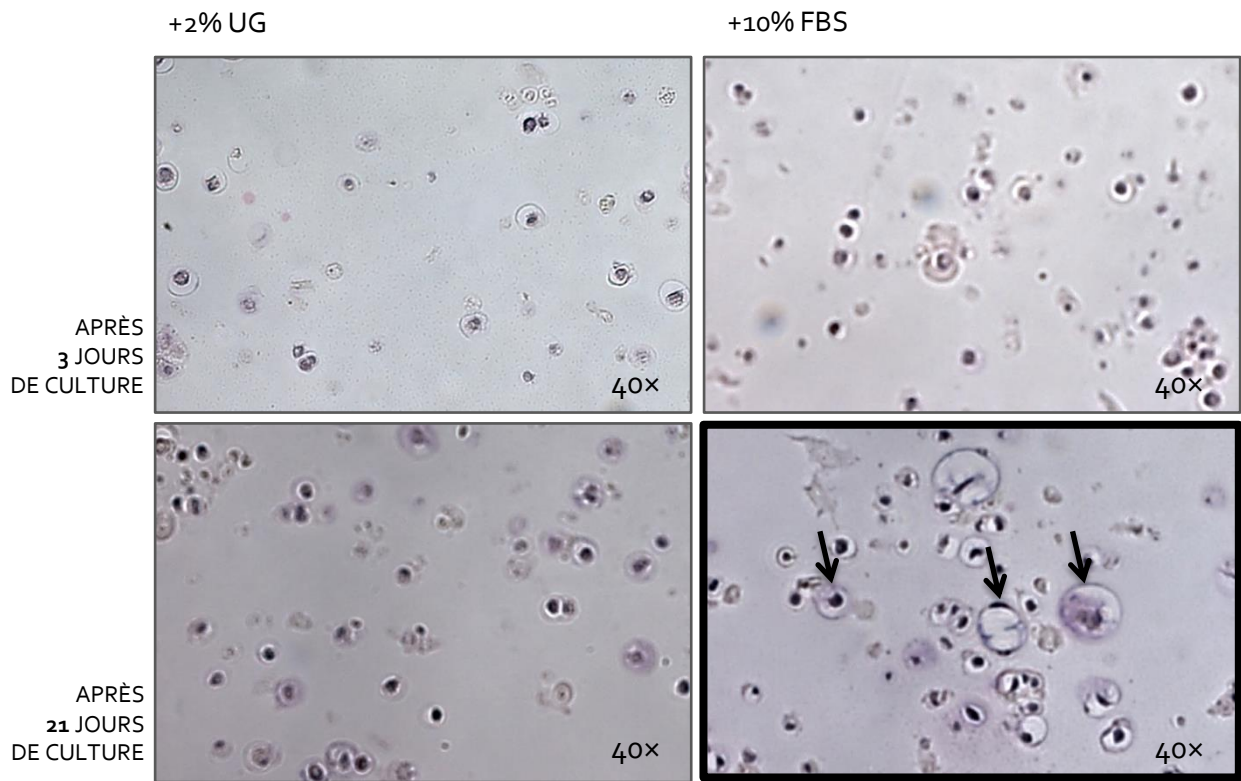


Figure R6 : Coloration hématoxyline-éosine de coupes réalisées dans des billes d'alginate cultivées dans du milieu enrichi en sérum de bœuf foetal (FBS) à 10% ou en Ultrosor G (UG) à 2% pendant 3 ou 21 jours. Les flèches indiquent des chondrocytes cultivés 21 jours dans du milieu enrichi en FBS à 10% dont la surface est nettement augmentée.

PARTIE 1 : DISCUSSION

Dans cette première partie du travail, nous avons étudié l'influence de certaines conditions de culture sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Plus particulièrement, nous avons étudié l'influence d'une matrice naturelle, l'alginate, et du sérum de boeuf fœtal sur des marqueurs de l'hypertrophie.

Nous avons observé que les chondrocytes évoluaient vers l'hypertrophie lorsqu'ils étaient cultivés en bille d'alginate pendant 28 jours dans un milieu contenant 10% de FBS. Le modèle de culture des chondrocytes en billes d'alginate permet de maintenir les cellules dans un environnement tridimensionnel proche de leurs conditions *in vivo*, contrairement aux cultures en monocouche au cours desquelles les cellules s'allongent et se multiplient. Sanchez *et al.* ont observé qu'en billes d'alginate, les chondrocytes conservent leur morphologie sphérique, ne se divisent pas et ne synthétisent pas de collagène de type I {Sanchez, 2002 #253}. Jusqu'ici, peu de modèles de culture de chondrocytes hypertrophiques ont été développés. La plupart de ceux-ci ont été établis en culture en monocouche, et aucun en billes d'alginate {Cheung, 2003 #256}{Descalzi Cancedda, 1992 #257}. Certains scientifiques travaillent à partir d'un petit nombre de cellules qu'ils cultivent en monocouche et les passent plusieurs fois pour obtenir un plus grand nombre de cellules à mettre en billes d'alginate. Il a cependant été montré que les chondrocytes se différencient vers un phénotype fibroblastique à partir d'environ 5 passages des cellules {Caron, 2012 #254}. Dans ce travail, nous avons réalisé des cultures primaires avec des chondrocytes n'ayant subi aucun « passage ». Notre technique explique donc pourquoi les chondrocytes cultivés en monocouche évoluent tout de même vers un phénotype hypertrophique, quoique de façon moins importante que ceux cultivés en billes d'alginate.

Nous avons constaté, au cours de ce travail, que cette différenciation hypertrophique des chondrocytes était plus importante en billes d'alginate qu'en monocouche. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène :

- a) Le fait que les chondrocytes, en billes d'alginate, conservent leur morphologie sphérique, suggère que l'alginate serait plus propice à cette différenciation, différenciation au cours de laquelle les chondrocytes in vivo augmentent jusqu'à 10x de volume.
- b) En billes d'alginate, contrairement à la culture en monocouche, les chondrocytes se retrouvent comme in vivo entourés de matrice extracellulaire et n'ont pas beaucoup de contacts intercellulaires.
- c) La grande concentration extracellulaire en calcium de la bille d'alginate joue probablement un rôle important dans l'expression des gènes de l'hypertrophie et de la minéralisation. Il est, en effet, connu que l'expression et l'activité des TG est accrue par de fortes concentrations calciques {Yoo, 2005 #65}.

L'Ultroser G est défini comme un substitut du FBS dont la composition exacte n'est pas connue. La feuille de données du produit spécifie que « 2% du substitut de sérum reconstitué Ultroser G est équivalent à 10% de sérum de veau foetal dans le milieu de base ». C'est pourquoi les concentrations de FBS à 10% et d'Ultroser G à 2% ont été choisies pour étudier leur influence sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes. La comparaison dans ces deux conditions de l'expression et de l'activité des marqueurs sélectionnés a permis de mettre en évidence un effet stimulant du sérum. Le changement de phénotype vers l'hypertrophie en présence de sérum pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vivo*, les chondrocytes articulaires, en conditions physiologiques, se trouvent dans un milieu extracellulaire sans sérum, le cartilage sain étant dépourvu de vascularisation. L'ossification endochondrale et la différenciation hypertrophique des chondrocytes se déroulent lors de l'invasion vasculaire du cartilage de croissance. De même, dans le cartilage arthrosique, une néo-vascularisation est observée. Cette vascularisation enrichirait le milieu extracellulaire des chondrocytes en facteurs de croissance, ce qui serait à l'origine de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Cette hypothèse permettrait d'expliquer nos observations, c'est-à-dire une meilleure différenciation hypertrophique en présence de FBS par rapport à un milieu dépourvu de sérum ou d'un substitut de sérum, l'Ultroser G, probablement moins riche que le FBS en facteurs de croissance. Quarto *et al.* ont montré que des chondrocytes dédifférenciés mis en culture dans un milieu sans sérum, mais additionné de triiodothyronine (T₃), d'insuline et de dexaméthasone, proliféraient et se différenciaient jusqu'au stade hypertrophique {Quarto, 1992 #258}. En effet, ils ont montré que, lorsque les chondrocytes étaient cultivés en présence de deux hormones, l'insuline et l'hormone thyroïdienne T₃, il y avait prolifération des chondrocytes. Au cours de cette prolifération, ils observaient que les chondrocytes synthétisaient, au détriment du collagène de type I, plus de collagène de type II, caractéristique du phénotype cartilagineux non

hypertrophique. Par contre, en présence de dexaméthasone, un glucocorticoïde, les chondrocytes exprimaient, au détriment du collagène de type II, davantage de collagène de type X, caractéristique du stade hypertrophique de leur différenciation. En général, plusieurs molécules peuvent être impliquées dans la différenciation hypertrophique. Il peut s'agir de facteurs de croissance, d'hormones, de molécules de la matrice ou encore de protéases [5]. Par exemple, en 1992, Bohme *et al* ont montré que la thyroxine était un fort initiateur de l'hypertrophie des chondrocytes [207]. Cet effet avait aussi été confirmé pour la tri-iodothyronine [208]. Ces deux hormones se trouvent dans le sang et peuvent donc être en partie responsables de la différenciation des chondrocytes. Par extrapolation, nous pourrions penser que des facteurs de croissance, comme des hormones stéroïdiennes contenues dans le sérum, pourraient influencer la différenciation hypertrophique.

Cette constatation suggère un rôle joué par les facteurs sériques et par extension une influence des facteurs contenus dans le sang des individus arthrosiques sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes. En résumé, un apport sanguin était nécessaire pour que les chondrocytes puissent entrer dans le processus de différenciation, ce qui nous menait directement à l'hypothèse de l'existence d'une relation entre l'hypertrophie et l'invasion du cartilage articulaire arthrosique par des vaisseaux sanguins, le processus de néo-vascularisation ou angiogenèse.

Les marqueurs permettant de caractériser le phénotype des chondrocytes dans cette étude préliminaire ont été sélectionnés sur base des informations disponibles dans la littérature. Le collagène de type II et l'aggrécan sont les principaux composants de la matrice extracellulaire du cartilage [194]; SOX-9 encode un facteur de transcription impliqué dans le maintien du phénotype différencié des chondrocytes [195, 196]. Tout trois représentent de ce fait des marqueurs d'un phénotype mature différencié du chondrocyte. Le rôle du PTHrP et de l'ihh dans le contrôle de la différenciation des chondrocytes a été décrit depuis longtemps [15], c'est pourquoi ils ont été choisis comme marqueurs du phénotype pré-hypertrophique. Afin d'évaluer l'état d'hypertrophie des chondrocytes, des marqueurs spécifiques ont été choisis sur base des informations disponibles dans la littérature. Le collagène de type X et la MMP-13 sont les marqueurs de l'hypertrophie les plus largement utilisés {von der Mark, 1992 #40}{von der Mark, 1995 #42}{Nurminskaya, 1996 #159}. Le facteur de transcription runx2 a été de nombreuses fois montré comme étant associé à l'hypertrophie {Enomoto, 2000 #58}{James, 2005 #6}{Dong, 2006 #7}. Parmi les enzymes et gènes impliqués dans le processus de minéralisation de la matrice extracellulaire du cartilage, la TG [149, 199], la NTPPPH [142] et la PA avaient été choisies. La phosphatase alcaline et le NTPPPH participent au processus de calcification de la matrice extracellulaire associée à l'hypertrophie [63, 206].

La limitation majeure de cette étude réside dans la non-disponibilité d'informations issues de cultures de chondrocytes non-arthrosiques. L'obtention de telles cellules est limitée et pose des questions éthiques importantes. Nous nous sommes donc concentrés sur la comparaison de chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques et hypertrophiques.

L'ensemble des résultats de cette première partie du travail nous a conduit à considérer dans la suite de notre recherche que les chondrocytes arthrosiques cultivés au moins 21 jours dans un milieu enrichi en 10% de FBS exprimaient un phénotype hypertrophique, en opposition avec les mêmes chondrocytes cultivés 3 jours en 10% FBS, qui étaient dès lors considérés comme non-hypertrophiques. Les CH synthétisent probablement des médiateurs spécifiques qui influencent les cellules qui leur sont adjacentes et induisent l'activation d'événements spécifiques. L'angiogenèse pourrait être un de ces événements. Pour vérifier cette hypothèse, des analyses fonctionnelles ont été réalisées dans le but d'examiner si les milieux conditionnés par des CH pouvaient contenir des facteurs capables d'influencer le comportement de cellules endothéliales. Les milieux de culture conditionnés par les chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques ou hypertrophiques ont été récoltés pour être utilisés dans ces tests fonctionnels d'angiogenèse.

PARTIE 2 : EFFETS DES MILIEUX CONDITIONNÉS PAR LES CHONDROCYTES**ARTHROSQUES HYPERTROPHIQUES SUR L'ANGIOGENÈSE**

Dans cette deuxième partie de notre travail, nous avons étudié l'effet de milieux de culture conditionnés par des CH sur l'angiogenèse. Les milieux de culture conditionnés étaient collectés après une période de 24h d'incubation des chondrocytes arthrosiques dans un milieu de culture DMEM sans FBS. L'angiogenèse a été étudiée grâce à l'utilisation de plusieurs tests fonctionnels réalisés avec des cellules endothéliales de type HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*). Il s'agissait des tests de *wound healing*, de migration et d'invasion en temps réel et d'adhésion des HUVEC.

1. EFFET SUR LE WOUND HEALING

Le test de *wound healing* ou de cicatrisation par des cellules endothéliales est représentatif du phénomène de migration cellulaire qui a lieu notamment lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Le test consistait à simuler la cicatrisation par création d'une lésion d'une taille standardisée (500 μm) au sein d'une monocouche d'HUVEC à confluence, les HUVEC étant censées migrer vers l'intérieur de la lésion pour la combler progressivement. Ensuite, le tapis cellulaire était recouvert de milieu de culture conditionné par des chondrocytes non-hypertrophiques (CNH) ou des CH ou de milieu non conditionné (contrôle). L'effet des différents milieux était évalué par la mesure sur base de photographies prises sous microscope optique après 24h d'incubation. Cette largeur de la lésion était comparée à la largeur initiale avant incubation (Figure R7a). La taille de la lésion a pu être quantifiée grâce à l'utilisation de l'outil de mesure disponible dans le logiciel image J (Figure R7b).

- Les milieux conditionnés par les CH induisaient une diminution de $20\% \pm 2,1$ (moyenne \pm écart-type) de la taille de lésion (h0 versus h24h ; $p < 0,001$) alors qu'en présence de milieux conditionnés par les CNH, la taille de la lésion diminuait de seulement $10\% \pm 0,6$ après 24h. La différence entre les deux conditions était significative ($p < 0,05$).

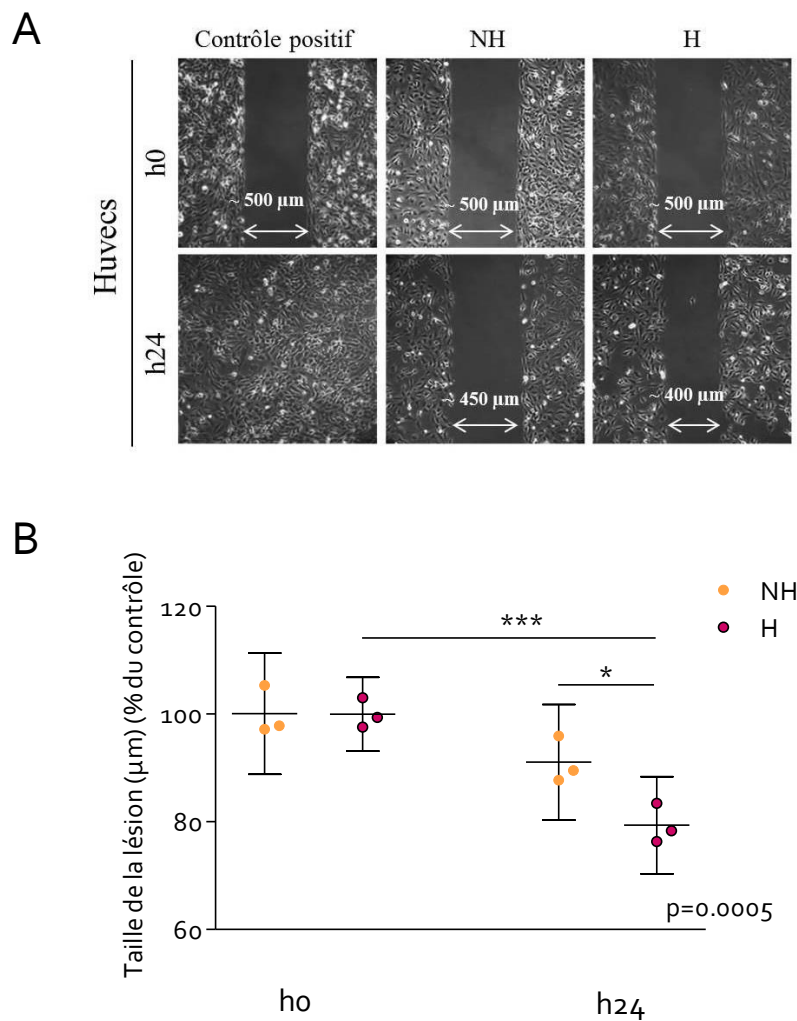


Figure R7 : Evaluation de la migration des cellules endothéliales en présence de milieux conditionnés par des chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques (NH) ou hypertrophiques (H) dans un test de *wound healing*. (A) Photos représentatives de la taille de la lésion dans le tapis de cellules endothéliales avant incubation (h0) et après 24h d'incubation (h24) en présence des différents milieux. Le contrôle est constitué de milieu non-conditionné contenant 10% de FBS. (B) Quantification de la taille de la lésion par la moyenne de 20 mesures de l'espace entre les bords la lésion réalisées sur toute sa hauteur. La signification statistique a été obtenue par un test ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. Chaque point correspond à la moyenne du résultat de l'analyse réalisée avec des milieux conditionnés issus de trois cultures différentes.

2. EFFET SUR LA MIGRATION ET L'INVASION DES HUVEC EN TEMPS RÉEL

L'influence des milieux conditionnés par les chondrocytes non sur la migration et l'invasion des cellules endothéliales a pu être étudiée en temps réel grâce au système *xCELLigence RTCA dual-plate instrument*. Dans ce système, les HUVECS étaient incubées en présence des milieux conditionnés ou du milieu contrôle constitué de milieu DMEM identique à celui dans lequel étaient les chondrocytes (pénicilline-streptomycine, HEPES, glutamine, proline, vitamine c) mais contenant 10% de FBS et non-conditionné par des cellules. Pour chaque condition, six mesures de la migration (*Cell Index*) ou de l'invasion (*Cell Invasion Index*) des HUVEC étaient enregistrée sur une période de 25h (Figure R8). Nous avons observé les effets suivants :

- La migration (*Cell Index*) des HUVECS était stimulée par les milieux conditionnés par les CH. L'effet était significatif par rapport au contrôle ($p < 0,001$) alors que les milieux conditionnés par les CNH n'avaient pas d'effet significatif sur la migration.
- L'invasion exprimé par le *Cell Invasion Index* était également stimulée par les milieux conditionnés les CH après 5h ($p = 0,0087$), 10h ($p < 0,0001$) et 15h ($p < 0,0001$) par rapport à la condition contrôle.
- L'effet des milieux conditionnés par les CH sur l'invasion était significativement plus important qu'en présence des milieux conditionnés par les CNH après 10h d'incubation ($p < 0,0001$).

- Les milieux conditionnés par les CNH avaient en effet significatif sur l'invasion après 15h d'incubation ($p=0,0041$) par rapport à la condition contrôle.

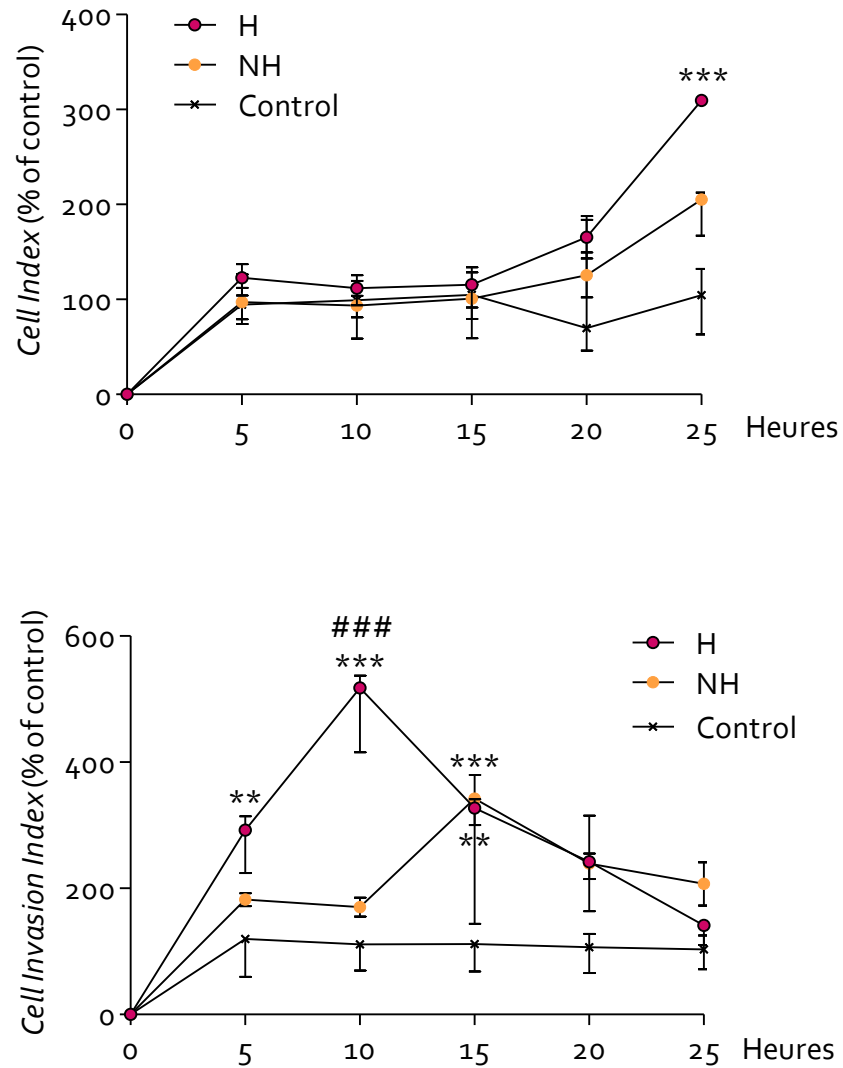


Figure R8 : Evaluation de (A) la migration et (B) l'invasion des cellules endothéliales en temps réel en présence de milieux conditionnés par des chondrocytes arthrosiques non-hypertrophiques (NH) ou hypertrophiques (H) dans le système *xCELLigence* RTCA-DP. Le contrôle est constitué de milieu non-conditionné contenant 10% de FBS. Les données sont présentées en pourcentage par rapport à la condition contrôle. La signification statistique a été obtenue par un test ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. Chaque point correspond à la moyenne de 3 mesures réalisées sur les milieux conditionnés issus de 3 cultures différentes.

3. EFFET SUR L'ADHÉSION DES HUVEC

Afin de compléter notre étude de l'influence de l'hypertrophie sur l'angiogenèse, un test d'adhésion des cellules endothéliales a été réalisé. L'adhésion des HUVECS a été évaluée sur différents substrats constitués à partir des milieux conditionnés par les CNH ou les CH ou à partir de conditions contrôle (Figure R9).

- Le substrat constitué de milieu conditionné par les CH entraînait une augmentation significative de l'adhésion des HUVECS par rapport au contrôle négatif ($p=0,0005$) et par rapport à l'adhésion observée sur le substrat constitué à partir du milieu conditionné par les CNH ($p=0,0463$).
- L'adhésion des HUVECS au substrat constitué de milieu conditionné par les CNH était plus élevée que dans la condition contrôle (BSA à $10 \mu\text{g/ml}$) ($p=0,023$).
- L'effet du milieu conditionné par les CH sur l'adhésion des HUVECS était similaire à l'effet observé avec le contrôle positif (BSP recombinante à $10 \mu\text{g/ml}$).

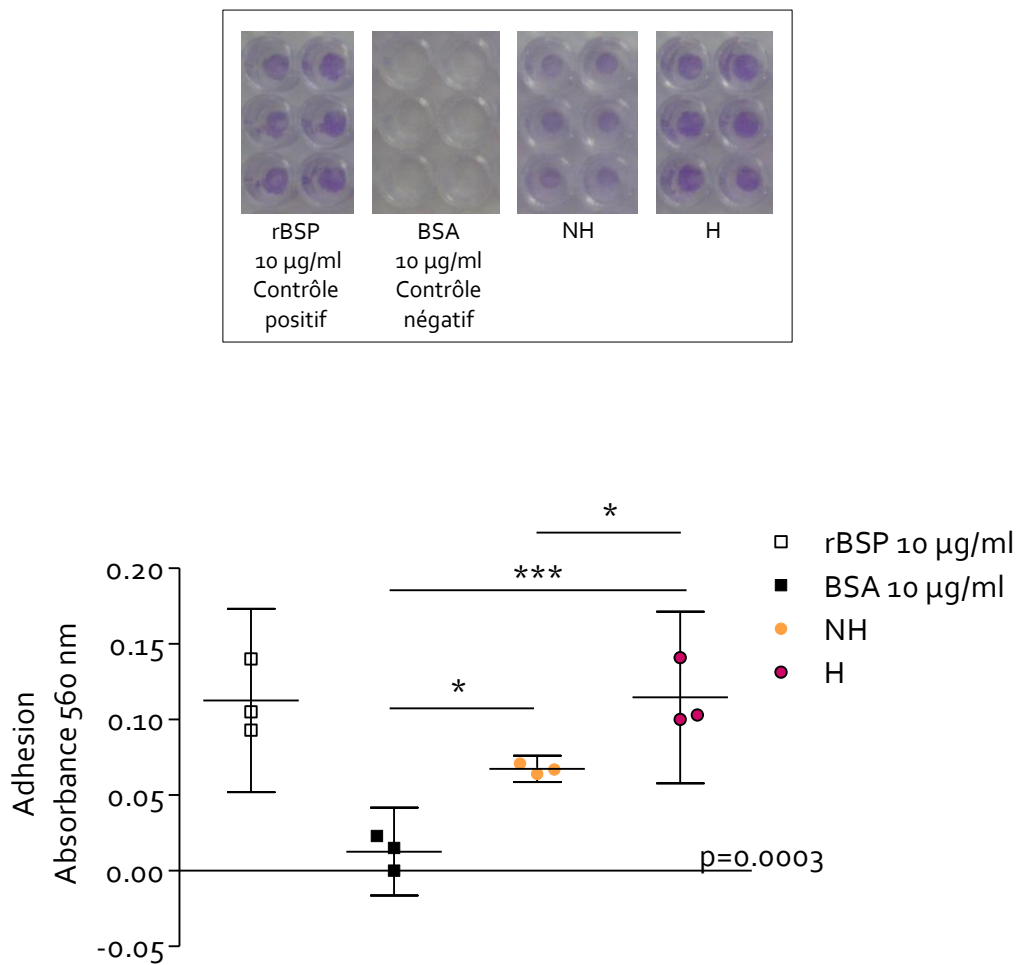


Figure R9 : Évaluation de l'adhésion des cellules endothéliales sur des substrats réalisés à partir de milieux conditionnés par les chondrocytes non-hypertrophiques (NH) ou hypertrophiques (H) ou à partir de conditions contrôle (rBSP ou BSA à 10 µg/ml). La signification statistique a été obtenue par un test ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. Chaque point correspond à la moyenne de 6 mesures réalisées sur les milieux conditionnés issus de 3 cultures différentes.

PARTIE 2 : DISCUSSION

La migration, l'invasion et l'adhésion des cellules endothéliales sont des processus participants au processus complexe d'angiogenèse. Pour notre étude, nous avons eu recours à des HUVEC, qui est le type de cellule endothéliale le plus communément utilisé pour étudier l'angiogenèse [209, 210]. Les milieux conditionnés par les CH stimulaient la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules endothéliales. L'effet des milieux conditionnés par les CNH sur l'invasion et l'adhésion peut s'expliquer par le fait que les chondrocytes étaient isolés à partir de cartilage arthrosique, et donc présentait un phénotype pathologique. Il a été démontré que, bien que non-hypertrophiques, les chondrocytes issus de cartilage arthrosiques produisent des quantités non négligeables de facteurs pro-angiogéniques comme l'IL-8. Nos résultats permettent seulement d'affirmer que l'expression du phénotype hypertrophique est associée à une production accrue de facteurs favorisant l'angiogenèse. Il serait utile d'étudier la production des facteurs pro-angiogéniques par des chondrocytes sains afin de déterminer si l'activité pro-angiogénique est liée au processus pathologique. Malheureusement, l'accès à des chondrocytes sains est restreint pour des raisons éthiques. Il s'agit d'une limitation importante de notre étude que nous pourrions contourner en utilisant des lignées cellulaires disponibles dans le commerce.

Ces observations permettent d'attester l'existence d'un effet de la différenciation hypertrophique des chondrocytes sur trois étapes clé du processus d'angiogenèse. Ceci permet d'expliquer l'observation de structures vasculaires dans le cartilage arthrosiques, alors que celles-ci sont absentes du cartilage sain. L'angiogenèse est un processus étroitement lié à l'arthrose et peut contribuer à sa pathogenèse [211]. En effet, l'angiogenèse est impliquée dans le développement d'ostéophytes, le remodelage de l'os sous-chondral et la minéralisation de la matrice extracellulaire. De plus, il est connu que les

vaisseaux qui envahissent le cartilage sont accompagnés de fibres nerveuses sensorielles et sympathiques. La néo-vascularisation du cartilage pourrait donc être un déterminant de la douleur mécanique des patient arthrosique [6, 99]. Puisque le cartilage articulaire est originellement un tissu avasculaire, son invasion par des structures vasculaires est considérée comme un processus pathologique [57, 212].

L'ensemble des résultats obtenus dans cette deuxième partie de l'étude nous permettent d'émettre l'hypothèse que les CH en culture secrètent des facteurs capables de stimuler la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules endothéliales. Ils pourraient être les acteurs clés du phénomène de néo-vascularisation du cartilage observé chez les patient arthrosiques et de cette façon influencer l'angiogenèse, phénomène se traduisant par la néo-vascularisation du cartilage arthrosique.

PARTIE 3 : IDENTIFICATION D'UN FACTEUR ANGIOGÉNIQUE ASSOCIÉ À

L'HYPERTROPHIE DES CHONDROCYTES ARTHROSIIQUES

Nos résultats précédents suggéraient que les chondrocytes arthrosiques hypertrophiques favorisaient *in vitro* l'angiogenèse. Afin d'identifier les facteurs impliqués dans ces processus, nous avons étudié l'expression de gènes liés à l'angiogenèse par les CNH et les CH.

1. CRIBLAGE DES FACTEURS ANGIOGÉNIQUES

Le taux d'ARN codant pour certains gènes liés à l'angiogenèse a été mesuré après 3 et 21 jours de culture des chondrocytes arthrosiques en billes d'alginate dans du milieu contenant 10% de FBS. Pour chaque gène, le rapport d'expression entre le jour 21 et le jour 3 a été calculé. Ensuite, nous avons classé les facteurs angiogéniques en fonction de la valeur de ce rapport. Cette analyse a permis d'identifier la BSP comme étant le facteur le plus exprimé par les CH (Table R1).

Table R1 : Expression des facteurs angiogéniques par les chondrocytes après 3 jours (condition non-hypertrophique) et 21 jours de culture (condition hypertrophique). Chaque donnée est la moyenne de 2 mesures faites dans 3 cultures différentes (n=6). Le taux d'ARN codant avait été normalisé par rapport à HPRT. BSP=*bone sialoprotein*; ChM1=*chondromoduline-1*; TSP2=*thrombospondine-2*; Ang1=*angiopoïétine-1*; MMP-2=*matrix metalloproteinase-2*; NGF=*nerve growth factor*; bFGF=*basic fibroblast growth factor*; OPN=*ostéopontine*; VEGF=*vascular endothelial growth factor*.

FACTEUR ANGIOGÉNIQUE	NOMBRE DE COPIES EN CONDITION NON-HYPERTROPHIQUE	NOMBRE DE COPIES EN CONDITION HYPERTROPHIQUE	RATIO HYPERTROPHIQUE / NON-HYPERTROPHIQUE
BSP	950.93	105694.64	111.15
ChM1	1.09	12.97	11.85
TSP2	15.79	119.82	7.59
Ang1	0.90	5.67	6.32
MMP-2	36.34	198.88	5.47
NGF	0.26	0.79	3.00
bFGF	147.91	50.42	0.34
TSP1	1473.20	469.77	0.32
OPN	2348.16	508.94	0.22
VEGF	186.06	36.70	0.2

2. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE LA BSP

La méthode de western blot a permis de mettre en évidence la production de BSP par les CH ainsi que de détecter sa présence dans les milieux de culture conditionnés par ces chondrocytes. Par contre nous n'avons trouvé aucune trace de BSP produite par les CNH (Figure R10).

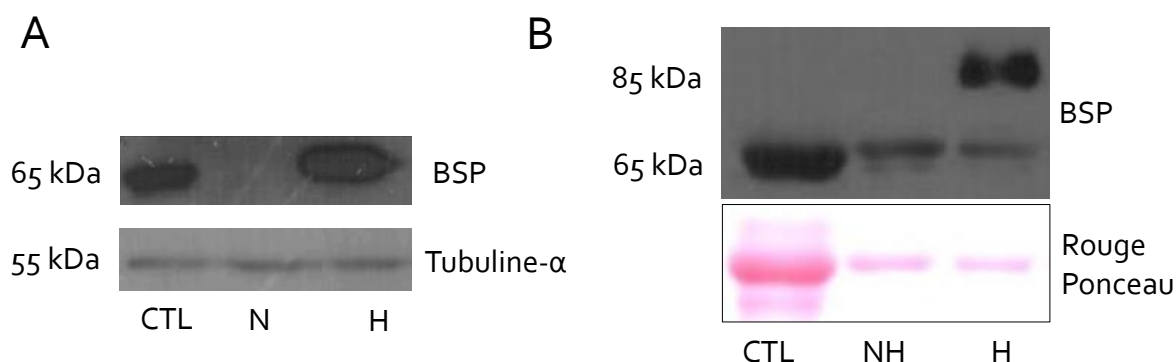


Figure R10 : Détection de BSP dans (A) les extraits cellulaires et (B) les milieux conditionnés par des chondrocytes non-hypertrophiques (NH) ou hypertrophiques (H). Les analyses ont été réalisées par western blot sur 3 cultures différentes. Les résultats d'une expérience représentative sont présentés.

3. CORRÉLATION ENTRE LA BSP ET LES MARQUEURS DE L'HYPERTROPHIE

L'association entre l'expression du gène BSP et les marqueurs de l'hypertrophie (COLX, runx2 et MMP-13) ou l'activité des enzymes de minéralisation (PA et NTPPPH) a été recherchée en calculant le coefficient de corrélation de Spearman (Figure R11).

Cette analyse a mis en évidence une corrélation positive et élevée entre les taux d'expression du gène BSP et :

- NTPPPH : $r=0,77$; $p<0,0001$;
- Runx2 : $r=0,58$; $p<0,0001$;
- La PA : $r=0,56$; $p=0,007$
- Le COLX : $r=0,51$; $p<0.0001$

Et un niveau de corrélation modeste avec :

- MMP-13 : $r=0,39$; $p=0,0031$

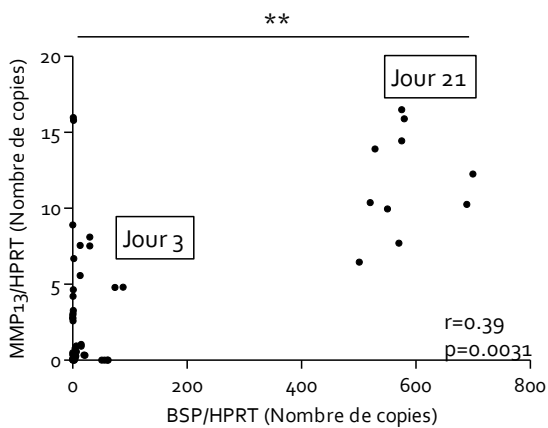
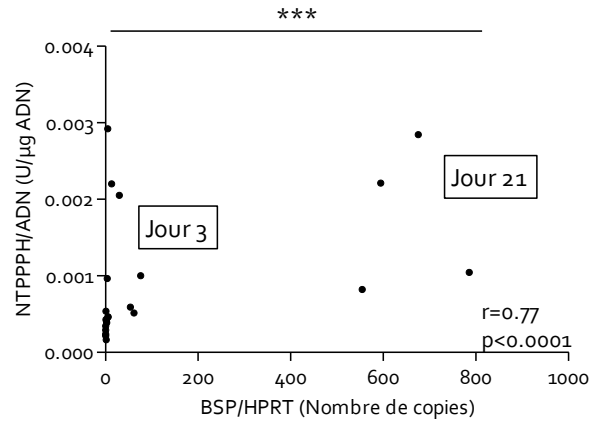
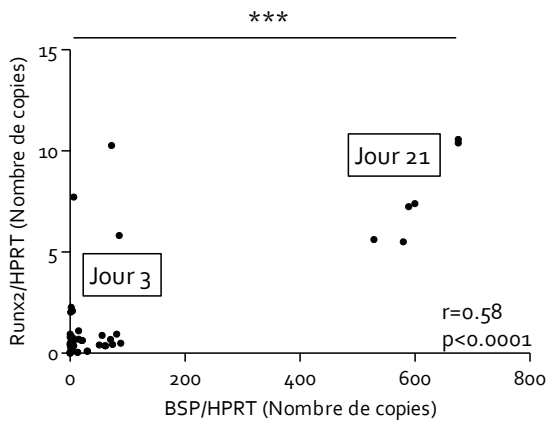
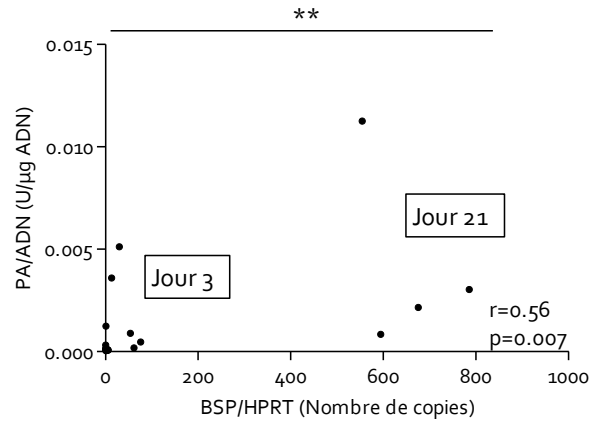
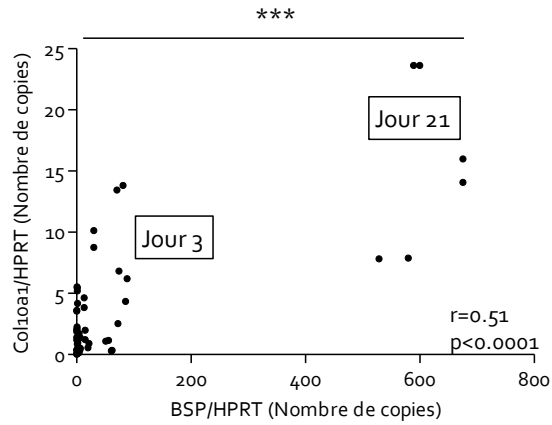


Figure R11 : Analyse de la corrélation entre l'expression de la BSP et l'expression/l'activité enzymatique des marqueurs spécifiques de l'hypertrophie dans des conditions non-hypertrophiques (jour 3) et hypertrophiques (jour 21). La signification statistique a été obtenue par un test de corrélation de Spearman. Les résultats sont issus de l'analyse des valeurs moyennes de 14 cultures de chondrocytes arthrosiques différentes.

4. IMPLICATION D'UNE PROTÉINE A DOMAINE RGD DANS L'ADHÉSION DES HUVEC INDUITE PAR LES MILIEUX CONDITIONNÉS DE CHONDROCYTES HYPERTROPHIQUES

Nous avons identifié la BSP comme étant le facteur pro-angiogénique le plus exprimé par les CH. Cette protéine contient une séquence RGD impliquée dans son activité biologique. Nous avons tenté de déterminer si l'activité pro-angiogénique des CH était liée à la sécrétion de protéine porteuse d'un domaine RGD. Nous avons pour cela utilisé un peptide GRGDS capable de se fixer aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ des HUVEC et ainsi, empêcher l'interaction entre ces intégrines et le domaine RGD des protéines contenues dans les milieux conditionnés de chondrocytes. Par cette approche, nous avons démontré que le blocage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ lors de la pré-incubation des HUVEC avec le GRGDS provoquait une diminution significative de l'adhésion des HUVEC au de milieux conditionnés par les CH (Figure R12).

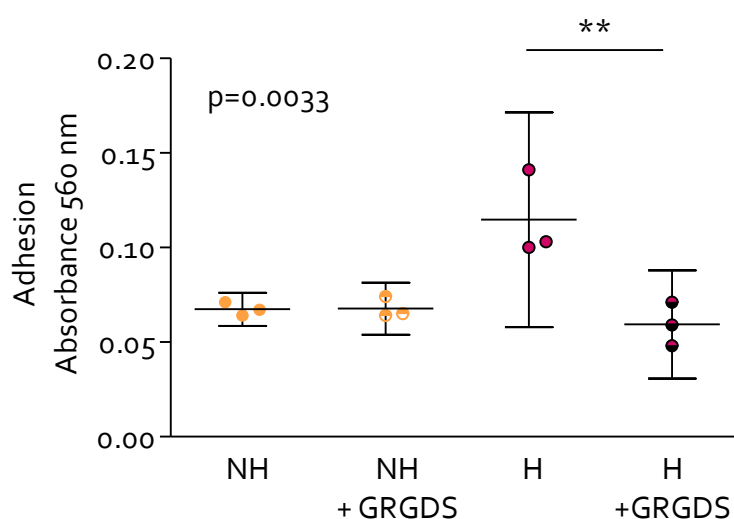


Figure R12 : Evaluation de l'effet du pré-traitement à l'aide du peptide GRGDS sur l'adhésion des HUVEC au substrat de milieux conditionnés par des chondrocytes non-hypertrophiques (NH) ou hypertrophiques (H). La signification statistique a été obtenue par un test ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. Chaque point correspond à la moyenne de 6 mesures réalisées sur les milieux conditionnés issus de 3 cultures différentes.

PARTIE 3 : DISCUSSION

L'objectif de cette troisième partie du travail était de préciser quel(s) facteur(s) produit(s) par les CH arthrosiques étai(en)t impliqué(s) dans la néo-vascularisation du cartilage. Pour cela, nous avons analysé l'expression par les CH de plusieurs facteurs connus pour leur rôle dans l'angiogenèse. Un ensemble de sept activateurs (pro-angiogéniques) et trois inhibiteurs (anti-angiogéniques) a été considéré dans cette analyse. Le VEGF [213], le bFGF [214], le NGF [215], l'OPN [216], la BSP [105], la MMP-2 [217] et l'Ang1. [218-220] sont connus pour leur rôle pro-angiogénique tandis que la TSP-1 et -2 [221] et la ChM-1 [222] avaient été choisies pour leur effet anti-angiogénique.

Dans le cartilage sain, l'état avasculaire est maintenu grâce à la production accrue d'inhibiteurs empêchant la vascularisation du tissu. A l'origine, l'activation de l'angiogenèse est le résultat d'un déséquilibre de la balance entre facteurs pro- et anti-angiogénique suite à un *switch* angiogénique en faveur d'une néo-vascularisation du tissu [223, 224]. Nos résultats montrent que le gène le plus fortement associé à la différenciation hypertrophique des chondrocytes était le gène de la BSP. Sur base de ces résultats, il était tentant de spéculer que la BSP pouvait être impliquée, au moins en partie, dans l'angiogenèse induite par les chondrocytes hypertrophique. Cette intuition a été renforcé après par la démonstration que l'activité angiogénique des chondrocytes était en partie liée à la présence de protéine contenant un domaine RGD cette démonstration a été possible en bloquant les intégrines les plus $\alpha_v\beta_3$ exprimées par les cellules endothéliale avec un peptide GRGDS. La présence de ce peptide bloquait partiellement l'adhésion des HUVEC induite par un milieu de culture conditionné par les CH. Notons, que parmi les facteurs pro-angiogénique surexprimés seules la BSP et l'OPN possèdent un domaine RGD. Cependant,

l'OPN n'était que très peu surexprimée par les chondrocytes hypertrophiques en comparaison à la BSP. Parmi les protéines de la matrice extracellulaire possédant un RGD, BSP semble être une candidate intéressante par son rôle connu dans l'adhésion et la migration des HUVEC.

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la BSP pourrait être un facteur à domaine RGD produit par les chondrocytes agissant positivement sur l'angiogenèse. Afin de démontrer cette hypothèse, la stratégie devrait consister en la génération de milieux conditionnés par des CH qui seraient déprivés de BSP par exemple par l'utilisation d'anticorps neutralisants. Cette expérience permettrait d'observer les effets d'une déprivation en BSP dans les tests fonctionnels d'angiogenèse. Des anticorps appropriés pour cette expérience n'ont malheureusement pas encore pu être identifiés. C'est pourquoi nous avons réalisé l'expérience de blocage avec le GRGDS qui a au moins permis d'identifier le rôle d'une protéine à domaine RGD dans l'adhésion des HUVEC.

Nous avons également identifié la protéine BSP dans les extraits cellulaires et les milieux de culture conditionnés par les CH. Par contre, BSP était totalement absente des extraits cellulaires et milieux conditionnés par des CNH. Par la méthode du western blot nous avons pu déterminer le poids moléculaire de cette protéine. Une protéine de 65 kDa a été détectée dans les extraits cellulaires, ce qui correspondait au poids de la protéine détectée dans le standard interne qui était un extrait de cellules d'ostéosarcome humain (Saos-2). Ces cellule sont connues produire de la BSP [225]. Par contre, dans le western blot réalisé à partir des milieux conditionnés, deux bandes dissociables étaient visibles dans les milieux conditionnés par les CH: une bande correspondait à un poids moléculaire de 65 kDa et l'autre bande à un poids moléculaire de 85 kDa. Seule la bande 65 KDa, qui correspond au

Le poids moléculaire de la BSP, était présente dans les milieux conditionnés par les Saos-2. La forme de 85 kDa détectée dans les milieux conditionnés par des CH pourrait correspondre à des glycosylations de la forme native de la protéine [226]. Cette modification post-traductionnelle semble être caractéristique des CH et pourrait être un marqueur de l'arthrose et plus particulièrement de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Préalablement à l'analyse de la BSP par western blot, il serait opportun de traiter les milieux conditionnés par les chondrocytes par une glycosylase afin de vérifier que l'augmentation du poids moléculaire de la BSP est bien due à des glycosylations de la protéine. Nous pourrions d'autre part isoler cette forme de BSP de 85 kDa et la soumettre à un séquençage protéique. Il serait également intéressant de vérifier si cette forme de BSP de poids moléculaire plus élevé est produite par d'autres types cellulaires, par exemple les ostéoblastes de l'os sous-chondral.

Notre intuition du rôle de BSP dans l'arthrose est renforcée par les travaux de l'équipe du Professeur D. Heinegård (Lund, Suède) qui a identifié une augmentation de la concentration importante de BSP dans le sérum de patients qui présentaient des signes radiologiques d'arthrose précoce [227]. Ces chercheurs ont également trouvé une association inverse entre le taux sérique de BSP et le grade d'ostéophyte et de sclérose observé par radiographie, ce qui semblait d'après eux refléter l'altération du *turnover* de l'os dans l'arthrose de la hanche [228]. De plus, ils ont montré une augmentation marquée de BSP à l'interface os-cartilage de zones détériorées en comparaison à des zones morphologiquement intactes dans le troisième carpe proximal chez le cheval indiquant que la BSP pouvait être un marqueur potentiel des changements du métabolisme osseux dans l'os sous-chondral [229].

Des études ont montré que la BSP était la protéine de matrice des tissus minéralisés le plus impliquée dans la minéralisation, notamment dans l'os et le cartilage [230-233]. La protéine possède en effet des domaines qui lui confèrent la capacité de se lier à l'hydroxyapatite et permet ainsi la nucléation des cristaux [230]. La BSP est également connue pour son activité pro-angiogénique. Son effet médiateur sur la migration et l'adhésion des HUVEC a été mise en évidence et son rôle pro-angiogénique a également été démontré à l'aide d'un modèle de vascularisation de la membrane chorio-allantoïque de poulet [105].

PARTIE 4 : ETUDE DE LA RÉGULATION DE LA BSP ET EFFET SUR LE MÉTABOLISME DES CHONDROCYTES ARTHROSIQUES

Nous avons démontré que la BSP était surexprimée par les CH et qu'elle était positivement corrélée aux marqueurs de l'hypertrophie. Nous savons également que sa concentration sérique est augmentée chez les patients présentant des signes d'arthrose précoce [227].

La suite du travail consistait à étudier la régulation de la synthèse de BSP par le PTHrP, un inhibiteur de la différenciation hypertrophique ainsi que par l'IL-1 β et le TNF α , deux cytokines impliquées dans la pathogénie de l'arthrose. Enfin, nous avons étudié les effets de la BSP sur le métabolisme des chondrocytes et plus particulièrement sur les variables suivantes : l'AGG, le NO, la MMP-3, l'IL-6, l'IL-8, le VEGF, le bFGF et la TSP-1.

1. EFFET DU PTHrP SUR L'EXPRESSION ET LA PRODUCTION DE LA BSP PAR LES CHONDROCYTES ARTHROSIQUES

Notre protocole consistait à ajouter le PTHrP dès le premier jour de culture en bille d'alginate lorsque les chondrocytes n'étaient pas encore hypertrophiques, ou entre le 21^{ème} et le 28^{ème} jour de culture en bille d'alginate lorsque les chondrocytes étaient hypertrophiques. Afin de s'assurer de l'effet du PTHrP sur la différenciation hypertrophique des chondrocyte, nous avons utilisé l'expression du gène codant pour le collagène de type X (col10a1) comme marqueur représentatif du phénotype. Dans ces conditions expérimentales, nous avons observé les faits qui suivent (Figure R13).

- Le PTHrP réprimait fortement l'expression de col10a1 après 21 jours (91,5% ; $p=0,0003$) et 28 jours (94,4% ; $p=0,0016$) d'incubation. Une inhibition significative de col10a1 était également observée lorsque le peptide était ajouté entre le 21^{ème} et le 28^{ème} jour de culture (97,1% ; $p=0,0013$).
- En parallèle, le PTHrP inhibait presque totalement l'expression de la BSP lorsqu'elle était ajoutée au milieu de culture pendant 21 jours (93,9% ; $p=0,0009$) et 28 jours en continu (95,9% ; $p=0,0254$) et aussi lorsqu'il était ajouté uniquement à partir du 21^{ème} jour (92,3% ; $p=0,0243$).
- L'analyse par *western blot* de la production de la BSP par les chondrocytes arthroscopiques révélait que le PTHrP diminuait la production de BSP après 21 jours et 28 jours de culture et quand l'inhibiteur était ajouté à partir du 21^{ème} jour.

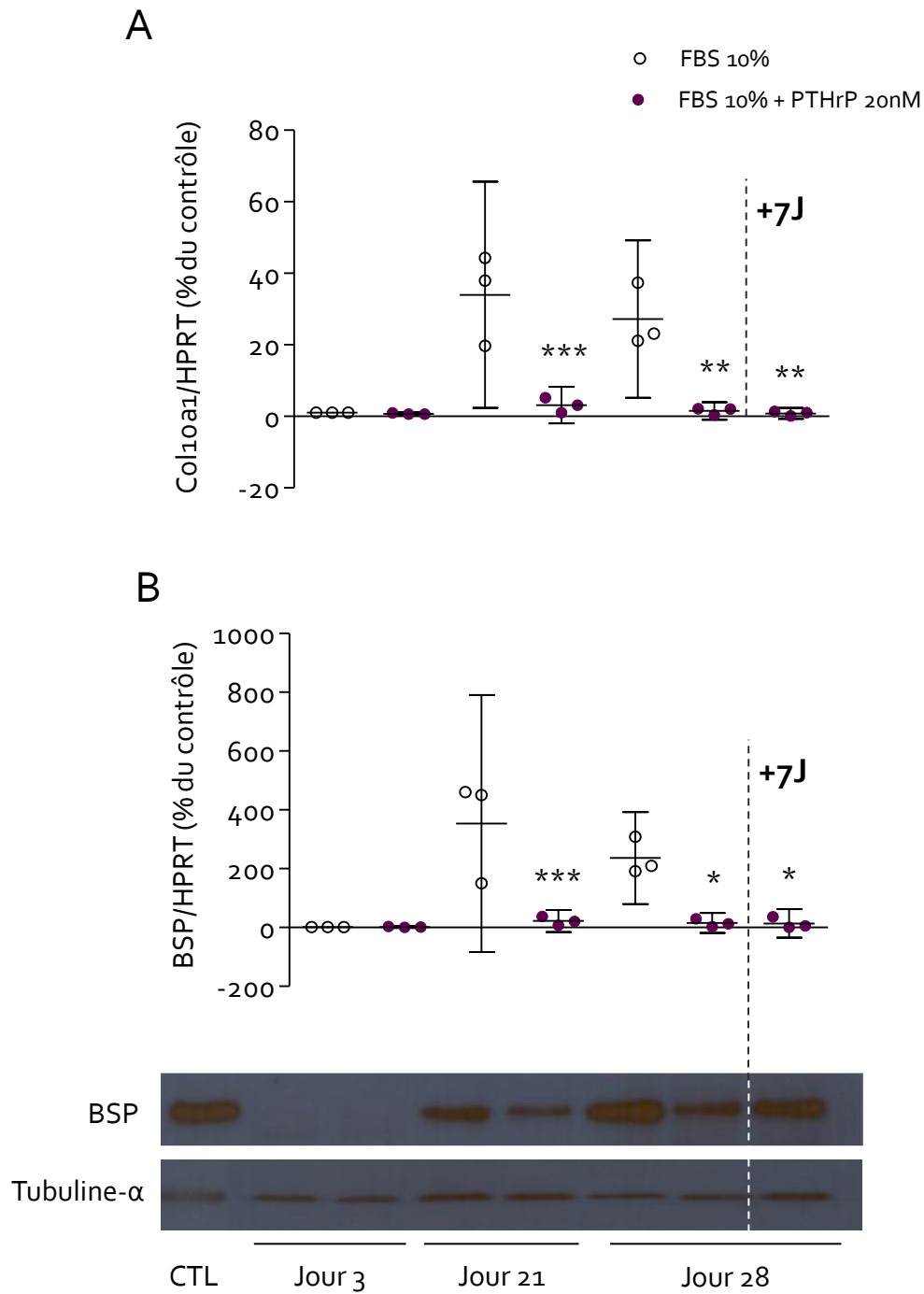


Figure R13 : Evaluation de l'effet de l'addition de PTHrP dans le milieu de culture sur (A) l'expression du collagène de type X (Col10a1) et (B) l'expression et la production de la BSP par les chondrocytes arthrosiques après 3, 21 et 28 jours de culture dans un milieu enrichi en FBS à 10%. +7J : addition du PTHrP à partir du jour 21 jusqu'au jour 28.

2. EFFET DE L'IL-1 β ET DU TNF α SUR L'EXPRESSION ET LA PRODUCTION DE LA BSP PAR LES CHONDROCYTES ARTHROSIQUES

L'IL-1 β et le TNF α ont été ajoutée tout au long de la culture ou uniquement entre 21^{ème} et le 28^{ème} jour, c'est-à-dire sur des chondrocytes devenus hypertrophiques (Figure R14).

- L'expression de la BSP par les chondrocytes arthrosiques était presque totalement et significativement inhibée lorsque l'IL-1 β ou le TNF α étaient ajoutés au milieu de culture pendant 28 jours (IL-1 β : 96,6% ; p=0,0115 ; TNF α : 94,7% ; p=0,0139). Une inhibition de l'expression de la BSP était également observée lorsque l'IL-1 β et le TNF α étaient ajoutés au milieu uniquement à partir du 21^{ème} jour (96,1% ; p=0,012 et 96,7% ; p=0,0114, respectivement).
- La production de la BSP, évaluée par *western blot*, par les chondrocytes arthrosiques en culture était observée uniquement après 21 et 28 jours de culture et était réprimée en présence d'IL-1 β ou de TNF α et quand les cytokines étaient ajoutées à partir du vingt-et-unième jour de culture.

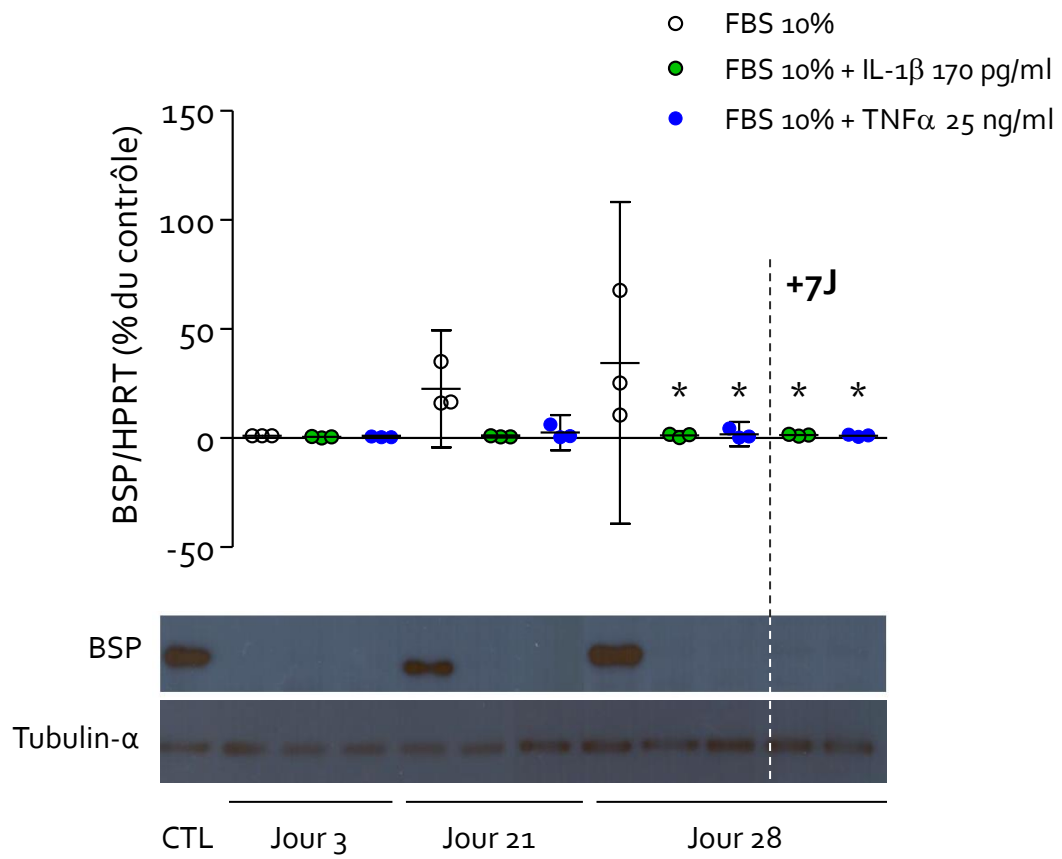


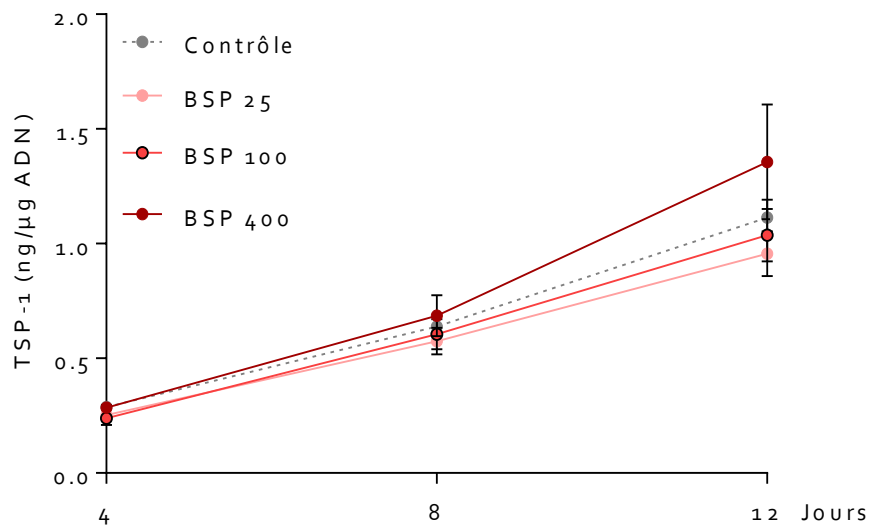
Figure R14 : Evaluation de l'effet de l'addition d'IL-1 β ou de TNF α dans le milieu de culture sur l'expression et la production de BSP par les chondrocytes arthrosiques après 3, 21 et 28 jours de culture dans un milieu enrichi en FBS à 10%. +7J : addition de l'IL-1 β ou du TNF α à partir du jour 21 jusqu'au jour 28.

3. EFFET DE LA BSP SUR LE MÉTABOLISME DES CHONDROCYTES ARTHROSIQUES

Nous avons choisi d'administrer la BSP pendant les 12 premiers jours de culture en bille d'alginate. Dans ces conditions, les chondrocytes n'ont pas commencé leur différenciation hypertrophique. Nous avons étudié les effets de doses croissantes de BSP (25, 100 ou 400ng/ml) en l'absence ou en présence d'IL-1 β sur la production d'une molécule matricielle majeure du cartilage (AGG), de d'une métalloprotéinase (MMP-3), de deux médiateurs de la réponse inflammatoire (NO et IL-6) et de trois facteurs pro-angiogéniques (bFGF, VEGF, IL-8) et un facteur anti-angiogénique (TSP-1).

- En l'absence d'IL-1 β , aucune des concentrations de BSP n'avait d'effet sur les paramètres analysés.
- La production de la TSP-1 par les chondrocytes était fortement augmentée par l'IL-1 β après 8 et 12 jours de culture (jour 8 et jour 12 : $p < 0,0001$). La BSP (25ng/ml) diminuait significativement l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production de TSP-1 et ce après 8 et 12 jours de culture (jour 8 : 24% ; $p = 0,0116$; jour 12 : 18% ; $p = 0,0242$) (Figure R15).
- La BSP recombinante augmentait l'effet stimulant de l'IL-1 β sur la production d'IL-8 par les chondrocytes après 12 jours d'incubation aux doses de 25 (129,4% ; $p = 0,006$), 100 (168,8% ; $p = 0,0004$) et 400ng/ml (155,8% ; $p = 0,001$) (Figure R16).

A



B

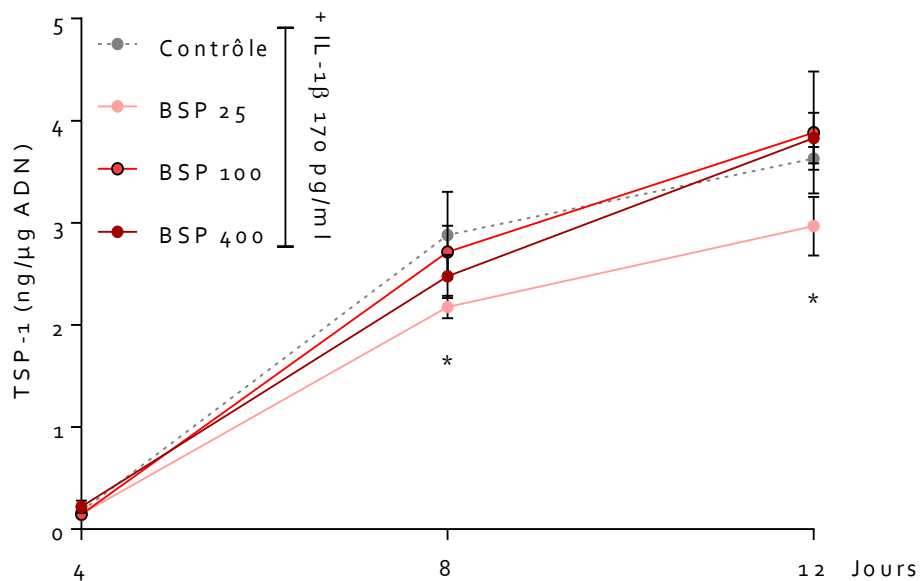
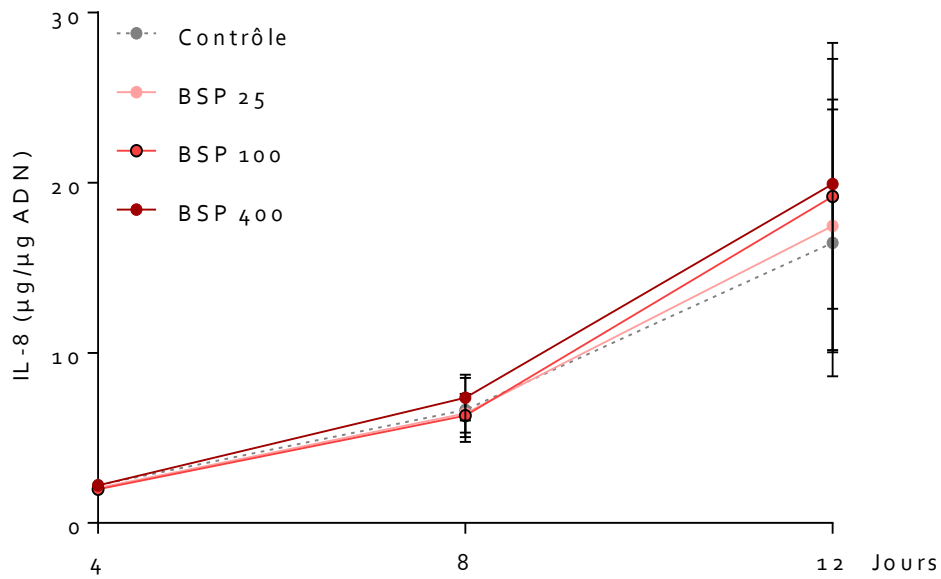


Figure R15 : Evaluation de l'effet d'addition de BSP recombinante à 25,100 ou 400ng/ml au milieu de culture sur la production de la TSP-1 par des chondrocytes arthrosiques en culture pendant 12 jours, stimulés ou non par l'ajout d'IL-1 β à 170 pg/ml. La signification statistique a été obtenue par un test anova suivi d'un post-test de Tukey. Les résultats sont exprimés en concentration normalisée par rapport au contenu en ADN et sont représentés par la moyenne de trois cultures indépendantes dans lesquelles chaque condition a été réalisée en triple (n=9) \pm la déviation standard.

A



B

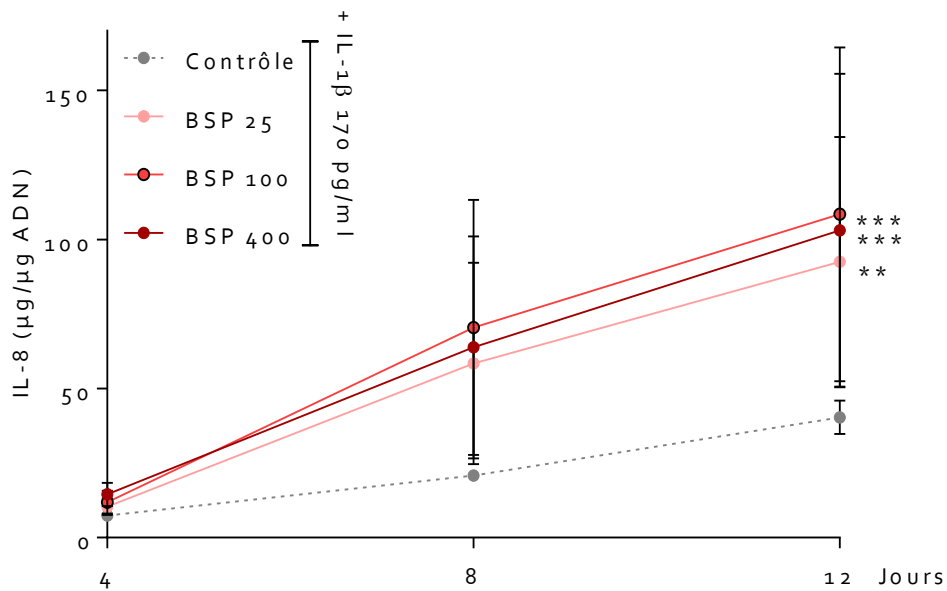


Figure R16 : Evaluation de l'effet de différentes concentrations de BSP recombinante sur la production de l'IL-8 par des chondrocytes arthrosiques en culture pendant 12 jours, stimulés ou non par l'ajout d'IL-1 β . La signification statistique a été obtenue par un test anova suivi d'un post-test de Tukey. Les résultats sont exprimés en concentration normalisée par rapport au contenu en ADN et sont représentés par la moyenne de trois cultures indépendantes dans lesquelles chaque condition a été réalisée en triple (n=9) \pm la déviation standard.

PARTIE 4 : DISCUSSION

Au terme de cette analyse *in vitro* de la régulation et de l'effet de la BSP, nous avons pu démontrer que l'expression et la production de la BSP était bien liée à la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques. Nous avons également identifié l'implication de deux cytokines importantes impliquées dans le catabolisme des chondrocytes arthrosiques dans l'inhibition de l'expression et de la production de la BSP. A ce stade, nous avons également pu préciser un effet de la BSP sur le métabolisme des chondrocytes arthrosiques qui consistait à augmenter la production d'un facteur pro-angiogénique (IL-8) et à diminuer la production d'un facteur anti-angiogénique (TSP-1).

Le PTHrP est décrit comme un inhibiteur de l'hypertrophie des chondrocytes [234-236]. Les présents résultats ont montré que le PTHrP inhibait l'expression et la production de la BSP par les CH arthrosiques confirmant que la BSP était liée à ce phénotype. Afin de contrôler l'effet inhibiteur du PTHrP, l'expression de Col10a1 avait été analysée, ce dernier étant le marqueur de l'hypertrophie le plus largement accepté [76, 197, 237].

Les effets inhibiteurs de l'IL-1 β et du TNF α sur l'expression et la production de la BSP étaient assez surprenants. Ces résultats suggéraient que ces deux cytokines pro-inflammatoires pouvaient réprimer la différenciation hypertrophique des chondrocytes, ce qui néanmoins était assez cohérent avec les données prouvant que ces cytokines pouvait aussi globalement inhiber la chondrogenèse [238, 239].

Différentes concentrations de BSP recombinante avaient été ajoutées au milieu de culture des chondrocytes arthrosiques pour étudier l'effet de la BSP sur la production de l'aggrécan, de la MMP-3, du NO, de l'IL-6 et des facteurs angiogéniques TSP-1, VEGF, bFGF et IL-8. Les doses de BSP furent choisies selon les données trouvées dans la littérature qui

correspondaient aux concentrations trouvées dans les conditions pathologiques [227, 228, 240]. La BSP diminuait la production d'un facteur anti-angiogénique, la TSP-1 [241] et augmentait la production d'IL-8, un facteur pro-angiogénique [242-244]. Cet effet pourrait créer un déséquilibre de la balance normalement en faveur des facteurs inhibiteurs de l'angiogenèse dans le cartilage sain et activer de cette façon le processus de néo-vascularisation. Ces données sont en accord avec celles publiées par le Dr A. Bellahcène et ses collaborateurs démontrant que la BSP promouvait l'angiogenèse [105]. Nos résultats suggèrent également que l'IL-8 est un médiateur-clé dans l'angiogenèse induite par la BSP puisque celle-ci n'avait pas d'effet sur deux autres facteurs pro-angiogéniques bien connus, le VEGF et le bFGF.

***PARTIE 5: ETUDE DE L'ASSOCIATION ENTRE LA PRÉSENCE DE LA BSP ET LA SÉVÉRITÉ
DES LÉSIONS DU CARTILAGE ARTICULAIRE ARTHROSIQUE***

Afin de lier la BSP à la sévérité de l'arthrose, une étude histologique et immunohistochimique a été réalisée sur 23 échantillons de cartilage arthrosique prélevés au moment de la pose d'une prothèse totale de genou (groupe OA) et de 9 échantillons de cartilage sains collectés post-mortem (groupe non-OA). Les échantillons ont été prélevés au niveau du plateau tibial médial. Les données d'âge et de genre des individus repris dans cette étude sont présentées dans la table R2.

	Groupe non-OA	Groupe OA
AGE (Moyenne±écart-type)	50,67±6,27	68,92±1,92
Genre (Masculin/Féminin)	66,7%/33,3%	50%/45,8%

Table R2 : Moyenne d'âge et proportion de genre des échantillons inclus dans l'étude histologique. Le genre d'un des échantillon était inconnu.

1. ANALYSE DE LA DÉGRADATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Le niveau de dégradation du cartilage sur les coupes issues des 33 biopsies reprises dans cette étude a été évalué sur base de 2 scores différents. Le premier était basé sur l'observation macroscopique de l'articulation de chaque individu juste après son prélèvement. Il s'agit du *photographic chondropathy score* (PCS), un système mis au point et publié en 2009 par l'équipe du Dr D. Walsh [10]. En second lieu, le niveau de dégradation du cartilage avait été évalué selon le score de Mankin. Il s'agit d'un système basé sur l'observation de coupes histologiques réalisées à partir de biopsies prises dans l'articulation. Pour pouvoir attribuer un score à chaque échantillon, les coupes étaient colorées avec la safranine-O et le vert lumière afin de pouvoir évaluer le niveau de dégradation du cartilage à travers plusieurs critères : (1) l'intégrité de la surface articulaire, (2) la perte du contenu en protéoglycanes, (3) l'apparence des chondrocytes et (4) l'intégrité de la *tidemark* (Figure R17). L'analyse statistique a révélé les résultats suivants :

- Le PCS moyen des échantillons arthrosiques ($67,4 \pm 3,22$) était significativement plus élevé que celui des échantillons non-arthrosiques ($17,83 \pm 5,93$) ($p < 0,0001$).
- Le score de Mankin était significativement plus élevé dans les échantillons arthrosiques ($6,75 \pm 0,36$) que dans les non-arthrosiques ($2,33 \pm 0,71$) ($p < 0,0001$).

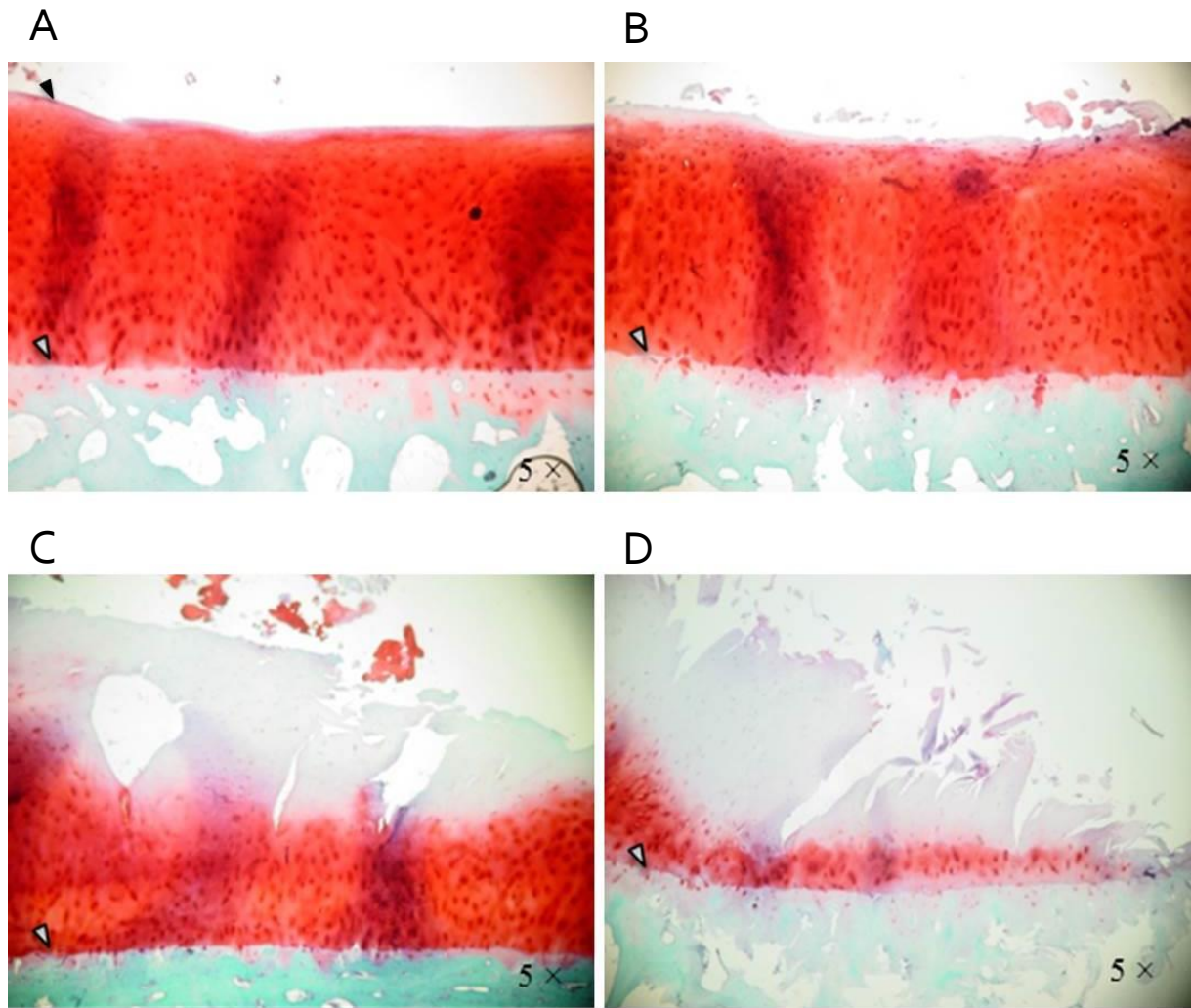


Figure R17 : Photos représentatives de différents niveaux du score de Mankin. (A) score 0 : surface articulaire intacte, pas de perte de protéoglycans, apparence des chondrocytes normale, tidemark intacte (B) score 5 : irrégularités de la surface, présence de clones de chondrocytes, tidemark rompue (C) score 8 : fissures dans la zone moyenne, présence de clones de chondrocytes, réduction modérée du contenu en protéoglycans, tidemark rompue (D) score 10 : fissures dans la zone profonde, réduction sévère du contenu en protéoglycans, présence de clones de chondrocytes, tidemark rompue. Les flèches noires indiquent la surface du cartilage articulaire. Les flèches blanches indiquent la *tidemark*.

2. DÉTECTION DE LA BSP DANS LE CARTILAGE ARTICULAIRE

L'analyse immunohistochimique a permis de localiser la BSP dans les chondrocytes et la matrice extracellulaire (Figure R18). La BSP était présente uniquement dans la couche supérieure du cartilage articulaire arthrosique, quel que soit le niveau de destruction du tissu. Par contre, dans cartilage sain, la BSP était le plus souvent indétectable.

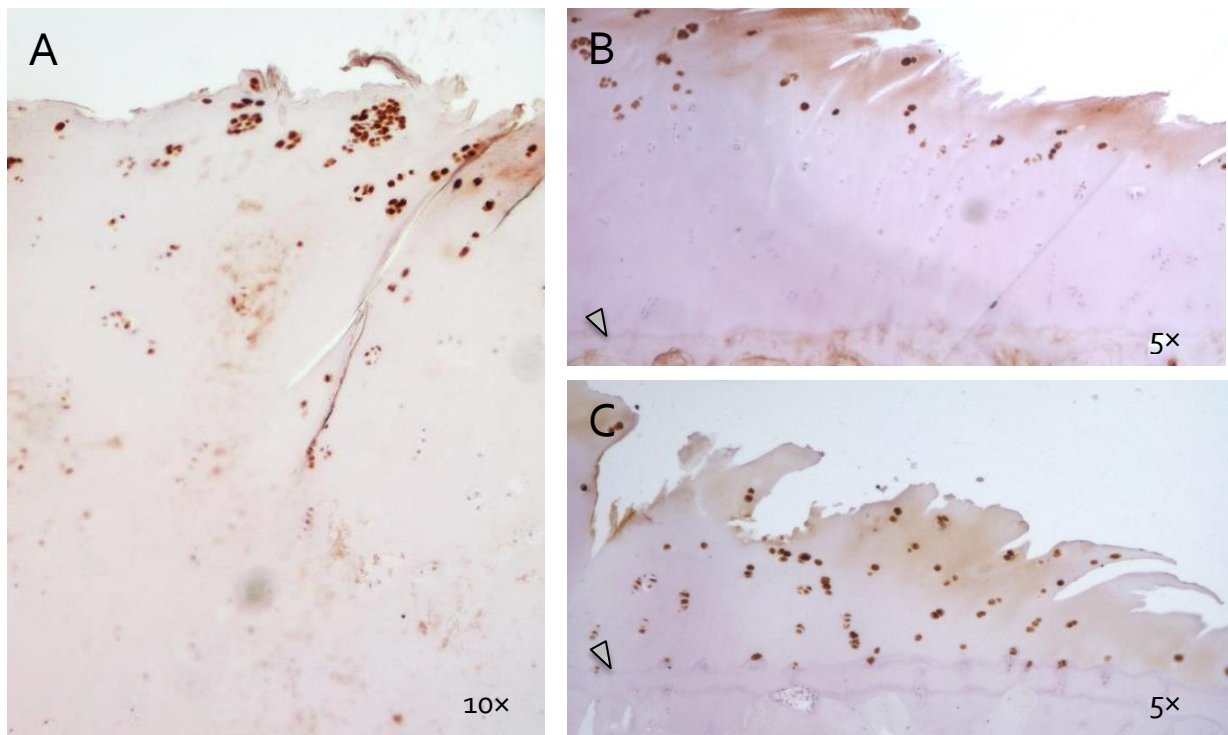


Figure R18 : Détection de chondrocytes produisant la BSP au sein de coupes de cartilage humain arthrosique. (A) La BSP est détectée au niveau de clones de chondrocytes uniquement dans la couche supérieure d'un cartilage articulaire arthrosique présentant des lésions modérées. (B) Détection de chondrocytes produisant la BSP uniquement dans la couche supérieure d'un cartilage articulaire arthrosique présentant des lésions sévères. (C) Détection de BSP dans tous les chondrocytes d'un cartilage articulaire arthrosique présentant des lésions sévères. Les flèches indiquent la *tidemark*.

3. ÉVALUATION DE L'ASSOCIATION ENTRE LA PRÉSENCE DE LA BSP ET LA SÉVÉRITÉ DES LÉSIONS DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Nous avons recherché une différence entre les échantillons dans lesquels la BSP était absente et ceux dans lesquels sa présence était détectée dans le cartilage articulaire du point de vue du PCS (Figure R19), du score de Mankin (Figure R20) et de chacun des composants du score de Mankin, à savoir l'intégrité de la surface articulaire, l'apparence des chondrocytes, la perte de protéoglycanes et l'intégrité de la *tidemark* (Figure R21).

- Le PCS était significativement plus élevé dans les coupes histologiques où la présence de BSP avait été détectée dans le cartilage articulaire que dans celles où la BSP était absente ($p < 0.0001$).
- Le score de Mankin était significativement plus élevé dans les coupes histologiques où la présence de BSP avait été détectée dans le cartilage articulaire que dans celles où la BSP était absente ($p < 0.0001$).
- L'intégrité de la surface articulaire, l'apparence des chondrocytes, la perte de protéoglycanes et l'intégrité de la *tidemark* étaient significativement plus élevés dans les coupes histologiques où la présence de BSP avait été détectée dans le cartilage articulaire que dans celles où la BSP était absente ($p = 0,0002$; $p < 0,0001$; $p = 0,0081$; $p = 0,0158$).

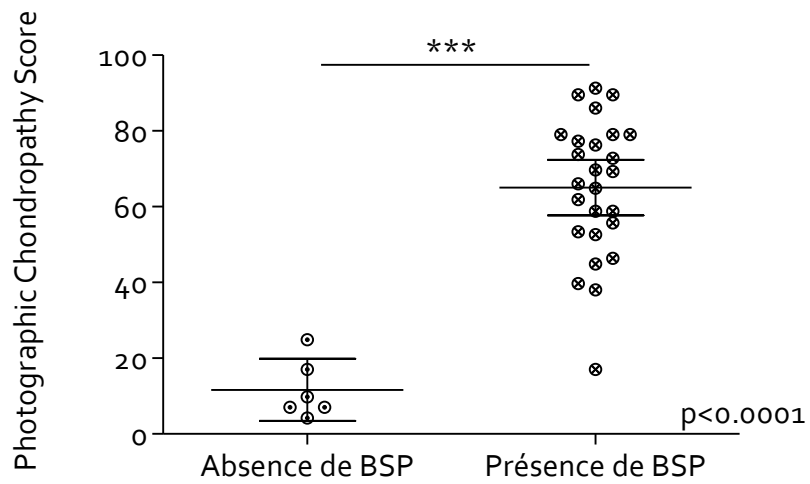


Figure R19 : Comparaison du *Photographic Chondropathy Score* des échantillons dans lesquels la BSP était absente du cartilage articulaire et de ceux dans lesquels la BSP était présente. L'analyse a été réalisée sur un ensemble de 33 articulations arthrosiques (OA) et non-arthrosiques (non-OA) et la signification statistique a été obtenue par un test de Student.

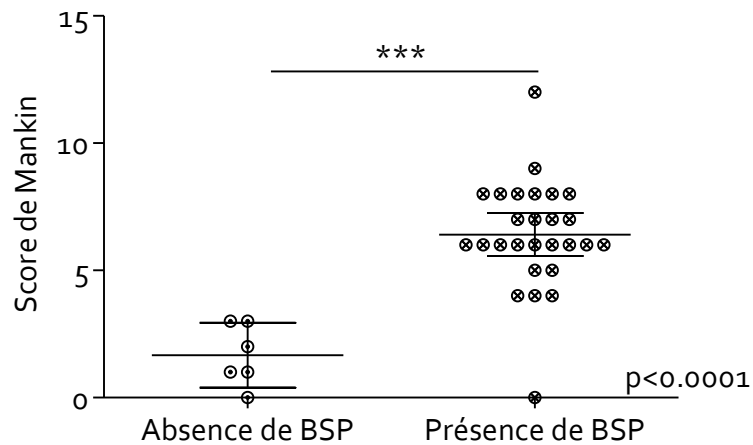
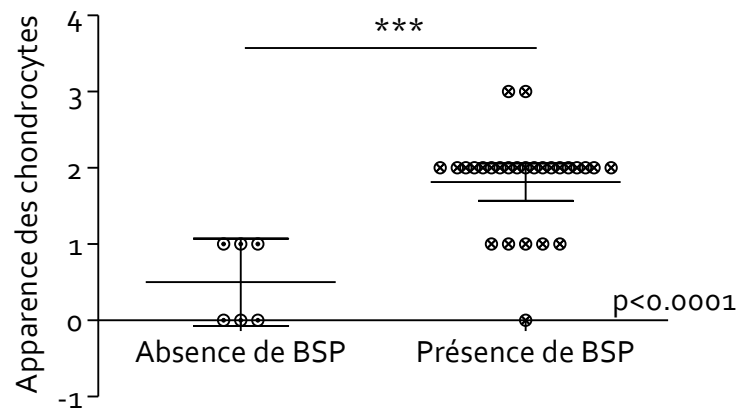
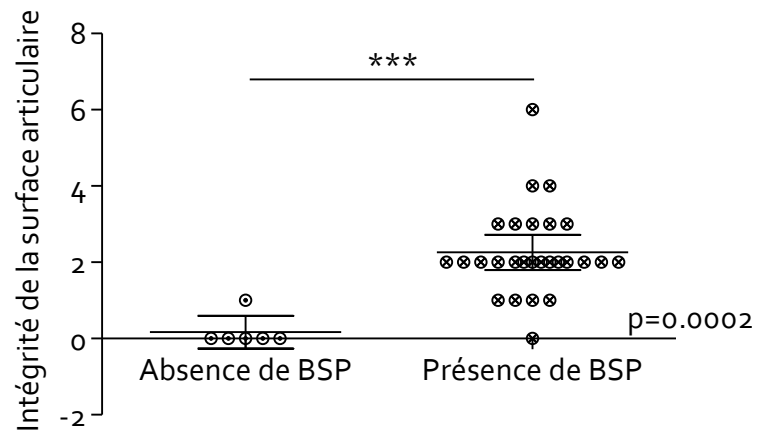


Figure R20 : Comparaison du score de Mankin des échantillons dans lesquels la BSP était absente du cartilage articulaire et de ceux dans lesquels la BSP était présente. L'analyse a été réalisée sur un ensemble de 33 articulations arthrosiques (OA) et non-arthrosiques (non-OA) et la signification statistique a été obtenue par un test de Student.



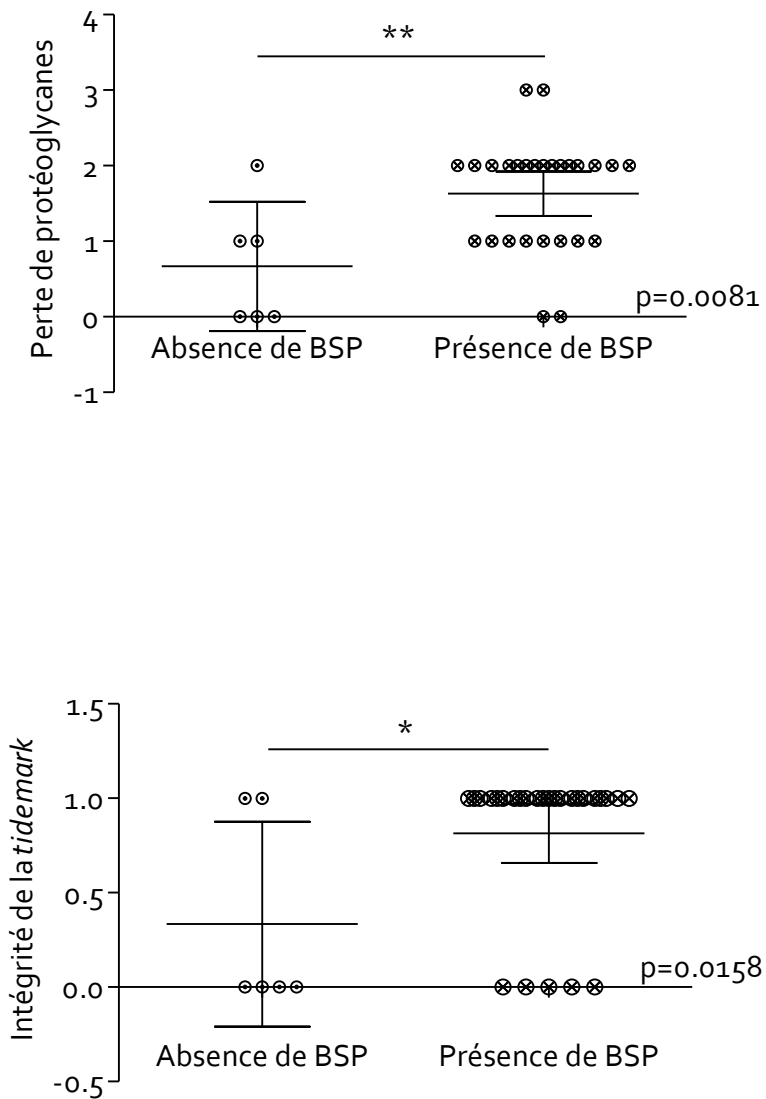


Figure R21 : Comparaison des scores des critères composant le score de Mankin des échantillons dans lesquels la BSP était absente du cartilage articulaire et de ceux dans lesquels la BSP était présente. L'analyse a été réalisée sur un ensemble de 33 articulations arthrosiques (OA) et non-arthrosiques (non-OA) et la signification statistique a été obtenue par un test de Student.

PARTIE 5 : DISCUSSION

La partie *ex vivo* de cette étude était essentielle pour placer nos découvertes directement dans le contexte du cartilage articulaire humain arthrosique. Les 33 articulations considérées dans cette étude ont été choisies dans la banque disponible au sein du service universitaire de rhumatologie du Dr D. Walsh. Les échantillons disponibles pour constituer le groupe arthrosique (OA) étaient nombreux et les critères de sélection peu restrictifs. Les individus sélectionnés devaient avoir un diagnostic d'arthrose du genou selon les critères cliniques et radiologiques de l'ACR. Ils ont été sélectionnés afin d'obtenir une proportion équivalente d'hommes et de femmes. Le choix des échantillons non-arthrosiques (non-OA) était délicat car le nombre de candidats était restreint. En effet, il s'agissait de sélectionner des individus relativement jeunes afin d'éviter l'influence d'un âge élevé sur l'état de l'articulation, même si l'individu n'avait pas été diagnostiqué comme patient arthrosique de son vivant. Ces critères de sélection ont été respectés en accord avec les limites de la banque de prélèvements. Les biopsies servant pour l'étude microscopique étaient prises au niveau du plateau tibial médial car il s'agit de la zone de l'articulation la plus souvent atteinte chez les patients gonarthrosiques.

Les résultats de l'analyse d'une association entre la présence de la BSP et la dégradation du cartilage articulaire, quel que soit le score de dégradation pris en compte, étaient hautement significatifs. Dans les échantillons non-arthrosiques, la BSP était non-détectable ou était présente uniquement au niveau des chondrocytes les plus superficiels. L'analyse statistique a également révélé une association significative entre la présence de la BSP et les critères composants le score de Mankin suggérant que la BSP pourrait être un marqueur de la dégradation du cartilage dans l'arthrose.

PARTIE 6 : ETUDE DE L'ASSOCIATION ENTRE LA PRÉSENCE DE LA BSP ET LA NÉO-VASCULARISATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Dans cette dernière partie du travail, nous avons tenté de démontrer l'association entre la BSP et la présence de vaisseaux dans le cartilage. L'utilisation d'un anticorps anti-CD34, nous permet de révéler la présence de cellules endothéliales au sein de canaux traversant la *tidemark* (Figure R22). Nous avons donc mis en relation le marquage de BSP et celui de CD34 pour établir une association entre BSP et la néo-vascularisation du cartilage. Le nombre de structure vasculaire traversant la *tidemark* a été rapporté à sa longueur afin d'obtenir une valeur en nombre de structures vasculaires par millimètre de *tidemark*.



Figure R22 : Identification d'un vaisseau sanguin traversant la tidemark et aboutissant dans le cartilage articulaire. L'endothélium vasculaire a été détecté suite à la liaison de l'anticorps anti-CD34. La flèche indique la tidemark.

1. ANALYSE DE LA DENSITÉ VASCULAIRE AU NIVEAU DE LA TIDEMARK

- La densité vasculaire du cartilage arthrosique était en moyenne de $0,32 \pm 0,04$ structures vasculaires par millimètre de *tidemark*. Cette valeur était significativement plus élevée que dans le cartilage non-arthrosiques ($0,11 \pm 0,04$) ($p = 0,0029$).

2. ASSOCIATION ENTRE LA PRÉSENCE DE LA BSP ET LA DENSITÉ VASCULAIRE

Nous avons comparé la densité vasculaire au niveau de la *tidemark* des échantillons où la BSP était absente avec celle des échantillons où la présence de la BSP avait été détectée (Figure R23).

- La densité vasculaire au niveau de la *tidemark* était significativement plus élevée dans les coupes histologiques où la présence de BSP avait été détectée dans le cartilage articulaire ($p=0.0045$).

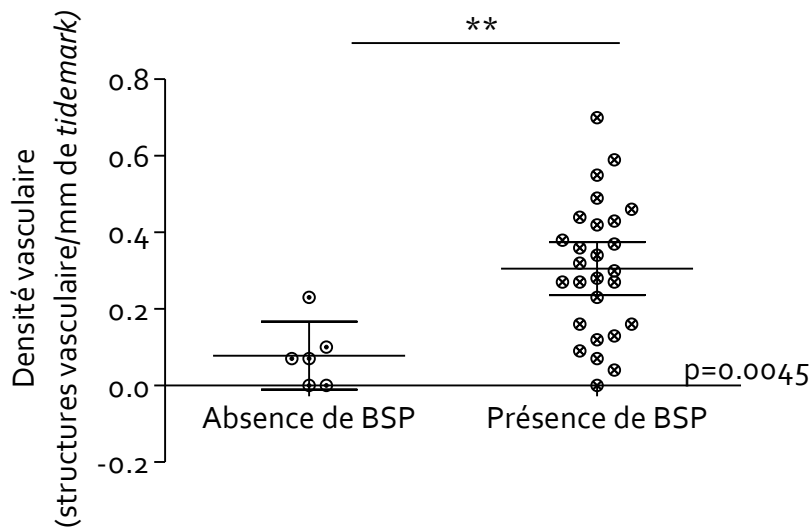


Figure R23 : Comparaison de la densité vasculaire au niveau de la *tidemark* entre les échantillons dans lesquels la BSP n'était pas détectée et ceux où la BSP était présente au sein du cartilage articulaire. La signification statistique a été obtenue par un test de Student.

PARTIE 6 : DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons montré que l'hypertrophie des chondrocytes favorisait l'angiogenèse, que la BSP était fortement exprimée par les CH et que son niveau d'expression dans le cartilage était lié à la sévérité des lésions du cartilage arthrosique. Dans ce chapitre, nous avons établi une relation directe entre la présence de BSP et la vascularisation du cartilage. Le cartilage étant à l'origine un tissu avasculaire, l'apparition de structures vasculaires est considérée comme un phénomène pathologique [46, 245]. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre le CD34, une glycoprotéine de surface présente au niveau de l'endothélium vasculaire, nous a permis d'identifier des vaisseaux dans le cartilage arthrosique, comme précédemment réalisé [57, 99]. Dans notre analyse, la densité vasculaire au niveau de la jonction ostéochondrale était associée au PCS ($r=0,54$; $p=0,0015$) et au score de Mankin ($r=0,67$; $p<0,0001$) (données non montrées), confirmant l'association entre la présence de structures vasculaires et l'arthrose. De plus, nous avons montré que la densité vasculaire était associée au score BSP avec une densité vasculaire plus élevée dans les échantillons où la BSP était localisée dans les couches moyenne et profonde du cartilage articulaire. Plusieurs tests statistiques ont permis de démontrer cette association. Les résultats obtenus dans cette dernière partie suggèrent que, comme précédemment décrit [105] la BSP pourrait être associée à une activation du processus d'angiogenèse.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

L'arthrose est une maladie plurifactorielle affectant l'ensemble des tissus articulaire et péri-articulaires. Elle se caractérise par une association de signes et de symptômes dont les plus évocateurs sont la douleur mécanique, la raideur articulaire ou encore des craquements à la mobilisation. Les thérapies recommandées agissent essentiellement sur la douleur et la fonction articulaire. Malgré leur efficacité sur la douleur, aucun de ces traitements n'agit de façon efficace sur les changements structurels observé avec l'imagerie médicale. La recherche scientifique sur l'arthrose est principalement axée sur la dégradation du Elle tente d'identifier les facteurs impliqués dans la destruction du tissu et de développer des molécules ciblées contre ces facteurs. Cependant, les biothérapies visant à bloquer de façon spécifique l'activité de certaines cytokines ou métalloprotéinases se sont avérées inefficaces et mal tolérées Il est donc important d'étudier d'autres aspects de la pathologie. Notre attention a été attirée par la différenciation hypertrophique après avoir observé que les chondrocytes cultivés en billes d'alginate se différenciaient en CH. Ce phénomène est particulièrement intéressant car il est associé à la minéralisation de la matrice. Il a également été démontré que des structures vasculaires traversaient la *tidemark*. Ce phénomène est capital car il est suggère l'innervation du cartilage et donc sa contribution dans la genèse de la douleur mécanique.

Dans le cadre de notre travail, nous avons tenté d'améliorer les connaissances sur ce sujet en émettant l'hypothèse que les CH pouvaient promouvoir la néo-vascularisation du cartilage. Cette hypothèse reposait sur une observation préliminaire que les chondrocytes arthrosiques nécessitaient un apport de sérum pour déclencher la différenciation hypertrophique progressive des cellules *in vitro*. Au terme de ce travail, nous pouvons énoncer les conclusions qui suivent.

1) La culture des chondrocytes arthrosiques en billes d'alginate dans un milieu enrichi en FBS favorise la différenciation hypertrophique.

Lorsqu'ils étaient cultivés en billes d'alginate, les chondrocytes humains arthrosiques exprimaient des marqueurs caractéristiques du phénotype pré-hypertrophique et hypertrophique de façon plus importante que lorsqu'ils étaient cultivés en monocouche. L'activité des enzymes impliquées dans la minéralisation de la matrice extracellulaire était également plus élevée dans le modèle de culture en billes d'alginate. La présence de sérum dans le milieu de culture, était indispensable à de la différenciation hypertrophique.

2) *In vitro*, les chondrocytes hypertrophiques arthrosiques secrètent des molécules qui stimulent la migration, l'invasion et l'adhésion des HUVEC.

Nous avons comparé l'effet de milieux conditionnés par des CNH (3 jours de culture en bille d'alginate dans un milieu contenant 10% de sérum) ou par des CH (21 jours de culture en bille d'alginate dans un milieu de culture contenant 10% de sérum) sur la migration, l'invasion et l'adhésion des HUVEC. Les résultats de ces tests fonctionnels ont démontré que les milieux de culture conditionnés par les CH favorisaient la migration, l'invasion et l'adhésion des HUVEC. Ces résultats obtenus *in vitro* ont permis de démontrer l'existence d'un lien entre l'hypertrophie et l'angiogenèse.

3) La BSP semble être un acteur clé de l'activité pro-angiogénique des chondrocytes hypertrophique.

Nous avons sélectionné des facteurs dont le rôle pro- ou anti-angiogénique était décrit dans la littérature et comparé leur expression par les CNH et les CH. Un faisceau d'observation nous permettent de penser que BSP est impliquée dans la l'activité pro-angiogénique des CH :

- a. La BSP était le facteur pro-angiogénique le plus fortement augmentée avec l'hypertrophie. Ce résultat a été confirmé par l'étude de la production de la protéine BSP dans les extraits cellulaires et dans les milieux conditionnés par western blot.
- b. L'expression du gène BSP est fortement et positivement corrélée avec les marqueurs de l'hypertrophie.
- c. La pré-incubation des HUVEC avec un peptide GRGDS diminuait significativement l'adhésion des HUVEC en présence de milieux de CH observée précédemment. Le GRGDS a la propriété de se lier aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ des HUVEC et d'empêcher ainsi la liaison de protéines à domaine RGD à ces mêmes intégrines. Parmi les facteurs pro-angiogénique testé, seules la BSP et l'OPN sont porteuses d'une séquence RGD mais uniquement la BSP est fortement surexprimée par les CH.

4) PTHrP, un inhibiteur de la différenciation hypertrophique, diminue l'expression et de la production de BSP.

PTHrP diminuait significativement l'expression de *col10a1* ce qui témoigne de son action régulatrice sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Il inhibait également l'expression du gène de la BSP et la production de la protéine BSP par des CH. Ces résultats confirment la relation entre BSP et la différenciation hypertrophique des chondrocytes.

5) L'IL-1 β et le TNF α ont un effet répressif sur l'expression et la production de BSP par les chondrocytes.

L'addition au milieu de culture de deux cytokines favorisant la dégradation du cartilage, l'IL-1 β ou le TNF α , inhibait presque complètement l'expression de BSP et supprimait totalement sa production. Ces résultats étaient en accord avec leur effet inhibiteur sur la chondrogenèse récemment décrit [238, 239].

6) La BSP stimule la production d'IL-8 et inhibe celle de TSP-1.

Lors de cette analyse, nous avons montré que la BSP d'une part stimulait l'expression d'IL-8, une cytokine associée à la prolifération et la migration cellulaire [244] et d'autre part entraînait la diminution de la TSP-1, un inhibiteur de l'angiogenèse. Ces effets suggèrent que BSP agit sur l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques en augmentant la production de certains facteurs activateurs et en diminuant celle de facteurs inhibiteurs de l'angiogenèse. Par contre, la BSP n'avait aucun effet significatif sur les autres paramètres que nous avons analysé, il s'agissait de l'AGG, de la MMP-3, du NO, de l'IL-6, du VEGF et du bFGF.

7) BSP est associée à la sévérité des lésions du cartilage.

Dans le cartilage normal, BSP était exprimée uniquement e dans la couche superficielle du cartilage et. Dans les échantillons arthrosiques, l'expression de BSP était augmentée au niveau des lésions et présente sur une sur une profondeur plus importante. Par cette étude *ex vivo*, nous avons prouvé que la BSP était surexprimé dans le cartilage articulaire et que son niveau d'expression était lié à la sévérité des lésions du cartilage

8) La localisation de BSP dans le cartilage articulaire est associée à la densité vasculaire observée au niveau de la *tidemark*.

Nous avons observé que plus les lésions du cartilage était importante et plus l'expression de BSP était proche de la *tidemark*, et plus celle-ci était vascularisée. Ces résultats suggéraient un effet pro-angiogénique de la BSP puisque sa présence, particulièrement dans les zones moyennes et profondes du cartilage articulaire, entraînait une augmentation de la densité vasculaire au niveau de la *tidemark*.

En conclusion, nous avons démontré que la différenciation hypertrophique des chondrocytes était liée à l'expression de facteur pro-angiogénique et favorisait la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules endothéliales. Ce travail ouvre de nombreuses perspectives de recherches :

- 1) Afin de confirmer le rôle joué par BSP dans l'activité pro-angiogénique des CH, il serait utile de produire des anticorps neutralisant son activité.
- 2) Nous proposons de tester les effets de cytokines, autres que IL-1 et TNF, et de facteurs de croissance comme le TGF β sur la production de BSP.
- 3) Les CH secrètent une forme particulière de BSP. Nous envisageons de la caractériser par séquençage protéique.
- 4) Par son implication dans différents processus pathologiques caractéristiques de l'arthrose, la BSP pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante. A la manière d'autres biomarqueurs de l'arthrose, la BSP pourrait être intégré dans un *multiplex* en tant que biomarqueur de diagnostic caractéristique de l'hypertrophie et de l'angiogenèse et dont l'évolution de la concentration serait associée au niveau de dégradation du cartilage. Il existe déjà des trousse de dosages de la BSP pour les fluides biologiques humains mais qui n'ont pas été utilisées à ce jour à des fins de diagnostic d'arthrose.
- 5) Une autre approche intéressante permettant d'exploiter les résultats obtenus au cours de cette recherche serait d'employer des techniques d'inhibition de l'action de la BSP via l'utilisation de siRNA ou d'anticorps neutralisants par exemple. De telles thérapies existent déjà pour d'autres facteurs angiogéniques comme c'est le cas pour le VEGF qui est utilisé en thérapie anti-cancéreuse [246].

Nous avons pu répondre à notre hypothèse de départ que les CH expriment bien un phénotype angiogénique puisqu'ils stimulent la migration, l'invasion et l'adhésion des HUVEC et nous avons précisé que cet effet pourrait être favorisé par l'action de la BSP, un facteur associé à l'hypertrophie, à la dégradation du cartilage et à la présence de structures vasculaires au niveau de la *tidemark* (Figure C1). L'ensemble de nos résultats renforce l'idée que les phénomènes d'hypertrophie et d'angiogenèse sont liés dans l'arthrose, comme c'est le cas lors de l'ossification endochondrale dans la plaque de croissance.

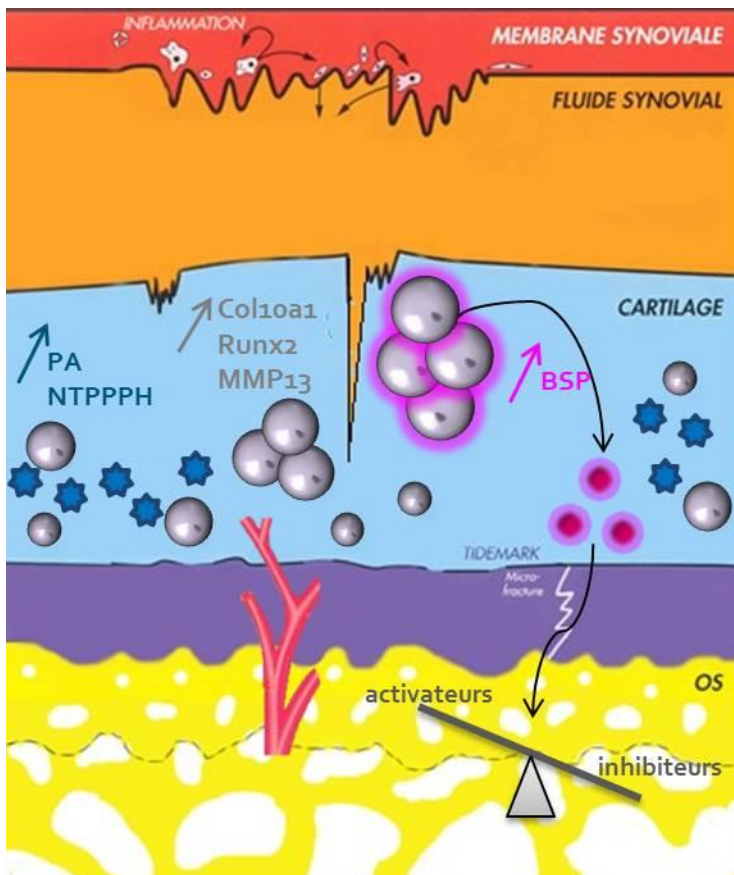


Figure C1 : La BSP joue un rôle central dans le cartilage arthrosique. Elle est sécrétée par les chondrocytes hypertrophiques, favorise le déséquilibre de la balance angiogénique et est associée à l'invasion vasculaire du cartilage au niveau de la *tidemark*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mazières B. *Le cartilage articulaire: du cartilage normal au cartilage arthrosique, de la physiologie au traitement.: Service de Rhumatologie, Hôpital de Rangueil.*
2. Sanchez C. *Mise au point d'un modèle de co-culture chondrocytes/ostéoblastes sous chondraux humains. Département de Médecine Physique, Unité de recherche sur l'Os et le Cartilage, vol. Docteur en Sciences Biomédicales: Université de Liège 2005:192.*
3. Chen FH, Rousche, K.T., Tuan, R.S. *Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. Nature Clinical Practice Rheumatology 2006; 2: 373-382.*
4. Henrotin YP, L.; Sanchez, C. *L'os sous chondral et l'angiogenèse : deux nouvelles cibles thérapeutiques de l'arthrose. réflexions rhumatologiques 2012; 16: 19-21.*
5. Dreier R. *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. Arthritis Res Ther 2010; 12: 216.*
6. Bonnet CS, Walsh DA. *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. Rheumatology (Oxford) 2005; 44: 7-16.*
7. Jeffrey DR, Watt I. *Imaging hyaline cartilage. Br J Radiol 2003; 76: 777-787.*
8. Sobol E, Shekhter A, Guller A, Baum O, Baskov A. *Laser-induced regeneration of cartilage. J Biomed Opt 2011; 16: 080902.*
9. Picher M, Graff RD, Lee GM. *Extracellular nucleotide metabolism and signaling in the pathophysiology of articular cartilage. Arthritis Rheum 2003; 48: 2722-2736.*
10. Walsh DA, Yousef A, McWilliams DF, Hill R, Hargin E, Wilson D. *Evaluation of a Photographic Chondropathy Score (PCS) for pathological samples in a study of inflammation in tibiofemoral osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2009; 17: 304-312.*
11. Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D'Lima D. *Cartilage cell clusters. Arthritis Rheum 2010; 62: 2206-2218.*
12. Henrotin Y, Sanchez C, Balligand M. *Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: present and future perspectives. Vet J 2005; 170: 113-123.*
13. Gerber HP, Ferrara N. *Angiogenesis and bone growth. Trends Cardiovasc Med 2000; 10: 223-228.*
14. Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. *L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. Osteoarthritis Cartilage 2001; 9 Suppl A: S69-75.*
15. 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: 613-622.*
16. de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. *Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. Curr Opin Cell Biol 2001; 13: 721-727.*
17. Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ. *Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 2002; 10: 564-572.*

18. Chevalier X, Richette, P. Normal joint cartilage: anatomy, physiology, metabolism, ageing. *EMC- Rhumatologie - Orthopédie* 2005; 2: 41-58.
19. Chevalier X. [Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage]. *Presse Med* 1998; 27: 75-80.
20. Vignon E. [Structure and metabolism of articular cartilage]. *Pathol Biol (Paris)* 1971; 19: 771-785.
21. Thonar EJ, Masuda, K., Manicourt, D.H., Kuettner, K.E. Structure and function of normal adult articular cartilage. *Osteoarthritis, clinical and experimental aspects* 1999; édité par Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Henrotin Y.: 1-19.
22. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 2008; 87: 77-95.
23. Jay GD, Tantravahi U, Britt DE, Barrach HJ, Cha CJ. Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25. *J Orthop Res* 2001; 19: 677-687.
24. Li B, Marshall D, Roe M, Aspden RM. The electron microscope appearance of the subchondral bone plate in the human femoral head in osteoarthritis and osteoporosis. *J Anat* 1999; 195 (Pt 1): 101-110.
25. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease - A rediscovered functional unit. *Investigative Radiology* 2000; 35: 581-588.
26. Aigner T, Dudhia J. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: A hypothesis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997; 56: 287-291.
27. Duncan H, Jundt J, Riddle JM, Pitchford W, Christopherson T. The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1987; 69: 1212-1220.
28. Corvol MT. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2000; 67: 557-560.
29. Altman RD. The classification of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43: 42-43.
30. Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G, et al. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 761-765.
31. Yusuf E, Ioan-Facsinay A, Bijsterbosch J, Klein-Wieringa I, Kwekkeboom J, Slagboom PE, et al. Association between leptin, adiponectin and resistin and long-term progression of hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1282-1284.
32. Bonnet F, Laville, M. Le syndrome métabolique : définition, épidémiologie, complications. *Spectra Biologie* 2005; 145.
33. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Association of knee osteoarthritis with the accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidemia, and impaired glucose tolerance in Japanese men and women: the ROAD study. *J Rheumatol* 2011; 38: 921-930.
34. Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 729-737.
35. Han CD, Yang IH, Lee WS, Park YJ, Park KK. Correlation between metabolic syndrome and knee osteoarthritis: data from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). *BMC Public Health* 2013; 13: 603.
36. Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1261-1264.
37. Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 1989; 320: 1322-1330.
38. Henrotin Y. Approche expérimentale de la pathogénie et du traitement de l'arthrose. *Faculté de Médecine: Université de Liège* 2003.

39. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971; 53: 523-537.
40. Meachim G, Emery IH. Cartilage fibrillation in shoulder and hip joints in Liverpool necropsies. *J Anat* 1973; 116: 161-179.
41. Meachim G, Fergie IA. Morphological patterns of articular cartilage fibrillation. *J Pathol* 1975; 115: 231-240.
42. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1632-1638.
43. Malemud CJ. Changes in proteoglycans in osteoarthritis: biochemistry, ultrastructure and biosynthetic processing. *J Rheumatol Suppl* 1991; 27: 60-62.
44. Boivin G, Lagier R. An ultrastructural study of articular chondrocalcinosis in cases of knee osteoarthritis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983; 400: 13-29.
45. Oegema TR, Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC. The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microscopy Research and Technique* 1997; 37: 324-332.
46. Bonde HV, Talman ML, Kofoed H. The area of the tidemark in osteoarthritis--a three-dimensional stereological study in 21 patients. *APMIS* 2005; 113: 349-352.
47. Collins DH. Osteoarthritis. In: *The pathology of articular and spinal diseases*, Arnold E Ed. London 1949:74-115.
48. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 13-29.
49. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 20-26.
50. Landells JW. The bone cysts of osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* 1953; 35-B: 643-649.
51. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: State-of-the art and perspectives. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2009; 19: 311-316.
52. Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, Goggins J, Amin S, LaValley MP, et al. Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1529-1535.
53. Sanchez C, Deberg MA, Bellahcene A, Castronovo V, Msika P, Delcour JP, et al. Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone (vol 58, pg 442, 2008). *Arthritis and Rheumatism* 2008; 58: 887-887.
54. Haraoui B, Pelletier JP, Cloutier JM, Faure MP, Martel-Pelletier J. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 153-163.
55. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1263-1267.
56. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3492-3501.
57. Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 743-751.
58. Myers SL, Brandt KD, Ehlich JW, Braunstein EM, Shelbourne KD, Heck DA, et al. Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 1990; 17: 1662-1669.
59. Lorenz H, Richter W. Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog Histochem Cytochem* 2006; 40: 135-163.

60. Pfander D, Swoboda B, Kirsch T. Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *American Journal of Pathology* 2001; 159: 1777-1783.
61. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger DL, Kakonen SM, Swoboda B. Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: Expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcified Tissue International* 2000; 67: 230-240.
62. Terkeltaub R, Lotz M, Johnson K, Deng D, Hashimoto S, Goldring MB, et al. Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritic cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 2152-2164.
63. 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: 294-302.
64. Karpouzas GA, Terkeltaub RA. New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification. *Curr Rheumatol Rep* 1999; 1: 121-127.
65. Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegard D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biol* 2004; 23: 381-391.
66. Tchetina EV, Squires G, Poole AR. 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. *J Rheumatol* 2005; 32: 876-886.
67. Laadhar L, Zitouni M, Kalle-Sellami M, Mahjoub M, Sellami S, Makni S. [Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: risk factors and inflammatory mechanisms]. *Rev Med Interne* 2007; 28: 531-536.
68. Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 530-540.
69. Wang L, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen G. Control of extracellular matrix homeostasis of normal cartilage by a TGFbeta autocrine pathway. Validation of flow cytometry as a tool to study chondrocyte metabolism in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 188-198.
70. Pfander D, Kortje D, Weseloh G, Swoboda B. [Cell proliferation in human arthrotic joint cartilage]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2001; 139: 375-381.
71. Quintavalla J, Kumar C, Daouti S, Slosberg E, Uziel-Fusi S. Chondrocyte cluster formation in agarose cultures as a functional assay to identify genes expressed in osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2005; 204: 560-566.
72. Khan IM, Bishop JC, Gilbert S, Archer CW. Clonal chondroprogenitors maintain telomerase activity and Sox9 expression during extended monolayer culture and retain chondrogenic potential. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 518-528.
73. Livne E. In vitro response of articular cartilage from mature mice to human transforming growth factor beta. *Acta Anat (Basel)* 1994; 149: 185-194.
74. Appleton CT, Usmani SE, Bernier SM, Aigner T, Beier F. Transforming growth factor alpha suppression of articular chondrocyte phenotype and Sox9 expression in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3693-3705.
75. Maeda S, Nishida J, Sato T, Inomata Y, Shimamura T, Horiuchi S. Changes in microstructure and gene expression of articular chondrocytes cultured in a tube under mechanical stress. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 154-161.
76. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Gluckert K, et al. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis & Rheumatism* 1992; 35: 806-811.

77. Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 963-973.
78. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 284-289.
79. Berenbaum F. Anatomopathologie et pathogénie de l'arthrose. *Revue du Rhumatisme* 2000; 67 Suppl 3: 119-125.
80. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012; 4: 269-285.
81. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 2010; 16: 678-686.
82. Saito T, Kawaguchi H. HIF-2alpha as a possible therapeutic target of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 1552-1556.
83. Dreier R, Opolka A, Grifka J, Bruckner P, Grassel S. Collagen IX-deficiency seriously compromises growth cartilage development in mice. *Matrix Biol* 2008; 27: 319-329.
84. Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 5-18.
85. Pfander D, Swoboda B, Kirsch T. Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am J Pathol* 2001; 159: 1777-1783.
86. Radin EL, Paul IL, Tolkoff MJ. Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum* 1970; 13: 400-405.
87. Fazzalari NL, Moore RJ, Manthey BA, Vernon-Roberts B. Comparative study of iliac crest and subchondral femoral bone in osteoarthritic patients. *Bone* 1992; 13: 331-335.
88. Dequeker J, Mokassa L, Aerssens J, Boonen S. Bone density and local growth factors in generalized osteoarthritis. *Microsc Res Tech* 1997; 37: 358-371.
89. Felson DT, Neogi T. Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis Rheum* 2004; 50: 341-344.
90. Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 43-49.
91. Lyons TJ, McClure SF, Stoddart RW, McClure J. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskelet Disord* 2006; 7: 52.
92. Guevremont M, Martel-Pelletier J, Massicotte F, Tardif G, Pelletier JP, Ranger P, et al. 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* 2003; 18: 1073-1081.
93. Sharif M, George E, Dieppe PA. Correlation between synovial fluid markers of cartilage and bone turnover and scintigraphic scan abnormalities in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 78-81.
94. Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JYL, Henrotin YE. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1 beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis and Cartilage* 2005; 13: 979-987.
95. Solomon LA, Berube NG, Beier F. Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008; 84: 123-130.
96. Nurminkaya M, Linsenmayer TF. Identification and characterization of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. *Dev Dyn* 1996; 206: 260-271.

97. Oettmeier R, Abendroth K, Oettmeier S. Analyses of the tidemark on human femoral heads. II. Tidemark changes in osteoarthritis--a histological and histomorphometric study in non-decalcified preparations. *Acta Morphol Hung* 1989; 37: 169-180.
98. Revell PA, Pirie C, Amir G, Rashad S, Walker F. Metabolic activity in the calcified zone of cartilage: observations on tetracycline labelled articular cartilage in human osteoarthritic hips. *Rheumatol Int* 1990; 10: 143-147.
99. Suri S, Gill SE, Massena de Camin S, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1423-1428.
100. Brown RA, Weiss JB. Neovascularisation and its role in the osteoarthritic process. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 881-885.
101. Hiraki Y, Shukunami C. Chondromodulin-I as a novel cartilage-specific growth-modulating factor. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 602-605.
102. Pfander D, Cramer T, Deuerling D, Weseloh G, Swoboda B. Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2000; 59: 448-454.
103. Walsh DA, McWilliams DF, Turley MJ, Dixon MR, Franses RE, Mapp PI, et al. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 1852-1861.
104. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 316: 573-579.
105. Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res* 2000; 86: 885-891.
106. Cantatore FP, Crivellato E, Nico B, Ribatti D. Osteocalcin is angiogenic in vivo. *Cell Biol Int* 2005; 29: 583-585.
107. Ramoshebi LN, Ripamonti U. Osteogenic protein-1, a bone morphogenetic protein, induces angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and synergizes with basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1. *Anatomical Record* 2000; 259: 97-107.
108. Sanchez C DM, Bellahcène A, Castronovo V, Msika P, Delcour JP, Crielaard JM, Henrotin YE. Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis and Rheumatism* 2008; 58 (2): 442-455.
109. Walsh DA, Pearson CI. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Research* 2001; 3: 147-153.
110. Suri S, Gill SE, de Camin SM, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007; 66: 1423-1428.
111. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2003; 48: 2173-2177.
112. Clavel G, Bessis N, Boissier MC. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2003; 70: 321-326.
113. Lehmann W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, Kakar S, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 2005; 36: 300-310.
114. Vincent TL, McLean CJ, Full LE, Peston D, Saklatvala J. FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 752-763.
115. Brew CJ, Clegg PD, Boot-Handford RP, Andrews G, Hardingham T. Gene expression in human chondrocytes in late OA is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy. *Ann Rheum Dis* 2008.

116. Smith JO, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI. Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. *J Orthop Sci* 2003; 8: 849-857.
117. Cohen T, Gitay-Goren H, Sharon R, Shibuya M, Halaban R, Levi BZ, et al. 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. *J Biol Chem* 1995; 270: 11322-11326.
118. Park JE, Keller GA, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms - differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell* 1993; 4: 1317-1326.
119. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998; 93: 1159-1170.
120. Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta(1) integrins. *Journal of Cell Biology* 2005; 168: 643-653.
121. Volpert OV. Modulation of endothelial cell survival by an inhibitor of angiogenesis thrombospondin-1: a dynamic balance. *Cancer and Metastasis Reviews* 2000; 19: 87-92.
122. Zhang X, Parangi S, Lawler J. Regulation of VEGF-Induced Vascular Permeability and VEGFR2 Signaling by Thrombospondin-1. *Modern Pathology* 2009; 22: 344a-344a.
123. Canfield AE, Schor AM. Evidence that tenascin and thrombospondin-1 modulate sprouting of endothelial cells. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 2): 797-809.
124. Chevalier X, Groult N, Largetpiet B, Zardi L, Hornebeck W. Tenascin Distribution in Articular-Cartilage from Normal Subjects and from Patients with Osteoarthritis and Rheumatoid-Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1994; 37: 1013-1022.
125. Shukunami C, Iyama K, Inoue H, Hiraki Y. Spatiotemporal pattern of the mouse chondromodulin-I gene expression and its regulatory role in vascular invasion into cartilage during endochondral bone formation. *International Journal of Developmental Biology* 1999; 43: 39-49.
126. Hiraki Y, Tanaka H, Inoue H, Kondo J, Kamizono A, Suzuki F. Molecular-Cloning of a New Class of Cartilage-Specific Matrix, Chondromodulin-I, Which Stimulates Growth of Cultured Chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 175: 971-977.
127. Funaki H, Sawaguchi S, Yaoeda K, Koyama Y, Yaoita E, Funaki S, et al. Expression and localization of angiogenic inhibitory factor, chondromodulin-I, in adult rat eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001; 42: 1193-1200.
128. Hayami T, Funaki H, Yaoeda K, Mitui K, Yamagiwa H, Tokunaga K, et al. Expression of the cartilage derived anti-angiogenic factor chondromodulin-I decreases in the early stage of experimental osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 2003; 30: 2207-2217.
129. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C947-970.
130. Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, et al. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *American Journal of Pathology* 2003; 162: 171-181.
131. Murata M, Yudoh K, Masuko K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 279-286.
132. Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, Aoki T, Ikeda E, Okada Y. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 2002; 277: 36288-36295.
133. Nisato RE, Hosseini G, Sirrenberg C, Butler GS, Crabbe T, Docherty AJ, et al. Dissecting the role of matrix metalloproteinases (MMP) and integrin alpha(v)beta3 in angiogenesis in vitro: absence of hemopexin C domain bioactivity, but membrane-Type 1-MMP and alpha(v)beta3 are critical. *Cancer Research* 2005; 65: 9377-9387.

134. Ichikawa Y, Ishikawa T, Momiyama N, Kamiyama M, Sakurada H, Matsuyama R, et al. *Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of beta-catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells.* *Oncol Rep* 2006; 15: 311-315.
135. Bini A, Wu D, Schnuer J, Kudryk BJ. *Characterization of stromelysin 1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), and membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer: NH2-terminal sequences of late-stage digest fragments.* *Biochemistry* 1999; 38: 13928-13936.
136. Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I. *Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7069-7074.
137. Patterson BC, Sang QA. *Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9).* *J Biol Chem* 1997; 272: 28823-28825.
138. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. *Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance.* *J Biol Chem* 1999; 274: 29568-29571.
139. Kalluri R. *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis.* *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 422-433.
140. Sandell LJ, Wang Z, Franz C, Havioglu N, Bryan J, Ell B, et al. *Chondrostatin: A new inhibitor of angiogenesis, tumor invasion and osteoclast activity.* *Journal of Bone and Mineral Research* 2007; 22: T259.
141. Gordon GV, Villanueva T, Schumacher HR, Gohel V. *Autopsy study correlating degree of osteoarthritis, synovitis and evidence of articular calcification.* *J Rheumatol* 1984; 11: 681-686.
142. Ea HK, Nguyen C, Bazin D, Bianchi A, Guicheux J, Reboul P, et al. *Articular cartilage calcification in osteoarthritis: insights into crystal-induced stress.* *Arthritis & Rheumatism* 2011; 63: 10-18.
143. Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millan JL. *Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders.* *Am J Pathol* 2004; 164: 1199-1209.
144. Wang W, Xu J, Du B, Kirsch T. *Role of the progressive ankylosis gene (*ank*) in cartilage mineralization.* *Mol Cell Biol* 2005; 25: 312-323.
145. Whyte MP, Landt M, Ryan LM, Mulivor RA, Henthorn PS, Fedde KN, et al. *Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy.* *J Clin Invest* 1995; 95: 1440-1445.
146. Johnson K, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R. *The nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase isozyme PC-1 directly promotes cartilage calcification through chondrocyte apoptosis and increased calcium precipitation by mineralizing vesicles.* *J Rheumatol* 2001; 28: 2681-2691.
147. Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C. *Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move.* *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 393-432.
148. Chevalier X. *Arthrose et microcristaux.* *Revue du rhumatisme* 2007; 74: 173-176.
149. Aeschlimann D, Wetterwald A, Fleisch H, Paulsson M. *Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes.* *J Cell Biol* 1993; 120: 1461-1470.
150. Rosenthal AK, Derfus BA, Henry LA. *Transglutaminase activity in aging articular chondrocytes and articular cartilage vesicles.* *Arthritis Rheum* 1997; 40: 966-970.
151. Rosenthal AK, Gohr CM, Henry LA, Le M. *Participation of transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor beta1 in aging articular cartilage.* *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1729-1733.

152. Nurminkaya M, Kaartinen MT. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci* 2006; 11: 1591-1606.
153. Hirose J, Ryan LM, Masuda I. Up-regulated expression of cartilage intermediate-layer protein and ANK in articular hyaline cartilage from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3218-3229.
154. Lotz M, Rosen F, McCabe G, Quach J, Blanco F, Dudler J, et al. Interleukin 1 beta suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC-1 in human chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 10364-10368.
155. Johnson K, Hashimoto S, Lotz M, Pritzker K, Terkeltaub R. Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am J Pathol* 2001; 159: 149-163.
156. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 1999; 40: 1-11.
157. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002; 39: 237-246.
158. Nalbant S, Martinez JA, Kitumnuaypong T, Clayburne G, Sieck M, Schumacher HR, Jr. Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 50-54.
159. Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 633-640.
160. Martel-Pelletier J, Di Battista J, Lajeunesse D. Biochemical factors in joint articular tissue degradation osteoarthritis. In: *Osteoarthritis clinical and experimental aspects*, Reginster JY, Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Henrotin, Y. Ed. Heidelberg: Springer 1999:156-187.
161. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
162. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 455-461.
163. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 585-594.
164. Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ. Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2: 466-471.
165. Lotz M, Blanco FJ, von Kempis J, Dudler J, Maier R, Villiger PM, et al. Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43: 104-108.
166. Chevalier X. Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis. *Biomed Pharmacother* 1997; 51: 58-62.
167. Attur MG, Patel IR, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 65-72.
168. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1237-1247.
169. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994; 70: 807-815.
170. Calich AL, Domiciano DS, Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? *Clin Rheumatol* 2010; 29: 451-455.
171. Henrotin Y, Deby-Dupont G, Deby C, Franchimont P, Emerit I. Active oxygen species, articular inflammation and cartilage damage. *EXS* 1992; 62: 308-322.
172. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 747-755.

173. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 643-654.
174. Sahap Atik O. Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990; 39: 253-254.
175. Toussiroit E, Streit G, Wendling D. The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr Med Chem* 2007; 14: 1095-1100.
176. Koskinen A, Vuolteenaho K, Nieminen R, Moilanen T, Moilanen E. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 57-64.
177. Staikos C, Ververidis A, Drosos G, Manolopoulos VG, Verettas DA, Tavridou A. The association of adipokine levels in plasma and synovial fluid with the severity of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52: 1077-1083.
178. Lago R, Gomez R, Otero M, Lago F, Gallego R, Dieguez C, et al. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 1101-1109.
179. Gomez R, Scotece M, Conde J, Gomez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. Adiponectin and leptin increase IL-8 production in human chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 2052-2054.
180. Honsawek S, Chayanupatkul M. Correlation of plasma and synovial fluid adiponectin with knee osteoarthritis severity. *Arch Med Res* 2010; 41: 593-598.
181. Hao D, Li M, Wu Z, Duan Y, Li D, Qiu G. Synovial fluid level of adiponectin correlated with levels of aggrecan degradation markers in osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2011; 31: 1433-1437.
182. Lee JH, Ort T, Ma K, Picha K, Carton J, Marsters PA, et al. Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 613-620.
183. Berry PA, Jones SW, Cicuttini FM, Wluka AE, Maciewicz RA. Temporal relationship between serum adipokines, biomarkers of bone and cartilage turnover, and cartilage volume loss in a population with clinical knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 700-707.
184. Gosset M, Berenbaum F, Salvat C, Sautet A, Pigenet A, Tahiri K, et al. Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1399-1409.
185. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003; 198: 977-985.
186. Berg V, Sveinbjornsson B, Bendiksen S, Brox J, Meknas K, Figenschau Y. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin(21-157). *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R228.
187. Conde J, Gomez R, Bianco G, Scotece M, Lear P, Dieguez C, et al. Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 551-559.
188. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour JP, Msika P, Baudouin C, et al. Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 1193-1203.
189. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
190. Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980; 102: 344-352.
191. De Ceuninck F, Lesur C, Pastoureau P, Caliez A, Sabatini M. Culture of chondrocytes in alginate beads. *Methods Mol Med* 2004; 100: 15-22.
192. Buckwalter JA, Mower D, Ungar R, Schaeffer J, Ginsberg B. Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am* 1986; 68: 243-255.

193. Yoo JO, Yi SJ, Choi HJ, Kim WJ, Kim YM, Han JA, et al. Regulation of tissue transglutaminase by prolonged increase of intracellular Ca²⁺, but not by initial peak of transient Ca²⁺ increase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 655-662.
194. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 401-404.
195. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 2336-2346.
196. Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J* 2001; 360: 461-470.
197. von der Mark K, Frischholz S, Aigner T, Beier F, Belke J, Erdmann S, et al. Upregulation of type X collagen expression in osteoarthritic cartilage. *Acta Orthop Scand Suppl* 1995; 266: 125-129.
198. Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, et al. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 2000; 275: 8695-8702.
199. Huebner JL, Johnson KA, Kraus VB, Terkeltaub RA. Transglutaminase 2 is a marker of chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis severity in the Hartley guinea pig model of knee OA. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 1056-1064.
200. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 2000; 289: 265-270.
201. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 1): 59-69.
202. Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, et al. Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. *Histochem Cell Biol* 2005; 123: 275-281.
203. Nurminkaya M, Linsenmayer TF. Identification and characterization of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. *Developmental Dynamics* 1996; 206: 260-271.
204. James CG, Appleton CT, Ulici V, Underhill TM, Beier F. Microarray analyses of gene expression during chondrocyte differentiation identifies novel regulators of hypertrophy. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5316-5333.
205. Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 2006; 208: 77-86.
206. Ea HK. Avancées pathogéniques des mécanismes de calcification du cartilage. *Revue du rhumatisme* 2007; 74: 168-172.
207. Bohme K, Conscience-Egli M, Tschan T, Winterhalter KH, Bruckner P. Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *Journal of Cell Biology* 1992; 116: 1035-1042.
208. Alini M, Kofsky Y, Wu W, Pidoux I, Poole AR. In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 105-113.
209. Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stemerman MB, Weinstein R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Cell Biology* 1982; 94: 511-520.
210. Vailhe B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81: 439-452.
211. Ashraf S, Walsh DA. Angiogenesis in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20: 573-580.
212. Franses RE, McWilliams DF, Mapp PI, Walsh DA. Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 563-571.
213. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001; 106: 148-156.

214. Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. *J Wound Care* 2009; 18: 516-519.
215. Nico B, Mangieri D, Benagiano V, Crivellato E, Ribatti D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res* 2008; 75: 135-141.
216. Wang Y, Yan W, Lu X, Qian C, Zhang J, Li P, et al. Overexpression of osteopontin induces angiogenesis of endothelial progenitor cells via the avbeta3/PI3K/AKT/eNOS/NO signaling pathway in glioma cells. *Eur J Cell Biol* 2011; 90: 642-648.
217. Jackson C. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 295-299.
218. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000; 6: 460-463.
219. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, et al. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 513-526.
220. De Spiegelaere W, Cornillie P, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M. Angiopoietins differentially influence in vitro angiogenesis by endothelial cells of different origin. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011; 48: 15-27.
221. Armstrong LC, Bornstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol* 2003; 22: 63-71.
222. Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y. Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 299-307.
223. Ribatti DV, A.; Presta, M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *General pharmacology* 2001; 35: 227-231.
224. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia* 2007; 21: 44-52.
225. Lamour V, Detry C, Sanchez C, Henrotin Y, Castronovo V, Bellahcene A. Runx2- and histone deacetylase 3-mediated repression is relieved in differentiating human osteoblast cells to allow high bone sialoprotein expression. *J Biol Chem* 2007; 282: 36240-36249.
226. Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem* 1983; 258: 12723-12727.
227. Petersson IF, Boegard T, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 46-50.
228. Conrozier T, Saxne T, Fan CS, Mathieu P, Tron AM, Heinegard D, et al. Serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in hip osteoarthritis: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 527-532.
229. Ekman S, Skioldebrand E, Heinegard D, Hultenby K. Ultrastructural immunolocalisation of bone sialoprotein in the osteocartilagenous interface of the equine third carpal bone. *Equine Vet J* 2005; 37: 26-30.
230. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, et al. Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem* 2003; 278: 7949-7955.
231. Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem* 2005; 280: 13487-13492.
232. Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 2007; 41: 462-473.
233. Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol* 2008; 27: 600-608.

234. Jiang J, Leong NL, Mung JC, Hidaka C, Lu HH. Interaction between zonal populations of articular chondrocytes suppresses chondrocyte mineralization and this process is mediated by PTHrP. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 70-82.
235. Kozhemyakina E, Cohen T, Yao TP, Lassar AB. Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 5751-5762.
236. Fischer J, Dickhut A, Rickert M, Richter W. Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis & Rheumatism* 2010; 62: 2696-2706.
237. Aigner T, Reichenberger E, Bertling W, Kirsch T, Stoss H, von der Mark K. Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993; 63: 205-211.
238. Heldens GT, Blaney Davidson EN, Vitters EL, Schreurs BW, Piek E, van den Berg WB, et al. Catabolic factors and osteoarthritis-conditioned medium inhibit chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2012; 18: 45-54.
239. Simsa-Maziel S, Monsonigo-Ornan E. Interleukin-1beta promotes proliferation and inhibits differentiation of chondrocytes through a mechanism involving down-regulation of FGFR-3 and p21. *Endocrinology* 2012; 153: 2296-2310.
240. Lohmander LS, Saxne T, Heinegard D. Increased concentrations of bone sialoprotein in joint fluid after knee injury. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 622-626.
241. Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006627.
242. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, et al. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 125-134.
243. Martin D, Galisteo R, Gutkind JS. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem* 2009; 284: 6038-6042.
244. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer* 2011; 128: 2038-2049.
245. Fenwick SA, Gregg PJ, Rooney P. Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7: 441-452.
246. Lien S, Lowman HB. Therapeutic anti-VEGF antibodies. *Handb Exp Pharmacol* 2008: 131-150.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Laurence Pesesse, Christelle Sanchez, Yves Henrotin. Néo-vascularisation de la plaque ostéochondrale : nouvelle cible thérapeutique de l'arthrose. Revue du rhumatisme, 2011. 78, p12-16

ANNEXE 2 :

L. Pesesse, C. Sanchez, J.-P. Delcour, A. Bellahcène, C. Baudouin, P. Msika, Y. Henrotin. Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis. Osteoarthritis and cartilage, 2013. Sous presse.

ANNEXE 3 :

Laurence Pesesse, Christelle Sanchez, David Andrew Walsh, Jean-Pierre Delcour, Caroline Baudouin, Philippe Msika, Yves Henrotin. Bone sialoprotein as a potential key factor implicated in the pathophysiology of osteoarthritis. Osteoarthritis and cartilage, 2013. En révision.

RÉSUMÉ

Le cartilage articulaire arthrosique est le lieu de diverses modifications structurelles et biochimiques entraînant sa détérioration irréversible. Un des phénomènes pathologiques associé à cette dégradation est la différenciation hypertrophique des chondrocytes qui peut mener à la minéralisation du tissu et entraîner une altération des propriétés mécaniques du cartilage articulaire. Une néo-vascularisation du cartilage arthrosique peut également être observée au sein de la plaque ostéochondrale. Le cartilage étant typiquement non-vascularisé, la formation de néo-vaisseaux par angiogenèse est un processus pathologique dans le tissu adulte et favorise son altération. L'hypothèse sur laquelle se fonde ce travail est que les chondrocytes arthrosiques hypertrophiques expriment un phénotype angiogénique. L'objectif était dès lors de démontrer que ces cellules sécrétaient des facteurs capables de stimuler la néo-vascularisation du cartilage. Dans ce but, nous avons mis au point un modèle de culture permettant de reproduire la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques afin d'étudier les effets de ce changement de phénotype sur des étapes clé du processus d'angiogenèse. Nous avons ensuite identifié un facteur angiogénique sécrété spécifiquement par les chondrocytes arthrosiques hypertrophique, la *bone sialoprotein* (BSP). L'étude subséquente de la régulation et de l'effet de la BSP sur le métabolisme des chondrocytes a permis de préciser son association avec l'hypertrophie et suggérer son rôle dans la balance angiogénique. Finalement, une étude *in vivo* a mené à la mise en évidence d'une association de la localisation de BSP au sein du cartilage avec la sévérité des lésions du tissu ainsi qu'avec la densité vasculaire. C'est pourquoi la BSP est considérée, au terme de ce travail, comme un facteur clé dans l'arthrose.