



**Université de Liège | Faculté de Médecine**

Département des Sciences de la Motricité

Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage

Arthropôle Liège

Professeur Yves Henrotin

## **Validation préclinique de marqueurs biologiques de l'arthrose**

Thèse présentée par **Catherine Legrand** en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur : **Professeur Yves Henrotin**

Co-promoteur : **Docteur Cécile Lambert**



Année académique 2017-2018



## Remerciements

Arrivée au terme de la rédaction de ce travail, je suis plus que jamais convaincue que réaliser une thèse est loin d'être un travail solitaire. Ce travail doctoral repose sur le soutien d'un grand nombre de personnes dont la bonne humeur, la générosité ainsi que l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « *l'apprentie chercheuse* ».

Ma reconnaissance s'adresse tout d'abord au Professeur Yves Henrotin, pour m'avoir accueillie au sein de son Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage et pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail. Je le remercie pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée, pour ses nombreux conseils avisés, son indéfectible soutien, sa grande disponibilité ainsi que pour ses relectures minutieuses. Plus qu'un simple manuscrit, cette thèse représente le fruit d'une immersion dans un secteur passionnant dans lequel le Pr. Henrotin est déjà engagé depuis de nombreuses années. Je lui suis infiniment reconnaissante de m'avoir transmis son investissement et son intarissable intérêt à concourir au développement de la connaissance et à la recherche de réponses dans le diagnostic, la prévention et le traitement de l'arthrose.

Je remercie le Professeur Marc Muller, Président du Comité et du Jury de thèse, ainsi que les membres du Comité de thèse pour le temps qu'ils ont consacré aux réunions et à la lecture de ce travail. Je les remercie encore pour leurs nombreuses remarques et suggestions qui ont contribué à améliorer la qualité de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement les Docteurs Cécile Lambert, Christelle Sanchez, Fanny Comblain ainsi que Prescilia Centonze pour leur expérience scientifique, leur présence, leur disponibilité, leur bonne humeur, leurs encouragements et nombreux conseils dispensés lors du cheminement de ce projet et pendant la phase de rédaction de ce travail. Merci aux voisins de labo, François, Jean-Paul, Laurence, Pascal et Pauline pour les moments de convivialité partagés.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude aux collaborateurs de la société spin-off Artialis pour leur soutien scientifique. Parmi eux, je remercie tout particulièrement Mesdames les Docteurs Anne Cornet et Christelle Boileau, Alain Labasse, Sébastien Taralla et Benoît Boulanger pour les enseignements, l'aide, l'expérience et la sympathie dont j'ai bénéficié.

Je remercie les Docteurs Martin Garon et Sim Sotcheadt pour l'aide inestimable apportée dans l'analyse et le traitement des résultats Mach-1. Nos nombreux rendez-vous *TeamViewer* à distance entre le Canada et la Belgique ont grandement facilité notre compréhension de la technique du Mach-1. Nos échanges scientifiques m'ont permis d'atteindre les objectifs poursuivis à travers ce travail. Je remercie tout particulièrement Prescilia Centonze pour la mise en œuvre des analyses des propriétés mécaniques du cartilage de nos cobayes.

Je remercie les Docteurs Linda Hoekstra, Patrick Zimmerman et Marjolein Kops pour leur expertise et les précieux conseils prodigués en vue des analyses de la démarche des cobayes à l'aide du CatWalk. Je pense en particulier à Prescilia Centonze, laquelle n'a ménagé ni sa patience ni sa persévérance pour placer tous les cobayes (parfois maladroits et peu dociles) sur la plateforme de marche. Son courage et son sang-froid y sont pour beaucoup dans la réussite de cette analyse, qui bien que s'annonçant délicate, a été indispensable pour le succès de nos travaux.

Je remercie spécialement toute l'équipe de l'Institut de recherche en sciences cliniques de l'Université de Warwick de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je remercie tout particulièrement le Professeur Paul Thornalley ainsi que le Docteur Naila Rabbani pour l'analyse des biomarqueurs ainsi que pour leur concours à la rédaction de la publication commune, et les nombreux échanges aussi riches que fructueux que nous avons eus dans ce cadre.

Je souhaite également remercier le Docteur Jean-Emile Dubuc et son équipe pour leur collaboration précieuse.

Je remercie le Docteur Anne-Françoise Donneau pour son dévouement, sa grande amabilité et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée par ses compétences en statistiques.

Je tiens à remercier les animaliers de l'Université de Liège pour les soins prodigués à nos cobayes<sup>1</sup> et qui ont permis de mener à bien cette étude dans les meilleures conditions. Merci à Cécile, Christelle, Fanny, Prescilia, Sébastien et Benoît pour votre aide précieuse durant l'étude « cobaye ».

J'adresse un clin d'œil tout particulier à Jean-Baptiste ainsi qu'à ma famille pour leur soutien permanent, leur écoute attentive, leur inébranlable patience et leurs encouragements incessants apportés durant ces dernières années. Merci de vous être investis à votre manière dans ma thèse, dans les aspects moins scientifiques mais non moins essentiels. Ce travail est évidemment aussi un peu le vôtre.

Cette énumération est probablement incomplète. Mes remerciements s'adressent évidemment aussi à d'autres personnes qui se reconnaîtront, et dont la contribution, bien que plus discrète, n'en demeure pas moins tout aussi essentielle et digne de reconnaissance.

Enfin, je m'en voudrais de ne pas tout spécialement dédier ce travail à « *Choupinette* » qui verra le jour d'ici peu et qui, plus que personne, aura eu le rare privilège de vivre de l'intérieur l'expérience d'une rédaction de thèse avant même de découvrir le visage de ses parents. La défense de cette thèse clôt un chapitre. Le prochain chapitre, c'est avec toi que nous l'écrivons.

---

<sup>1</sup> Leurs vies ayant été enlevées pour le progrès scientifique, ceux-ci méritent aussi toute notre reconnaissance.



## **Abstract**

### ***Introduction***

Osteoarthritis is the most common form of joint disease. It affects more than one million people in Belgium. Considered as a major public health problem among seniors, it is responsible for many direct and indirect costs generated, in particular, by the increasing number of hip and knee implants. To date, there is no way to detect early, predict or monitor the course of the disease. The association of glycated, oxidized and nitrated amino acids released from the joint with development and progression of knee osteoarthritis (OA) is unknown. We studied this in an OA animal model, patients with OA and interleukin-1 $\beta$ -activated human chondrocytes *in vitro*.

### ***Material and methods***

Sixty 3-week-old male Dunkin-Hartley guinea pigs were studied. At 4-week-old and 8 week intervals until week 36, twelve animals were sacrificed and histological severity of knee OA evaluated and cartilage rheological properties assessed. Human patients with early and advanced OA, and healthy controls were recruited. Human chondrocytes cultured in multilayers were treated for 10 days with interleukin-1 $\beta$ . Serum, plasma and culture medium were analyzed for glycated, oxidized and nitrated amino acids.

### ***Results***

Severity of OA increased progressively in guinea pigs with age. Glycated, oxidized and nitrated amino acids were increased markedly at week 36, with glucosepane and dityrosine increasing progressively from weeks 20 and 28, respectively. Glucosepane correlated positively with OA histological severity ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.0001$ ) and Young's Modulus (condyle:  $r = 0.52$ , plateau:  $r = 0.56$ ;  $p < 0.0001$ ), oxidation free adducts correlated positively with OA severity ( $p < 0.0009$ ). In clinical translation, plasma glucosepane was increased by 38% in early-stage OA ( $p < 0.05$ ) and 6-fold in patients with advanced OA ( $p < 0.001$ ), compared to healthy controls. Interleukin-1 $\beta$  increased the release of glycated and nitrated amino acids from chondrocytes *in vitro*.

### ***Conclusions***

In conclusion, we observed in our *in vivo* study an increase in rigidity as well as a decrease in the thickness of the cartilage during the aging of the animal. In addition, a decrease in average walking speed and swing speed in 36-week-old guinea pigs was observed with CatWalk analysis. Serum concentrations of glycation, oxidation and nitration products increased with the development of osteoarthritis. *In vitro*, IL-1 $\beta$  increased the concentration of AGE and 3-NT in human chondrocytes cultured in multilayers. Glucosepane, strongly correlated with the histological parameters as well as the mechanical properties of the cartilage is a potential biomarker for the detection and progression of osteoarthritis.



## Résumé

### *Introduction*

L'arthrose est la plus fréquente des maladies articulaires. Elle touche plus d'un million d'individus en Belgique. Considérée comme un problème de santé publique majeur chez les seniors, elle est responsable de nombreux coûts directs et indirects générés, notamment, par le nombre croissant de poses de prothèses de hanche et de genou. A ce jour, il n'existe aucun moyen de dépister précocement, de pronostiquer ou de suivre l'évolution de la maladie. L'association entre les acides aminés glyqués, oxydés et nitrés libérés par l'articulation et la progression de l'arthrose du genou est encore inconnue. Nous avons étudié cette association dans un modèle animal d'arthrose, chez des patients arthrosiques ainsi que dans des chondrocytes humains activés par l'IL-1 $\beta$  *in vitro*.

### *Matériel et méthodes*

Soixante cobayes mâles Dunkin-Hartley âgés de 3 semaines ont été utilisés dans ce travail. À l'âge de 4 semaines et à intervalle de 8 semaines jusqu'à la semaine 36, douze animaux ont été sacrifiés et la sévérité des lésions histologiques du genou ainsi que les propriétés rhéologiques du cartilage ont été évaluées. Des patients atteints d'arthrose précoce et avancée et des témoins sains ont été recrutés. Des chondrocytes humains ont été cultivés en multicouches et ont été traités pendant 10 jours avec de l'interleukine-1. Les acides aminés glyqués, oxydés et nitrés ont été analysés dans le sérum, le plasma et le milieu de culture.

### *Résultats*

La sévérité de l'arthrose augmentait progressivement chez les cobayes avec l'âge. Les acides aminés glyqués, oxydés et nitrés augmentaient de façon marquée à la semaine 36, le glucosepane et la dityrosine augmentaient progressivement à partir de la semaine 20 et 28, respectivement. Le glucosepane était positivement corrélé avec le score histologique global ( $r=0,58$ ,  $p<0,0001$ ) et le module instantané (condyles fémoraux :  $r=0,52$  et plateau tibial  $r=0,56$ ,  $p<0,0001$ ), les produits d'oxydation corrélaient de manière positive avec la sévérité de l'arthrose ( $p<0,0009$ ). Dans l'étude clinique, le glucosepane sérique augmentait de 38% chez les patients atteints d'arthrose à un stade précoce, eOA ( $p<0,05$ ) et 6 fois chez les patients atteints d'arthrose à un stade avancé, aOA ( $p<0,001$ ), en comparaison avec les valeurs des contrôles. L'IL-1 $\beta$  augmentait la libération des produits de glycation, d'oxydation et de nitration.

### *Conclusions*

En conclusion, nous avons observé dans notre étude *in vivo* une augmentation de la rigidité ainsi qu'une diminution de l'épaisseur du cartilage au cours du vieillissement de l'animal. De plus, une diminution de la vitesse moyenne de marche et de la vitesse de propulsion chez les cobayes âgés de 36 semaines a été observée grâce à l'analyse CatWalk. Les concentrations sériques des produits de glycation, d'oxydation et de nitration augmentaient avec le développement de l'arthrose. *In vitro*, l'IL-1  $\beta$  augmentait la concentration de certains AGE et de 3-NT dans les milieux de chondrocytes humains cultivés en multicouches. Le glucosepane, fortement corrélé aux paramètres histologiques ainsi qu'aux propriétés mécaniques du cartilage, est un biomarqueur potentiel de détection et de progression de la maladie arthrosique.



## Table des matières

<b>1</b>	<b>Objectifs généraux</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Introduction générale</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>L'articulation synoviale</b> .....	<b>2</b>
2.1.1	Anatomie.....	2
2.1.2	Le cartilage articulaire.....	3
2.1.2.1	Caractéristiques et physiologie.....	3
2.1.2.2	Architecture générale.....	4
2.1.2.3	Les cellules.....	5
2.1.2.4	La matrice extracellulaire .....	6
2.1.3	L'os sous-chondral.....	10
2.1.4	La membrane synoviale.....	11
2.1.5	Le liquide synovial .....	13
2.1.5.1	Composition.....	14
<b>2.2</b>	<b>L'arthrose</b> .....	<b>15</b>
2.2.1	Définition et prévalence.....	15
2.2.2	Facteurs de risque.....	18
2.2.3	Modifications anatomo-pathologiques.....	20
2.2.3.1	Au niveau du cartilage articulaire.....	20
2.2.3.2	Au niveau de l'os sous-chondral .....	22
2.2.3.3	Au niveau de la membrane synoviale .....	23
2.2.3.4	Au niveau du liquide synovial .....	24
2.2.4	Physiopathologie de l'arthrose .....	26
2.2.4.1	Boucle cartilagino-cartilagineuse.....	27
2.2.4.2	Boucle ostéo-cartilagineuse .....	28
2.2.4.3	Boucle synovio-cartilagineuse .....	28
2.2.5	Les enzymes protéolytiques .....	30
2.2.5.1	Les cytokines .....	31
2.2.5.2	Les formes activées de l'oxygène .....	33
2.2.5.3	Les prostanoïdes .....	34
2.2.5.4	Les facteurs angiogéniques .....	35
<b>2.3</b>	<b>Les recommandations pour le traitement de l'arthrose</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4</b>	<b>Diagnostic de l'arthrose et marqueurs biochimiques de l'arthrose</b> .....	<b>39</b>
<b>2.5</b>	<b>La glycation, l'oxydation et la nitration des protéines</b> .....	<b>42</b>
2.5.1	Mécanisme de la réaction de glycation.....	44
2.5.2	Caractérisation des produits avancés de glycation.....	46
2.5.3	Fonctions biologiques et physiologiques des AGE .....	47
2.5.4	Implication des AGE dans la physiopathologie de l'arthrose .....	49
<b>3</b>	<b>Partie in vitro</b> .....	<b>51</b>

---

<b>3.1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>51</b>
3.2.1	Culture des chondrocytes articulaires humains .....	51
3.2.1.1	Prélèvements des échantillons de cartilage.....	51
3.2.1.2	Isolement des chondrocytes .....	53
3.2.1.3	Mise en culture.....	53
3.2.1.4	Arrêt de la culture .....	54
3.2.2	Dosages biochimiques.....	55
3.2.2.1	Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase .....	55
3.2.2.2	Quantification de l'acide désoxyribonucléique .....	55
3.2.2.3	Analyse d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés dans le surnageant de culture multicouches de chondrocytes humains primaires .....	56
3.2.3	Analyses statistiques .....	57
<b>3.3</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>57</b>
3.3.1	Analyse d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés dans le surnageant de culture multicouches de chondrocytes humains primaires .....	57
<b>3.4</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>Partie in vivo</b> .....	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>65</b>
4.2.1	Population.....	65
4.2.2	Mesure du poids des animaux.....	66
4.2.3	Prélèvements sanguins .....	66
4.2.4	CatWalk XT .....	66
4.2.5	Euthanasie.....	69
4.2.6	Prélèvements post-mortem .....	69
4.2.7	Analyse histologique des biopsies.....	71
4.2.7.1	Décalcification et inclusion en paraffine .....	71
4.2.7.2	Coloration à la safranine-O/fast green.....	72
4.2.7.3	Coloration au bleu de toluidine.....	73
4.2.8	Evaluations histologiques du cartilage.....	73
4.2.9	Evaluations histologiques de la membrane synoviale.....	74
4.2.10	Analyse par indentométrie.....	75
4.2.10.1	Cartographie automatique en indentation.....	77
4.2.10.2	Cartographie automatique de l'épaisseur .....	77
4.2.10.3	Traitement de l'information.....	78
4.2.11	Analyse d'acides aminés et de protéines glyqués, oxydés et nitrés dans le sérum des cobayes.....	79
4.2.12	Analyses statistiques .....	80
<b>4.3</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>81</b>
4.3.1	Hébergement et évolution du poids .....	81

---

4.3.2	CatWalk XT .....	82
4.3.2.1	Vitesse moyenne de déplacement .....	82
4.3.2.2	Vitesse de propulsion.....	83
4.3.2.3	Longueur de la foulée .....	84
4.3.2.4	Surface de l’empreinte .....	85
4.3.2.5	Base de soutien.....	86
4.3.3	Evaluations histologiques du cartilage.....	87
4.3.3.1	Score global .....	87
4.3.3.2	Score des compartiments condyles fémoraux et plateau tibial .....	88
4.3.3.3	Score des compartiments médial et latéral .....	89
4.3.4	Evaluations histologiques de la membrane synoviale.....	90
4.3.4.1	Score global .....	90
4.3.4.2	Analyse des critères.....	91
4.3.5	Mach-1.....	92
4.3.6	Analyse d’acides aminés et de protéines glyqués, oxydés et nitrés dans le sérum des cobayes.....	95
<b>4.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>103</b>
<b>5</b>	<b>Partie humaine.....</b>	<b>111</b>
<b>5.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>111</b>
<b>5.2</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>111</b>
5.2.1	Population.....	111
5.2.2	Analyse des échantillons de sérum des patients .....	112
5.2.3	Analyses statistiques .....	113
<b>5.3</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>113</b>
<b>5.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>139</b>

---

## Liste des abréviations

AASA	: Semialdéhyde alpha-amino adipique
AASAL	: Anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente
ADAMTS	: <i>A desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AGE	: Produits avancés de glycation ( <i>Advanced Glycation Endproducts</i> )
AGG	: Agrécan
AH	: Acide hyaluronique
ARN	: Acide ribonucléique
AT	: Anaphylatoxine
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
BSP	: <i>Bone sialoprotein</i>
ChM-1	: Chondromoduline-1
C2C	: <i>Collagen type II cleavage</i>
CEL	: N $\epsilon$ - carboxyéthyl-lysine
CM	: Cell-associated matrix
CMA	: N $\epsilon$ -carboxyméthyl-arginine
CML	: N $\epsilon$ -carboxyméthyl-lysine
COMP	: Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX	: Cyclooxygénase
CP	: Protéines citrunillées
CS	: Chondroïtine sulfate
CTX-II	: <i>C-telopeptide of type II collagen</i>
3DG-H	: 3 désoxyglucosone
DAMPs	: <i>Damage-associated molecular proteins</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DUOX	: Dual oxidase
EASIA	: <i>Enzyme Amplified Sensitivity ImmunoAssay</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FAO	: Formes activées de l'oxygène

---

FBLN3	:	Fibuline-3
FL	:	N $\epsilon$ -fructosyl-lysine
FRM	:	Further Removed Matrix
GAG	:	Glycosaminoglycane
GDF	:	<i>Growth Differentiation Factor</i>
G-H1	:	Hydroimidazolone dérivée du glyoxal
GSA	:	Semialdéhyde glutamique
GSP	:	Glucosepane
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Peroxyde d'hydrogène
HEPES	:	N- (2- hydroxyéthyl) pipérazine (2-ethanesulfonic acid)
HPRT	:	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HRP	:	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hyp	:	Hydroxyproline
IFN $\gamma$	:	Interféron gamma
IGF-1	:	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IL	:	Interleukine
IL-1Ra	:	Antagoniste du récepteur à l'IL-1
KS	:	Kératane sulfate
MetSO	:	Sulfoxyde de méthionine
MG	:	Méthylglyoxal
MG-H1	:	Hydroimidazolone dérivée du méthylglyoxal
MMP	:	Métalloprotéase matricielle
NF	:	<i>Nuclear factor</i>
NFK	:	N-formylkynurénine
NO	:	Oxyde nitrique
3-NT	:	3- nitrotyrosine
O <sub>2</sub>	:	Oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	Anion superoxyde
OA	:	<i>Osteoarthritis</i>
OARSI	:	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
ONOO <sup>-</sup>	:	Peroxynitrite

p	:	p-valeur
PAI	:	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS	:	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCNA	:	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	:	<i>Platelet Derivated Growth Factor</i>
PENT	:	Pentosidine
PG	:	Protéoglycane
PGE <sub>2</sub>	:	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PTHrP	:	<i>Parathyroid hormone related protein</i>
RAGE	:	<i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
RANKL	:	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
ROS	:	Espèces actives de l'oxygène
SEM	:	Erreur type
STC1	:	Stanniocalcine 1
TACE	:	TNF $\alpha$ converting enzyme
TIMP	:	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF $\alpha$	:	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
TSP-1	:	Thrombospondine-1
VEGF	:	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## **Unités de mesure**

cm/sec	: centimètre par seconde
g	: gramme
h	: heure
Hz	: hertz
kg	: kilogramme
L	: litre
M	: molaire
MDa	: mégadalton
mg	: milligramme
min	: minute
ml	: millilitre
mM	: millimolaire
mm	: millimètre
mm <sup>2</sup>	: millimètre carré
mm <sup>3</sup>	: millimètre cube
MPa	: mégapascal
ng	: nanogramme
nM	: nanomolaire
Pa	: pascal
pg	: picogramme
sec	: seconde
µg	: microgramme
µl	: microlitre
µM	: micromolaire
µm	: micromètre
°C	: degré Celsius
%	: pourcent



## Index des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure générale d'une articulation synoviale selon Marieb et al. [4].	3
<b>Figure 2 :</b> Structure du cartilage articulaire. Modifié de Heinen [16]. Quatre couches sont décrites dans le cartilage articulaire adulte selon le type et l'orientation des fibrilles de collagène, la quantité de protéoglycanes et d'eau ainsi que la forme et l'activité des chondrocytes.	5
<b>Figure 3 :</b> Représentation schématique de l'organisation moléculaire de la matrice extracellulaire du cartilage selon Heinegard et al. [22]. AH= Acide hyaluronique ; CILP = Cartilage Intermediate Layer Protein-1 ; COMP = Cartilage Oligomeric Matrix Protein ; CS : Chondroïtine Sulfate ; KS = Kératane Sulfate ; NC = domaine non collagénique ; PRELP = Proline-arginine-Rich End Leucine-rich repeat Protein.	6
<b>Figure 4 :</b> Structure d'une molécule d'agrécane. Elle est formée d'une protéine axiale sur laquelle se fixent des glycosaminoglycanes : le sulfate de kératane (KS) et le sulfate de chondroïtine (CS). G = domaine globulaire et IGD = domaine inter-globulaire. D'après Hardingham et al. [24].	7
<b>Figure 5 :</b> Représentation schématique des compartiments de la matrice extracellulaire du cartilage selon Sobol et al. [30].	9
<b>Figure 6 :</b> Coupe histologique du cartilage articulaire et d'os colorée à l'hématoxyline et à la safranine-O/vert lumière selon Henrotin et al. [32]. (Grossissement 10x).	10
<b>Figure 7 :</b> Photographie de l'ultrastructure des deux types de synoviocytes de l'intima d'une membrane synoviale de rat. Adapté d'après Iwagana et al. [36]. A= synoviocytes de type A ; B= synoviocytes de type B.	12
<b>Figure 8 :</b> Structure chimique de l'acide hyaluronique. Adapté d'après Khan et al. [40].	13
<b>Figure 9 :</b> Représentation planétaire de l'arthrose selon Henrotin [60].	16
<b>Figure 10 :</b> Pourcentage de la population souffrant d'arthrose, selon le sexe et l'âge, en Belgique [65]. Le pourcentage de personnes arthrosiques augmente avec l'âge. Pour une même tranche d'âge, le pourcentage de femmes atteintes d'arthrose est plus important que le pourcentage d'hommes arthrosiques.	18
<b>Figure 11 :</b> Modifications structurelles du cartilage arthrosique selon Pritzker et al. [93], modifié par Oprenyeszk 2015 [3]. A : perte du contenu en PG. B. Présence de fibrillations. C. Apparition de fissures, les étoiles indiquent les clones. D. Erosion, les flèches mauves montrent la « tidemark », les étoiles indiquent les clones. E. Dénudation, seul l'os sous-chondral est visible.	22

- Figure 12 :** Représentation des boucles cartilagino-cartilagineuse, ostéo-cartilagineuse et synovio-cartilagineuse selon Y. Henrotin (2016), modifié par Comblain [46]. ADAMTS = a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; AGG = agrécan; IL = interleukine ; MMP = métalloprotéase matricielle ; NF- $\kappa$ B = nuclear factor  $\kappa$ B ; NO = oxyde nitrique ; TNF = tumor necrosis factor ; PGE<sub>2</sub> = prostaglandine E<sub>2</sub>; RANKL = receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; VEGF = vascular endothelial growth factor..... 26
- Figure 13 :** Rôle des DAMPs dans la pathogenèse de l'arthrose. Modifié d'après Rosenberg et al. [137]. ..... 30
- Figure 14 :** IL-1 $\beta$  au cœur de la balance entre facteurs anaboliques et cataboliques au cours de l'arthrose. IL : interleukine ; IL1Ra : antagoniste du récepteur à l'IL-1 ; TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase ; IGF : Insulin-like growth factor ; TGF : Transforming growth factor ; Coll II : collagène de type II ; PG : protéoglycane ; PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub> ; NO : monoxyde d'azote ; iNOS : Forme inductible de la NO synthase. D'après Laadhar et al. [9]. ..... 32
- Figure 15 :** Schéma représentatif de la physiopathologie de l'arthrose d'après Comblain [46]. Les facteurs écrits en gras sont ceux qui sont augmentés lors du développement d'arthrose. Les flèches représentent une stimulation. Les éclairs représentent une dégradation. Les lignes représentent une inhibition. ADAMTS = agrécanase ; AGG = agrécan ; bFGF = basic fibroblast growth factor ; BSP = bone sialoprotein ; ChM-1 = chondromoduline-1 ; COX-2 = cyclooxygénase-2 ; IL = interleukine ; iNOS = synthase induite d'oxyde nitrique ; MMP = métalloprotéase matricielle ; NO = oxyde nitrique ; PG : protéoglycane ; PGE<sub>2</sub> = prostaglandine E<sub>2</sub> ; STC1 = stanniocalcine 1 ; TNF = tumor necrosis factor, TSP-1= thrombospondine-1 ; TIMP = inhibiteur de métalloprotéase matricielle ; VEGF = vascular endothelial growth factor..... 34
- Figure 16 :** Recommandations de l'OARSI pour le traitement non-chirurgical de l'arthrose. Adapté de McAlindon et al. [178] par Comblain [46]. AINS = anti-inflammatoires non-stéroïdiens ; COX-2 = cyclooxygénase 2. .... 37
- Figure 17 :** Représentation pyramidale des traitements pour la prise en charge de la gonarthrose et leurs limitations. Adapté d'après Clegg et al. [179]. AASAL = anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente ; AH = acide hyaluronique ; AINS = anti-inflammatoires non-stéroïdiens ; IA = injection intra articulaire. .... 38
- Figure 18 :** Place des marqueurs biologiques dans le diagnostic de l'arthrose [181] . .... 40

<b>Figure 19</b> : Un aperçu des biomarqueurs solubles dérivés du cartilage. Modifié de Henrotin et al. [32].	42
<b>Figure 20</b> : Schéma général représentant les principales modifications des protéines.	43
<b>Figure 21</b> : Les différentes étapes de la réaction de Maillard. Adapté d'après Hartog et al. [196].	44
<b>Figure 22</b> : Structures d'AGE caractérisées <i>in vivo</i> selon Ahmed et al. ; Thorpe et al. [212, 213].	47
<b>Figure 23</b> : Représentation schématique du protocole réalisé sur les chondrocytes humains.	54
<b>Figure 24</b> : Concentrations des produits de glycation dans le surnageant de culture multicouches. Valeurs cumulées $\pm$ SEM. *= $p<0,05$ , **= $p<0,01$ .	58
<b>Figure 25</b> : Concentrations des produits d'oxydation dans le surnageant de culture multicouches. Valeurs cumulées $\pm$ SEM. *= $p<0,05$ .	59
<b>Figure 26</b> : Valeurs cumulées du produit de nitration 3-NT dans le surnageant de culture multicouches $\pm$ SEM de deux cultures indépendantes. *= $p<0,05$ , **= $p<0,01$ , ***= $p<0,001$ .	60
<b>Figure 27</b> : Schéma illustrant le cycle de perturbations cellulaires induites par l'accumulation d'AGE dans la matrice. AGE = Advanced Glycation Endproducts ; MEC = matrice extracellulaire ; MMP = métalloprotéase matricielle ; RAGE = Receptor for advanced glycation endproducts ; ROS = espèces réactives de l'oxygène.	62
<b>Figure 28</b> : Résumé du plan de l'étude.	66
<b>Figure 29</b> : Illustration du système CatWalk XT [261].	67
<b>Figure 30</b> : Illustration d'un exemple de marche satisfaisante [261]. Initial contact, Stand + swing = step cycle.	68
<b>Figure 31</b> : Principaux paramètres de mesure étudiés sur la CatWalk XT [261] . LH = Left Hind ; RH = Right Hind.	69
<b>Figure 32</b> : Schéma illustrant les différentes étapes de la dissection du genou droit.	70
<b>Figure 33</b> : Compartiments de l'articulation du genou [3].	71
<b>Figure 34</b> : (A) Plan de coupe de l'articulation du genou du cobaye. (B) Série de quatre sections prises à des intervalles de 200 $\mu$ m dans le plan coronal. Adapté de Kraus et al. [257].	72
<b>Figure 35</b> : Représentation du testeur mécanique Mach-1 (Biomomentum, Canada).	76
<b>Figure 36</b> : Illustration de la cartographie automatique en indentation. Le Mach-1 possède 3 axes et il utilise trois composantes de déplacement pour fournir un déplacement perpendiculaire sur la base de l'orientation de la surface. Adapté de Sim et al. [260].	77

<b>Figure 37 :</b> Illustration de la cartographie automatique de l'épaisseur. L'indenteur sphérique est remplacé par une aiguille. Une petite augmentation de charge (*) est observée lorsque l'aiguille atteint la surface articulaire. Ensuite, une forte augmentation de la charge (**) est observée lorsque l'aiguille atteint l'os sous-chondral. Adapté de Sim et al. [260].	78
<b>Figure 38 :</b> Evolution du poids des cobayes tout au long de l'étude.	82
<b>Figure 39 :</b> Vitesse moyenne de déplacement dans chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, ** = $p < 0,01$ , One-way ANOVA avec post-test de TUKEY.	83
<b>Figure 40 :</b> Vitesse de propulsion dans chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, * = $p < 0,05$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.	84
<b>Figure 41 :</b> Longueur de la foulée dans chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, *** = $p < 0,001$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.	85
<b>Figure 42 :</b> Surface de l'empreinte dans chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, * = $p < 0,05$ ; ** = $p < 0,01$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.	86
<b>Figure 43 :</b> Base de soutien dans chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, **** = $p < 0,0001$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.	86
<b>Figure 44 :</b> Images représentatives du compartiment médial de l'articulation droite des cobayes de chaque groupe au fil du temps. Coloration Safranine-O / fast green / hématoxyline, grossissement de 4x.	87
<b>Figure 45 :</b> Score histologique global attribué à chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, * = $p < 0,05$ , ** = $p < 0,01$ , **** = $p < 0,0001$ , One-way ANOVA avec post-test de TUKEY.	88
<b>Figure 46 :</b> Score histologique des compartiments condyles fémoraux et plateau tibial du cartilage attribué à chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, * = $p < 0,05$ , ** = $p < 0,01$ , *** = $p < 0,001$ , **** = $p < 0,0001$ , One-way ANOVA avec post-test de TUKEY.	89
<b>Figure 47 :</b> Score histologique des compartiments médial et latéral du cartilage attribué à chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, * = $p < 0,05$ , ** = $p < 0,01$ , *** = $p < 0,001$ , **** = $p < 0,0001$ , one-way ANOVA avec post-test de TUKEY.	90
<b>Figure 48 :</b> Score histologique global de la membrane synoviale attribué chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, ** = $p < 0,01$ , One-way ANOVA avec post-test TUKEY.	91
<b>Figure 49 :</b> Score histologique détaillé des différents critères de la membrane synoviale attribué à chaque groupe. Moyenne $\pm$ SEM, * = $p < 0,05$ , ** = $p < 0,01$ , *** = $p < 0,001$ , one-way ANOVA avec post-test de TUKEY.	92

- Figure 50 :** Distribution de l'épaisseur (condyles fémoraux et plateau tibial) du cartilage attribuée à chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; one-way ANOVA avec post-test de TUKEY. .... 93
- Figure 51 :** Distribution du module instantané (condyles fémoraux et plateau tibial) du cartilage dans chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; one-way ANOVA avec post-test de TUKEY. .... 94
- Figure 52:** Distribution de l'épaisseur et du module instantané (condyles fémoraux et plateau tibial) du cartilage (côté médial vs côté latéral) attribuée à chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; t de Student. .... 95
- Figure 53 :** Concentrations sériques d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés dans le modèle d'arthrose spontanée chez le cobaye. (A) FL, (B) MG-H1, (C) G-H1, (D) CMA, (E) 3DG-H, (F) GSP, (G) CML et (H) CEL, (I) MetSO, (J) AASA, (K) GSA, (L) DT, (M) NFK, (N) 3-NT, (O) Hydroxyproline. Moyenne  $\pm$  SEM (nM). Significativité : \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; One-way ANOVA avec post-test de TUKEY. Représentation des « heat maps » des taux sériques des acides aminés (P) et de protéines (Q) glyqués, oxydés et nitrés. .... 96



## Index des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification des phénotypes cliniques de l'arthrose selon Bijlsma et al. [61].	17
<b>Tableau 2 :</b> Variation des propriétés de la composition du liquide synovial chez un individu sain et arthrosique [3].	25
<b>Tableau 3 :</b> Classification de l'arthrose selon quatre sous-phénotypes. Modifié de McAlindon et al. [178].	36
<b>Tableau 4:</b> Classification des lésions du cartilage articulaire selon Moskovitz et al. [235].	52
<b>Tableau 5 :</b> Evaluations histologiques des modifications du cartilage selon Kraus et al. [257].	73
<b>Tableau 6 :</b> Scores histologiques pour l'évaluation de la membrane synoviale selon Kraus et al. [257]	75
<b>Tableau 7 :</b> Traitement des données pour les propriétés mécaniques en indentation. (A) Epaisseur (B) Module instantané. Adapté de Sim et al. [260]	79
<b>Tableau 8 :</b> Corrélation entre les acides aminés glyqués, oxydés et nitrés et l'hydroxyproline. Corrélations statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) après une correction de Bonferroni de 15.	99
<b>Tableau 9 :</b> Corrélation des acides aminés glyqués, oxydés et nitrés et des protéines citrullinées (CP) avec le score histologique global. Les coefficients de corrélation en gras sont statistiquement significatifs. * Coefficient de corrélation significatif après application d'une correction de Bonferroni de 15.	100
<b>Tableau 10 :</b> Analyse de corrélation des produits de glycation, d'oxydation et de nitration avec les propriétés mécaniques du cartilage analysées par le Mach-1. * Coefficient de corrélation significatif après application d'une correction de Bonferroni de 15.	102
<b>Tableau 11 :</b> Critères d'inclusion des patients de l'étude.	112
<b>Tableau 12 :</b> Concentrations plasmatiques du glucosepane chez les patients atteints d'arthrose et d'autres maladies arthritiques.	113
<b>Tableau 13 :</b> Résultat de l'algorithme prédictif (moyenne avec 95% d'intervalle de confiance).	115



## 1 Objectifs généraux

L'arthrose est une pathologie chronique invalidante d'origine multifactorielle dont l'impact socio-économique est important. Actuellement, son diagnostic repose principalement sur l'examen clinique et la radiographie standard.

A ce jour, il n'y a aucun moyen de détecter la maladie à un niveau moléculaire, avant l'apparition des symptômes et des changements structurels rendus visibles par l'imagerie médicale. Ainsi, une alternative intéressante est la mesure de marqueurs biologiques dans le sang, l'urine ou le liquide synovial, qui pourraient refléter des changements métaboliques dans les tissus articulaires, et par conséquent, l'apparition de la maladie, sa progression ou encore l'efficacité d'un traitement.

Dans ce contexte, les modèles animaux sont pertinents pour étudier le stade précoce de l'arthrose et mettre en évidence les changements métaboliques précoces se produisant dans les tissus articulaires.

Dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques, l'Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage (UROC, Arthropôle Liège, ULg) en collaboration avec l'Université de Warwick (Warwick Systems Biology, Clinical Sciences Research Laboratories), s'est intéressée aux structures biochimiques dénommées "*Advanced Glycation Endproducts*", encore appelées produits avancés de glycation (AGE). Récemment, il a été proposé que ces structures jouent un rôle dans la pathogenèse de l'arthrose [1].

Les objectifs de notre travail étaient :

- d'étudier *in vitro* la production des produits de glycation, d'oxydation et de nitration par les chondrocytes humains cultivés en multicouches.
- d'étudier les corrélations entre les produits de glycation, d'oxydation et de nitration et la sévérité des lésions histologiques (score OARSI), les propriétés mécaniques du cartilage (MACH-1) et la locomotion (CatWalk) chez le cobaye Dunkin- Hartley, développant spontanément de l'arthrose.

## **2 Introduction générale**

### **2.1 L'articulation synoviale**

#### **2.1.1 Anatomie**

Une articulation se définit comme l'ensemble des éléments par lesquels les os s'unissent les uns aux autres [2, 3]. On peut distinguer les articulations en fonction de leur structure, d'une part en comparant les tissus qui unissent les os ou d'autre part selon la présence ou l'absence d'une cavité articulaire. Les articulations seront cartilagineuses (par ex. au niveau intervertébral, entre la première côte et le manubrium sternal), fibreuses (par ex. sutures entre les os du crâne), ou enfin synoviales (par ex. au niveau du genou) [4].

L'articulation synoviale (Figure 1), à laquelle appartient la majorité des articulations du corps humains (par ex. épaule, coude, genou, hanche) est un organe remarquable par sa fonction, sa résistance et par la manière dont tous les tissus qui le constituent interagissent entre eux [3, 5].

Elle permet aux os de s'articuler les uns avec les autres, offrant une grande liberté de mouvements aux membres. Ce type d'articulation se caractérise par la présence d'une capsule articulaire entourant la cavité articulaire, laquelle est remplie d'une substance, appelée synovie ou plus communément liquide synovial. Un manchon fibreux, résistant et flexible compose la couche externe de cette capsule. La membrane synoviale, qui est un tissu constitué de tissu conjonctif lâche, tapisse l'intérieur de la capsule articulaire et circonscrit, avec le cartilage articulaire, le volume de la cavité articulaire. Le cartilage articulaire repose sur l'os sous-chondral. L'articulation est stabilisée par des ligaments latéraux mais également par des ligaments intra-articulaires et des ménisques [4].

Les propriétés et le rôle qu'assurent chacun de ces tissus sont indispensables pour assurer la fonction et l'intégrité de l'articulation. Une défaillance serait source de douleur ou de handicap.

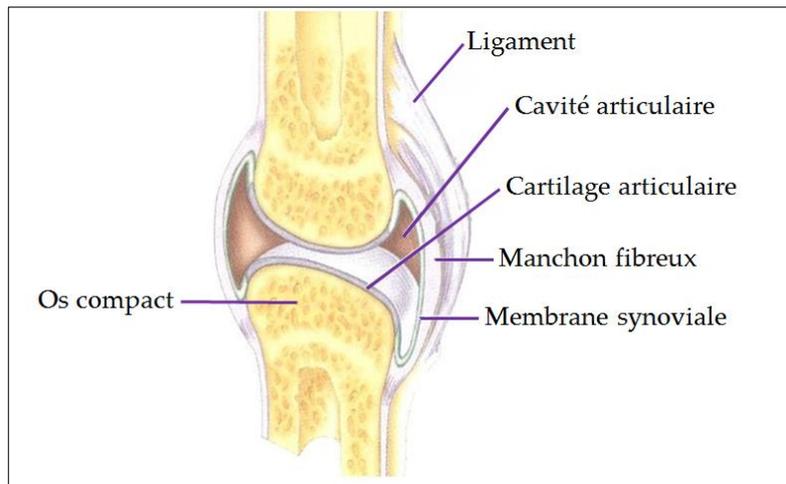


Figure 1 : Structure générale d'une articulation synoviale selon Marieb et al. [4].

## 2.1.2 Le cartilage articulaire

### 2.1.2.1 Caractéristiques et physiologie

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hautement spécialisé, issu des cellules mésenchymateuses, qui possède plusieurs particularités structurelles et fonctionnelles. Il est dépourvu de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et d'innervation. Le cartilage ne contient qu'un seul type de cellules, les chondrocytes. Ces derniers, hautement différenciés sont responsables de la synthèse et du renouvellement de la matrice extracellulaire du cartilage [6, 7].

Au sein de l'articulation, le cartilage est en contact par sa couche la plus profonde avec l'os sous-chondral et par sa couche la plus superficielle avec le liquide synovial qui assure sa nutrition [8]. A l'état adulte, le cartilage est un tissu extrêmement quiescent dont les cellules se divisent très peu [9].

Ses fonctions principales sont de participer à la transmission, à la répartition et à l'amortissement des contraintes mécaniques exercées sur l'articulation [10]. Parce qu'il n'est pas innervé, il permet des mouvements indolores.

Macroscopiquement, le cartilage articulaire normal est un tissu blanc, brillant, légèrement translucide, d'épaisseur variant de 2 à 7 mm [9].

### 2.1.2.2 Architecture générale

Le cartilage articulaire est composé de différentes couches qui diffèrent entre elles essentiellement par des critères biochimiques (teneur en protéoglycanes) et anatomiques (disposition des fibres de collagène) [11]. Communément, quatre couches successives sont décrites de la superficie du cartilage jusqu'à l'interface cartilage/os sous- chondral (Figure 2) [12] :

- La couche superficielle, épaisse de 4 à 8  $\mu\text{m}$ , est en contact avec le liquide synovial. Elle est composée de chondrocytes aplatis qui synthétisent la lubriline. Cette glycoprotéine a pour fonction de lubrifier et de diminuer le coefficient de friction au niveau de la surface articulaire lors du mouvement [13]. Cette couche est relativement pauvre en protéoglycanes comparée aux zones moyenne et profonde mais est riche en fibronectine et en eau.

Les fibrilles de collagène de type I et III sont abondantes et disposées parallèlement à la surface articulaire. Grâce à la disposition du réseau de collagènes, la couche superficielle du cartilage offre une résistance aux tractions [14].

- La couche intermédiaire ou moyenne représente 40 à 45 % de la hauteur totale du cartilage. Les chondrocytes y sont volumineux et sphériques. Cette couche est formée de fibres de collagène qui s'entrecroisent pour former un réseau. La teneur en protéoglycanes est importante par rapport à la couche superficielle [11, 14].
- La couche profonde ou radiale est composée d'épaisses fibrilles de collagène qui sont disposées perpendiculairement à la surface du cartilage. Cette zone présente 40 à 45% de l'épaisseur totale du cartilage. Dans ce réseau de fibrilles de collagène, on retrouve des chondrocytes de forme sphérique disposés en colonnes. Cette couche est la plus riche en protéoglycanes et la densité cellulaire y est la plus faible [11].
- La couche calcifiée occupe 5 à 10% de la hauteur totale et sert de zone d'ancrage du cartilage à l'os sous- chondral. Elle est pauvre en protéoglycanes et les chondrocytes moins nombreux conservent leur orientation radiale. La zone basophile nommée « *tidemark* » sépare la couche calcifiée du cartilage non calcifié [14, 15].

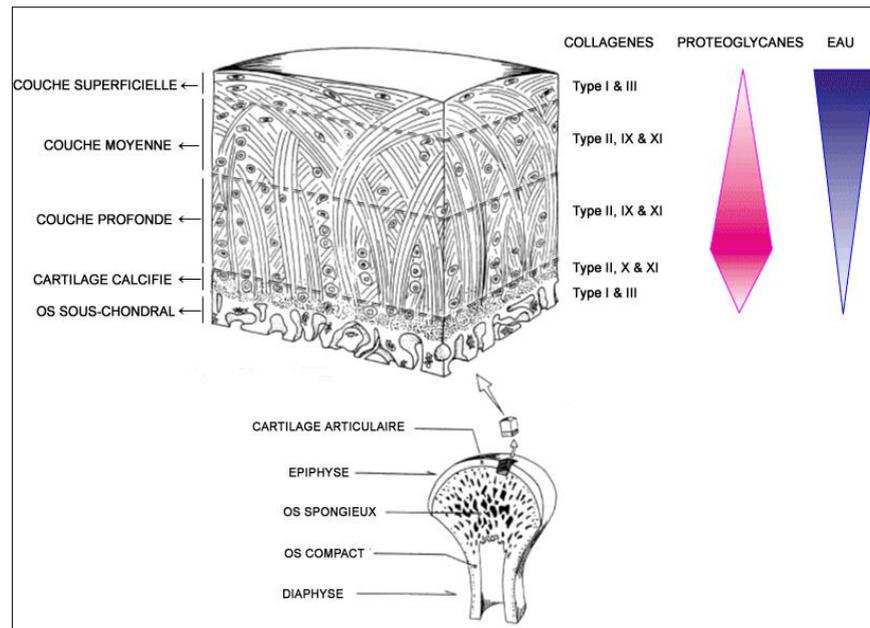


Figure 2 : Structure du cartilage articulaire. Modifié de Heinen [16]. Quatre couches sont décrites dans le cartilage articulaire adulte selon le type et l'orientation des fibrilles de collagène, la quantité de protéoglycanes et d'eau ainsi que la forme et l'activité des chondrocytes.

### 2.1.2.3 Les cellules

Le cartilage articulaire est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes. De forme sphérique ou ovoïde, ils occupent seulement 1 à 10% de l'ensemble du volume du cartilage mais la densité cellulaire varie selon le type d'articulation, la couche dans laquelle ils se trouvent ainsi que l'âge de l'individu [11]. La couche superficielle est la couche présentant le plus grand nombre de chondrocytes. Leur nombre diminue avec l'âge et ce dès 20 ans [17]. Bien qu'étant toujours métaboliquement actifs, on estime que les chondrocytes cessent de se diviser après l'adolescence [17].

En raison du caractère avasculaire du cartilage, le chondrocyte utilise le glucose en tant que principal substrat énergétique privilégiant la voie de la glycolyse anaérobie. Le glucose dégradé par cette voie est ensuite converti en glucosamine, constituant majeur des protéoglycanes [18].

En condition physiologique, les chondrocytes maintiennent l'homéostasie du tissu, en assurant un équilibre dynamique entre la synthèse et le renouvellement de la matrice extracellulaire [6].

### 2.1.2.4 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du cartilage est composée d'un réseau de fibres de collagène et d'une substance fondamentale riche en protéoglycanes. La composition biochimique de la matrice définit les propriétés mécaniques du cartilage. En effet, fortement hydraté et non minéralisé, le cartilage a un comportement viscoélastique. De telles propriétés lui permettent d'absorber les pressions auxquelles il est soumis [11, 19, 20].

#### a. Composants de la matrice

La matrice extracellulaire du cartilage est composée majoritairement d'eau (65 à 70 % du poids total du cartilage), de molécules d'agrécan (10 % du poids frais ; 90 % des protéoglycanes du cartilage) et de collagène (10 à 20 % du poids frais) ainsi que d'autres molécules minoritaires (Figure 3). Elle est également riche en cations qui se fixent sur les groupements sulfate des protéoglycanes [21].

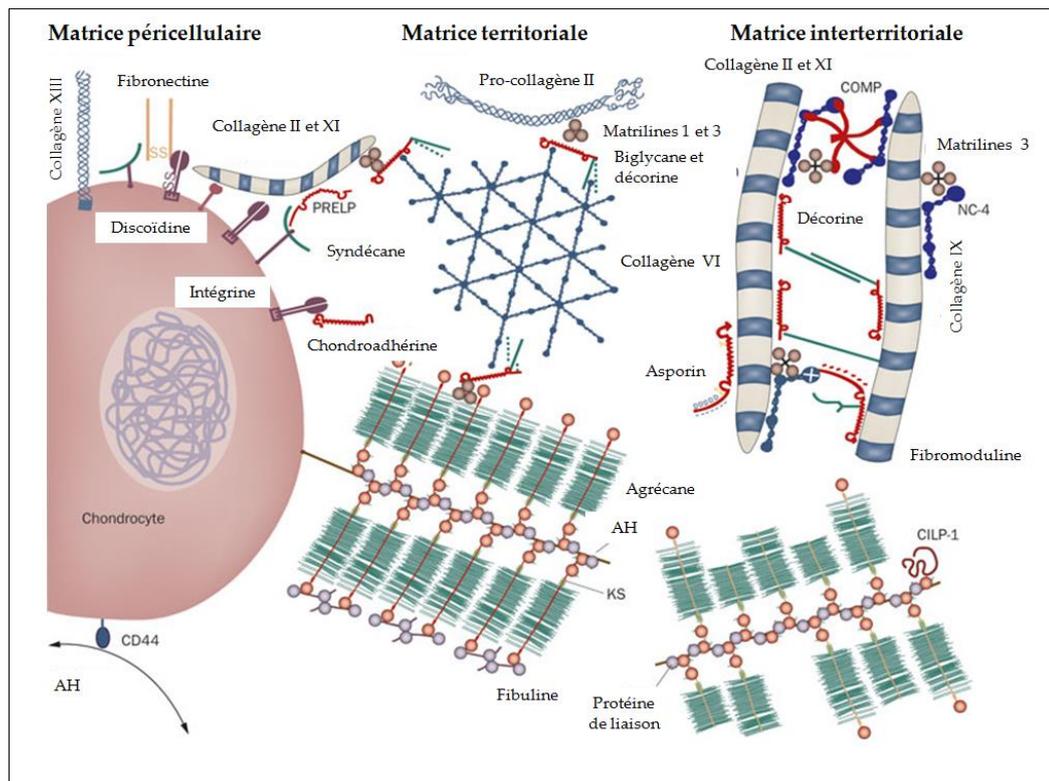


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire de la matrice extracellulaire du cartilage selon Heinegard *et al.* [22]. AH = Acide hyaluronique ; CILP = Cartilage Intermediate Layer Protein-1 ; COMP = Cartilage Oligomeric Matrix Protein ; CS : Chondroïtine Sulfate ; KS = Kératane Sulfate ; NC = domaine non collagénique ; PRELP = Proline-arginine-Rich End Leucine-rich repeat Protein.

L'eau est un composant majeur du tissu cartilagineux. Elle est attirée à l'intérieur de la matrice grâce aux propriétés hydrophiles des protéoglycanes. Elle est présente également sous forme libre, permettant le transport des nutriments et l'évacuation des déchets métaboliques [7].

Les **protéoglycanes** (PGs) sont des macromolécules composées d'une protéine axiale sur laquelle se fixe(nt), par des liaisons covalentes, une ou plusieurs chaîne(s) de glycosaminoglycanes (GAGs).

Parmi les GAGs du cartilage, on retrouve l'acide hyaluronique (AH), le sulfate de chondroïtine (CS), le kératane sulfate (KS), l'héparane sulfate et le dermatane sulfate. On distingue deux types de protéoglycanes dans le cartilage articulaire : les agrécane capables de se lier à l'acide hyaluronique pour former des complexes de haut poids moléculaire et les protéoglycanes de petite taille dits « mineurs » [23].

- L'agrécane (AGG) constitue 90 % des protéoglycanes du cartilage articulaire. Elle est formée d'une protéine axiale également appelée « *core protein* » sur laquelle se fixent une centaine de chaînes de sulfate de chondroïtine et une trentaine de chaînes de sulfate de kératane (Figure 4). La protéine axiale se lie de façon non covalente avec l'acide hyaluronique. Une petite glycoprotéine de liaison (*link protein*) assure la stabilité de l'association entre les monomères de protéoglycanes et l'acide hyaluronique [11].

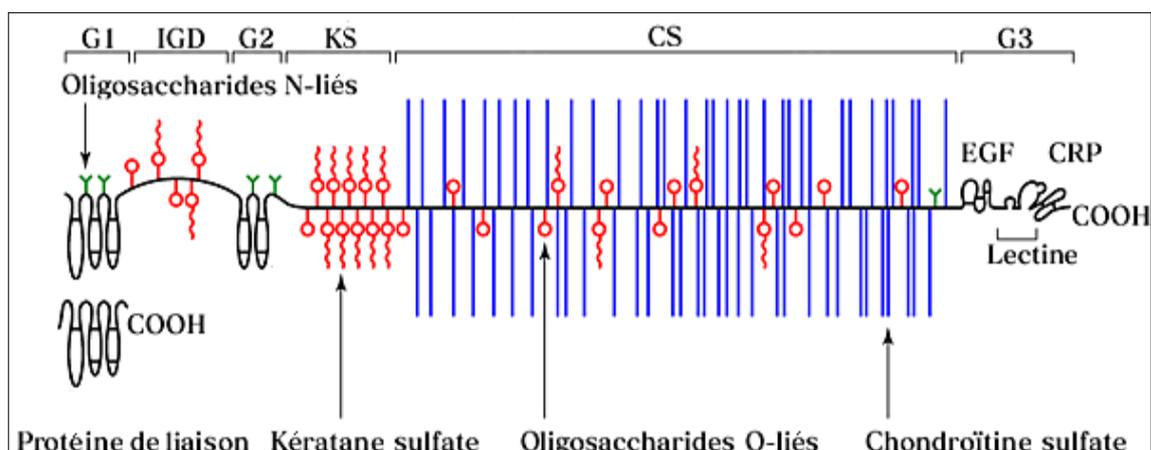


Figure 4 : Structure d'une molécule d'agrécane. Elle est formée d'une protéine axiale sur laquelle se fixent des glycosaminoglycanes : le sulfate de kératane (KS) et le sulfate de chondroïtine (CS). G = domaine globulaire et IGD = domaine inter-globulaire. D'après *Hardingham et al.* [24].

- La décorine, la fibromoduline ou encore le biglycane font partie des protéoglycanes de petite taille dits « mineurs ». Ces derniers partagent une même protéine porteuse centrale (core protein) mais diffèrent par la qualité et la quantité de leurs GAGs. Le biglycane est formé de deux chaînes de dermatane sulfate alors que la décorine n'est formée que d'une seule chaîne. La fibromoduline est quant à elle constituée de plusieurs chaînes de KS. Ces petits protéoglycanes participent à la formation et à la stabilisation de la matrice extracellulaire [23].

La matrice extracellulaire du cartilage est constituée d'un réseau tridimensionnel de **fibres de collagène**. Le collagène de type II est le collagène majoritaire du tissu cartilagineux. Les fibrilles de collagène de type II interagissent entre elles mais également avec les collagènes IX et XI, les protéoglycanes et d'autres protéines afin de former le réseau tridimensionnel du cartilage.

Le collagène de type VI est présent à la surface du cartilage et intervient dans l'ancrage des chondrocytes au sein de la matrice [25]. Le collagène de type IX a pour fonction de connecter entre elles les différentes fibrilles stabilisant ainsi le réseau tridimensionnel de collagène [26]. Le collagène de type X, impliqué dans la minéralisation, se dépose au voisinage des chondrocytes hypertrophiques et des chondrocytes du cartilage calcifié [27]. Le collagène de type XI, d'organisation fibrillaire, est quant à lui présent à l'intérieur des fibrilles de collagène de type II. Il régule l'organisation tridimensionnelle des fibrilles et leur diamètre [11].

Les fibres de collagène sont en permanence soumises à une tension induite par la circulation de l'eau et par les frictions générées par les mouvements. La qualité de ces fibres est donc primordiale afin d'assurer le maintien de l'intégrité cartilagineuse [28].

Outre les différents collagènes et protéoglycanes que nous venons de détailler, la matrice extracellulaire contient diverses protéines non collagéniques responsables des interactions entre macromolécules ainsi qu'entre chondrocytes et macromolécules. Parmi ces protéines, on retrouve l'anchorine, protéine d'ancrage des cellules aux fibrilles de collagène de la matrice ; la fibronectine, responsable de l'adhésion des cellules à la surface de la matrice extracellulaire ou encore la *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), protéine interagissant avec les fibrilles de collagène [29].

### b. Les différents compartiments de la matrice

En fonction de la distance qui sépare la matrice extracellulaire des chondrocytes, l'organisation ainsi que la composition de celle-ci varient. On distingue trois types de matrices, dénommées matrice péri-cellulaire, matrice territoriale et matrice interterritoriale (Figure 5).

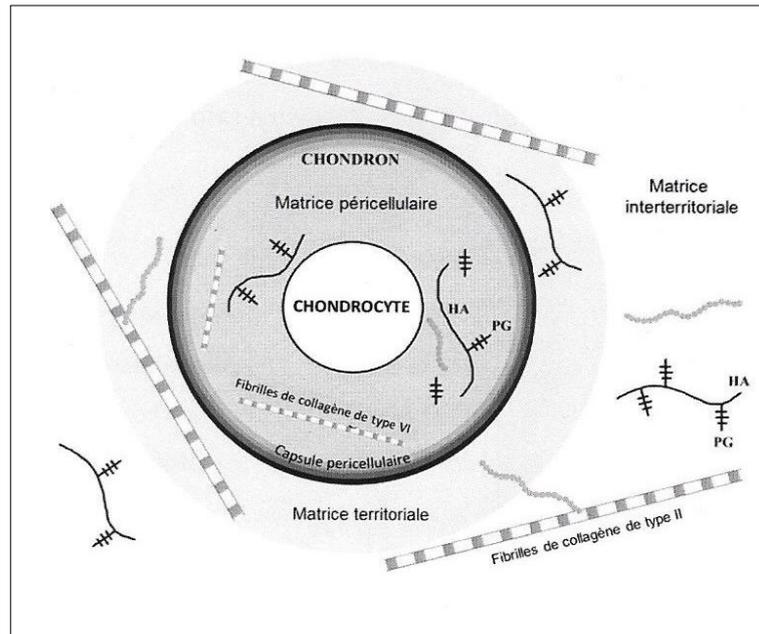


Figure 5 : Représentation schématique des compartiments de la matrice extracellulaire du cartilage selon Sobol et al. [30].

#### ❖ La matrice péri-cellulaire ou matrice lacunaire

Cette matrice est adjacente à la membrane des chondrocytes. De pH acide, elle est caractérisée par la présence d'une grande quantité de protéoglycanes ainsi que d'acide hyaluronique.

On y retrouve également des molécules non collagéniques telles que la fibronectine et l'anchorine. C'est par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires, principalement des intégrines, que ces protéines adhèrent à la membrane cellulaire[11].

#### ❖ La matrice territoriale

Elle enveloppe la matrice péri-cellulaire et est riche en fibrilles de collagène, principalement de type II et VI. Ces fibrilles forment une capsule autour d'un chondrocyte ou d'un groupe de chondrocytes [7, 15]. Les chondrocytes établissent des contacts avec la

matrice territoriale, notamment par de nombreuses extensions cytoplasmiques riches en microfilaments [20].

❖ La matrice interterritoriale

Il s'agit de la matrice la plus éloignée de la membrane cellulaire du chondrocyte. Elle représente la partie la plus volumineuse de l'environnement du chondrocyte. Elle est riche en collagènes fibrillaires (de type II, IX et XI) et en agrécan [7].

### 2.1.3 L'os sous-chondral

Le cartilage articulaire repose sur une partie osseuse nommée os sous-chondral. Son épaisseur varie généralement entre 0,1 et 2 mm. Elle peut atteindre 3 mm dans les régions à fortes contraintes mécaniques. Ainsi, comme illustré à la Figure 6, l'os sous-chondral juxtapose le plateau osseux sous-chondral et le segment de l'os trabéculaire sous-jacent. Le plateau osseux sous-chondral est constitué d'os cortical, poreux et vascularisé. Pareille composition permet des échanges entre l'os et le cartilage. En association avec la couche calcifiée du cartilage, le plateau osseux sous-chondral forme un ensemble fonctionnel appelé plaque ostéochondrale (Figure 6) [31].

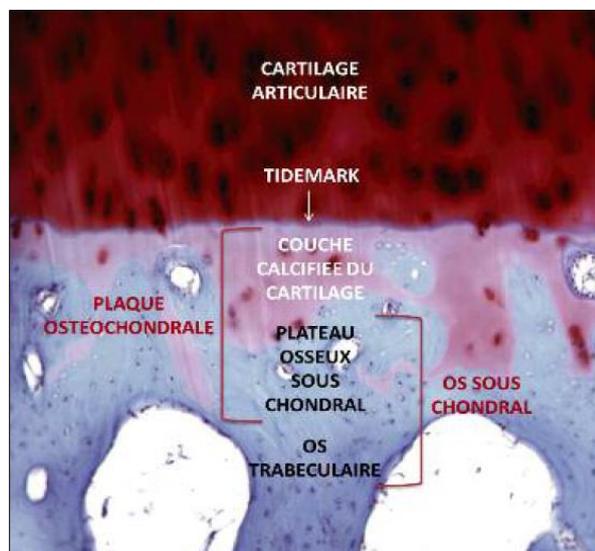


Figure 6 : Coupe histologique du cartilage articulaire et d'os colorée à l'hématoxyline et à la safranine-O/vert lumière selon Henrotin *et al.* [32]. (Grossissement 10x).

Les principales fonctions de l'os sous-chondral sont (1) d'absorber les contraintes mécaniques exercées sur l'articulation, (2) de servir de support au cartilage sus-jacent (3) et

d'assurer une partie des apports nutritifs du cartilage [33]. Les vaisseaux sanguins terminaux du plateau sous-chondral sont directement en contact avec la couche profonde du cartilage [34]. Cette organisation fournit 50 % des besoins du cartilage en oxygène et en glucose [33].

#### 2.1.4 La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu conjonctif vascularisé qui tapisse la face interne de la cavité articulaire à l'exception du cartilage articulaire, des ménisques et des ligaments croisés. Elle est bordée à l'extérieur par la capsule articulaire et les formations ligamentaires. La membrane synoviale s'organise en replis surtout dans les zones où les influences mécaniques sont les plus restreintes. Par ailleurs, elle sécrète à l'intérieur de la cavité, le liquide synovial [35].

La membrane synoviale est composée de deux couches distinctes, l'*intima* et la *subintima*, se différenciant par leurs compositions cellulaires. Ces deux couches sont séparées de la capsule par un tissu conjonctif fibro-graisseux contenant peu de cellules, appelé subsynovial. La délimitation entre ces deux couches n'est pas toujours très nette.

La couche qui est en contact avec la cavité articulaire, l'*intima*, est composée d'une ou de deux rangées de cellules. Elle présente une épaisseur qui varie entre 20 et 40  $\mu\text{m}$ . Lorsque l'on observe l'*intima* au microscope électronique, on remarque que les synoviocytes se distinguent en deux types, synoviocytes de type A et synoviocytes de type B (Figure 7) [36].

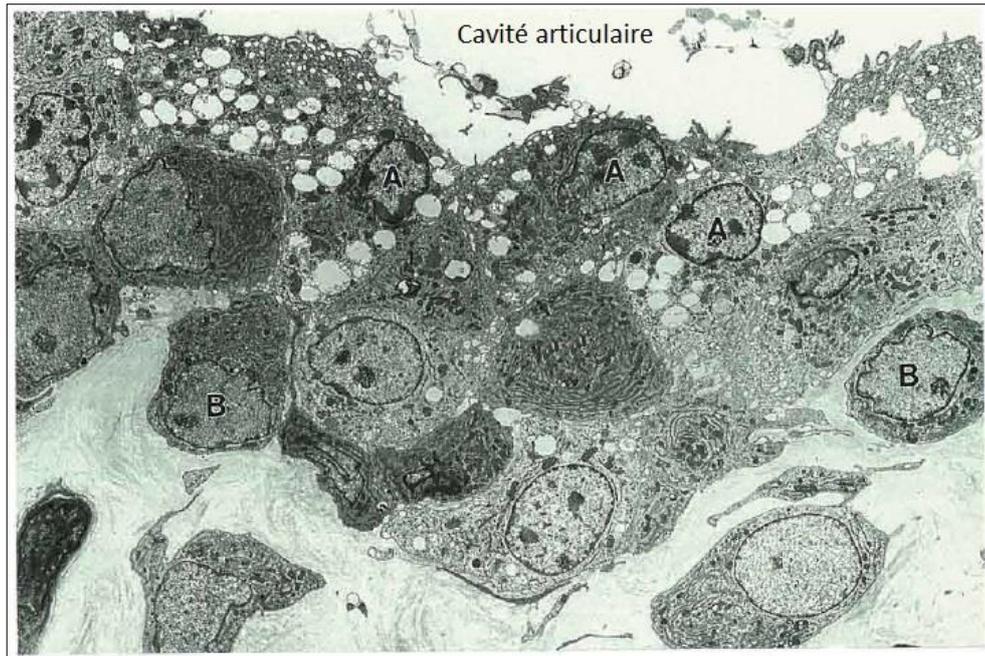


Figure 7 : Photographie de l'ultrastructure des deux types de synoviocytes de l'intima d'une membrane synoviale de rat. Adapté d'après *Iwagana et al.* [36]. A= synoviocytes de type A ; B= synoviocytes de type B.

Les synoviocytes de type A sont les plus nombreux et se situent principalement en surface. Ils partagent des propriétés communes avec les macrophages tels qu'un appareil de Golgi développé, la présence de lysosomes et de vésicules de pinocytose. En effet, ces cellules sont capables d'endocyter, de résorber des débris et de dégrader des micro-organismes présents dans le liquide synovial. Ils permettent d'épurer le liquide synovial mais aussi de maintenir un environnement intra-articulaire aseptique [37, 38].

Les synoviocytes de type B sont moins nombreux, mais plus volumineux. Ils se distribuent de manière plus homogène dans l'intima. Leur réticulum endoplasmique très développé permet aux synoviocytes de type B de présenter une importante activité de synthèse et de sécrétion des constituants du liquide synovial dont la fibronectine, les collagènes et l'AH. Ce dernier est un muco-polysaccharide de haut poids moléculaire constitué d'une longue chaîne formée d'unités disaccharidiques répétées d'acide D-glucuronique et de N-acétylglucosamine (Figure 8). L'AH contribue à la lubrification de l'articulation [36, 39].

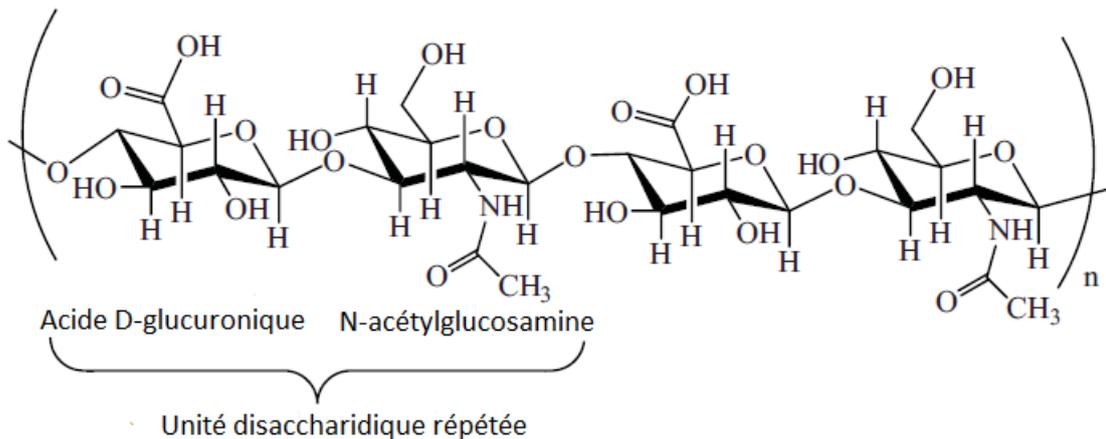


Figure 8 : Structure chimique de l'acide hyaluronique. Adapté d'après Khan *et al.* [40].

La *subintima*, couche contiguë à la capsule articulaire, est riche en cellules (fibroblastes, histiocytes, mastocytes) et en fibres de collagène. A l'inverse de l'*intima*, elle est davantage vascularisée. Elle contient des artérioles, des vaisseaux lymphatiques et, dans sa partie la plus superficielle, de très nombreux capillaires permettant un échange entre le sang et la cavité articulaire [36]. Les nutriments diffusent des capillaires synoviaux vers le liquide synovial avant d'atteindre la matrice extracellulaire du cartilage [10, 11, 41].

### 2.1.5 Le liquide synovial

Le liquide synovial est un liquide clair, d'aspect visqueux et de couleur ambrée. Dans l'articulation d'un genou humain sain, le volume de liquide synovial qu'il est possible de prélever est inférieur à 3,5 ml [42]. Son rôle principal est d'assurer la lubrification des articulations en diminuant les forces de friction exercées sur le cartilage. Le liquide synovial est caractérisé par la présence de deux molécules: l'AH et la lubricine [43]. La lubricine confère au liquide synovial son caractère lubrifiant. Quant à l'AH, il contribue aux propriétés viscoélastiques du liquide synovial. Ces propriétés dépendent de la concentration, du poids moléculaire et de la conformation du liquide synovial [44]. Ce dernier assure également des fonctions métaboliques en facilitant le transport des éléments nutritifs ainsi que d'autres molécules solubles telles que des facteurs de croissance et des cytokines [45].

### 2.1.5.1 Composition

Le liquide synovial est composé en grande majorité de protéines plasmatiques et sa composition en protéines est proche de celle du plasma. Le passage sélectif des protéines de petites tailles dans le liquide synovial est rendu possible grâce à une sélection s'opérant via la barrière synoviale. Les protéines présentes dans le liquide synovial reflètent donc les propriétés de filtration de la membrane synoviale [46].

La protéine la plus abondante du liquide synovial est l'albumine, suivie par les globines  $\alpha$  et  $\beta$ . Une très faible quantité de protéines de poids moléculaire plus élevé comme le fibrinogène est également présente [47]. Dans le liquide synovial, l'AH se retrouve sous forme d'une chaîne de disaccharides dont le poids moléculaire moyen est compris entre 6 et 7 MDa [48]. Ce dernier contribue à la viscosité du fluide synovial. La lubricine, glycoprotéine du liquide synovial synthétisée par les synoviocytes, par les chondrocytes mais également par les fibroblastes des ménisques et des ligaments croisés, exerce une fonction importante. Elle assure la lubrification au niveau des couches superficielles du cartilage articulaire et diminue les frictions entre surfaces cartilagineuses [13].

Des cytokines pro ou anti-inflammatoires et des facteurs de croissance sont présents au sein du liquide synovial et ciblent tant les synoviocytes que les chondrocytes. Ces médiateurs sont soit sécrétés ou produits par les chondrocytes, synoviocytes ainsi que d'autres cellules constitutives des différents tissus de l'articulation, soit dérivés du plasma [45, 49].

Le liquide synovial sain contient peu de cellules, moins de deux cents leucocytes par  $\text{mm}^3$  et aucun érythrocyte n'y est comptabilisé. De plus, le fluide synovial contient des cellules souches mésenchymateuses qui possèdent des similarités avec celles de la moelle osseuse [50, 51].

## 2.2 L'arthrose

### 2.2.1 Définition et prévalence

Le terme arthrose désigne un ensemble de maladies, d'étiologies variées mais dont la sémiologie est commune. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé une définition qui englobe les principales facettes de la maladie : *“ L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale [52]”*. Plus récemment, l'Osteoarthritis Research Society International (OARSI) a actualisé cette définition en tenant compte des découvertes récentes *« l'arthrose est une affection touchant les articulations mobiles, caractérisée par un stress cellulaire et une dégradation de la matrice extracellulaire, initiés par des micro ou macro traumatismes qui activent des réponses réparatrices inadaptées impliquant les voies de l'inflammation de l'immunité innée. La maladie se manifeste initialement par des anomalies moléculaires (métabolisme anormal des tissus articulaires), qui sont suivies par des anomalies anatomiques et/ou physiologiques (dégradation du cartilage, remodelage osseux, formation d'ostéophytes, inflammation articulaire et perte de la fonction articulaire normale) pouvant aboutir à une maladie [53]»*.

On préférera parler de syndromes arthrosiques plutôt que d'arthrose au singulier en raison de la variabilité de la vitesse de la progression et de l'étiologie de la maladie. En effet, l'arthrose est classiquement subdivisée en arthrose primaire (ou idiopathique) et arthrose secondaire à divers facteurs (traumatiques, métaboliques, sénescence, congénitaux, neurologiques, endocriniens) [9].

Cette pathologie affecte l'ensemble des tissus articulaires et péri-articulaires, incluant le cartilage, l'os sous-chondral, la capsule articulaire ainsi que la membrane

synoviale [54]. On observe une lésion focale du cartilage, une réaction hypertrophique de l'os sous-chondral (ostéosclérose), la formation de géodes et d'ostéophytes principalement au bord des articulations [54, 55]. En vieillissant, le cartilage subit des remaniements, principalement marqués par une diminution du nombre de chondrocytes et par des modifications qualitatives et quantitatives des protéoglycanes [11].

L'arthrose est une maladie globale de l'articulation synoviale caractérisée par la formation d'ostéophytes, un remodelage accru de l'os sous-chondral entraînant la sclérose, une dégradation du cartilage articulaire et l'inflammation de la membrane synoviale (synovite). Les tissus péri-articulaires, tendons, muscles, ligaments, contribuent également au tableau clinique de la maladie avec la tendinopathie, la sarcopénie et la laxité ligamentaire [56, 57]. Ces altérations tissulaires sont la cause de douleurs qui vont entraîner un handicap, une kinésiophobie, elle-même responsable d'un déconditionnement physique et d'une sédentarité qui constitue probablement un facteur décisif de l'association entre l'arthrose et le syndrome métabolique, l'obésité et les pathologies cardiovasculaires [58, 59]. Enfin, l'inflammation systémique à bas bruit «*inflammaging*» secondaire à la synovite fonde le lien entre arthrose et comorbidités *via* des médiateurs pro-inflammatoires (Figure 9). Les caractéristiques radio-cliniques de l'arthrose et son association avec les comorbidités permettent de classer les patients arthrosiques selon leur phénotype post-traumatique, métabolique ou sénescence (Tableau 1).

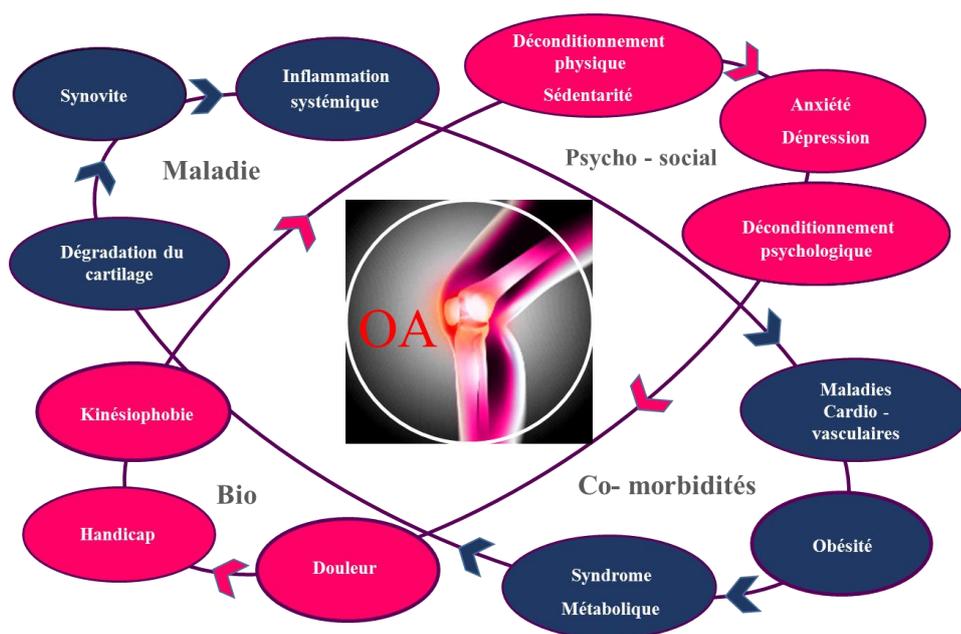


Figure 9 : Représentation planétaire de l'arthrose selon Henrotin [60].

Tableau 1 : Classification des phénotypes cliniques de l'arthrose selon *Bijlsma et al.* [61].

	Age	Facteur de causalité	Localisation
<b>Post-traumatique</b>	Jeune (< 45ans)	Stress mécanique	Genou, pouce, cheville, épaule
<b>Métabolique</b>	Moyen (45-65 ans)	Stress mécanique, adipokine, hyperglycémie, déséquilibre œstrogène/progestérone	Genou, main, généralisée
<b>Sénéscent</b>	> 65 ans	Produits terminaux de la glycation, sénescence des chondrocytes	Hanche, genou, main
<b>Génétique</b>	Variable	Mutations ou polymorphismes génétiques	Main, hanche, colonne vertébrale
<b>Douloureux</b>	Variable	Inflammation, niveau de douleur aberrant	Genou, hanche, main

L'arthrose est la maladie articulaire la plus commune dont la prévalence est considérable et augmente avec l'âge. Des études statistiques révèlent que, dans le monde, plus de 100 millions de personnes sont touchées par la gonarthrose [62]. En France, 1,9 % des hommes et 2,5 % des femmes développent une arthrose de la hanche (coxarthrose), tandis que 4,7 % des hommes et 6,6 % des femmes présentent une arthrose du genou (gonarthrose) [63]. En Belgique, selon une enquête publique menée par l'Institut Scientifique de Santé Publique (ISSP) en 2008, 8,4 % des hommes et 16,8 % des femmes déclaraient avoir souffert d'arthrose au cours des douze derniers mois. Cette affection touche davantage les personnes de 65 ans et plus. En effet, parmi nos aînés, 27,3 % des hommes de 65 ans et plus déclaraient avoir souffert d'arthrose au cours des douze derniers mois. L'arthrose était la pathologie chronique la plus souvent rapportée chez les femmes de 65 ans ou plus, une femme sur 2 (50,2 %) de cette génération étant concernée. Le pourcentage de personnes souffrant d'arthrose était significativement lié à l'âge, touchant d'ailleurs 42,6 % des personnes âgées de 75 ans et plus (Figure 10) [64].

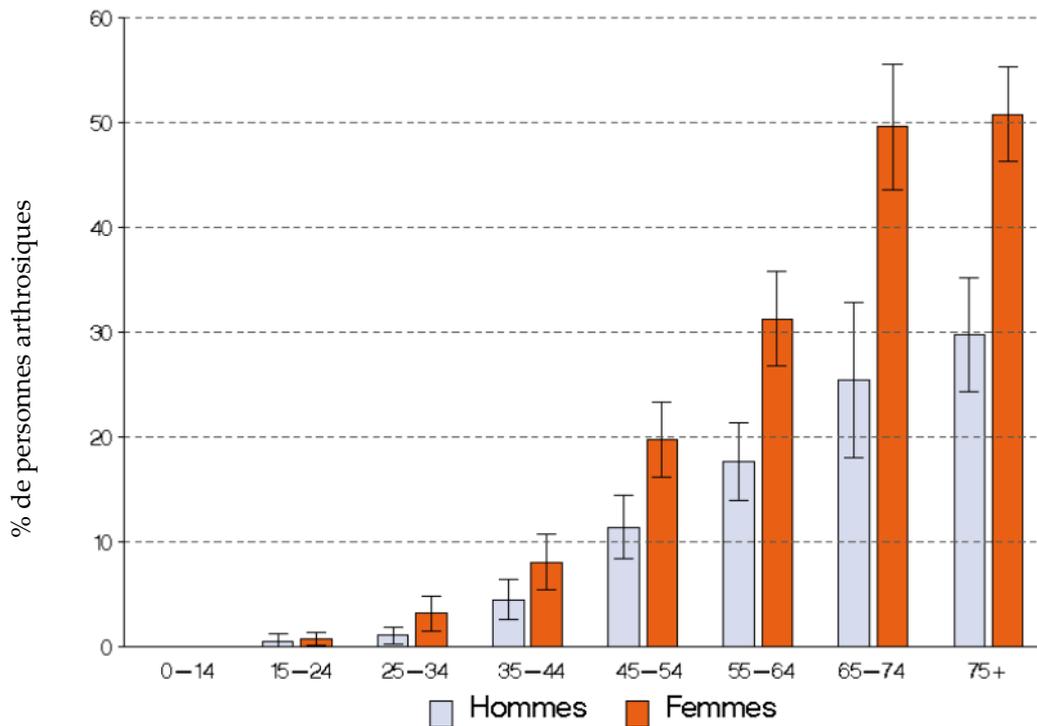


Figure 10 : Pourcentage de la population souffrant d'arthrose, selon le sexe et l'âge, en Belgique [65]. Le pourcentage de personnes arthrosiques augmente avec l'âge. Pour une même tranche d'âge, le pourcentage de femmes atteintes d'arthrose est plus important que le pourcentage d'hommes arthrosiques.

### 2.2.2 Facteurs de risque

Les facteurs de risques sont multiples et peuvent être classés en deux catégories, à savoir les facteurs endogènes et les facteurs exogènes [66].

Parmi les facteurs endogènes, on retrouve :

- ✓ le sexe. La prévalence d'arthrose sévère est plus élevée chez les femmes. Ce statut est lié aux changements hormonaux qui apparaissent lors de la ménopause [67] ;
- ✓ l'âge. La prévalence de l'arthrose augmente avec l'âge [65] ;
- ✓ les facteurs génétiques ;
- ✓ l'origine ethnique. Les Afro-américains présentent une prévalence plus élevée de développer une coxarthrose comparé aux Caucasiens [68].

En ce qui concerne les facteurs de risque exogènes, on retrouve :

- ✓ les microtraumatismes répétés liés aux activités professionnelles et physiques ;
- ✓ les actes chirurgicaux (ménisectomie) ;
- ✓ la pratique intensive de certains sports ;
- ✓ les anomalies morphologiques (inégalité de longueur de jambes, dysplasies) ;
- ✓ l'obésité. Elle représente non seulement un risque pour l'arthrose des articulations portantes mais également pour l'arthrose digitale [69, 70]. La surcharge mécanique provoquée par l'obésité est la première hypothèse logique à l'augmentation du risque d'arthrose périphérique sur l'articulation portante, à l'origine d'une destruction cartilagineuse et ligamentaire. De plus, chez les patients obèses, on observe une augmentation de la masse osseuse pouvant aboutir à une rigidité anormale de l'os sous-chondral. Outre cet aspect, la quantité anormalement élevée de tissus adipeux, produit davantage de médiateurs solubles tels que les cytokines pro-inflammatoires et des adipokines (adiponectine, résistine, visfatine et leptine) [71, 72]. Ces médiateurs interviennent dans le développement de l'arthrose. L'obésité est également à l'origine de comorbidités qui sont associés à l'arthrose [73, 74]. Le syndrome métabolique regroupe un ensemble de désordres physiologiques tels que dyslipémie, diabète de type II, hypertension, résistance à l'insuline et obésité, augmentant le risque de pathologies cardiovasculaires [75]. L'arthrose est associée au syndrome métabolique mais aussi à ses composantes individuelles. Par exemple, l'accumulation des composantes de ce syndrome est associée à une augmentation du risque de développer des lésions radiologiques d'arthrose au niveau des genoux [76]. L'association de diabète de type II et d'hypertension chez un individu en surcharge pondérale est un facteur de risque d'arthrose des mains [77].

### 2.2.3 Modifications anatomo-pathologiques

L'arthrose est un processus dynamique impliquant tous les tissus de l'articulation et également les tissus péri-articulaires. Des modifications anatomo-pathologiques particulières sont observées au niveau du cartilage, de l'os sous-chondral, de la membrane synoviale et du liquide synovial.

#### 2.2.3.1 *Au niveau du cartilage articulaire*

Au cours du processus arthrosique, un déséquilibre entre les contraintes mécaniques exercées sur le cartilage articulaire et sa capacité de résistance envers ces forces se manifeste. Ce déséquilibre intervient, soit lorsque le cartilage articulaire sain est exposé à des contraintes mécaniques anormales ou bien lorsque ces contraintes sont appliquées sur un cartilage déjà fragilisé par la perte de ses propriétés mécaniques [3, 78].

Au niveau macroscopique, le cartilage articulaire sain, qui possède un aspect blanc, lisse, brillant et légèrement translucide, devient jaunâtre et davantage opaque. De plus, divers changements structurels sont observés. La rugosité du cartilage (aspect « chair de crabe ») observée macroscopiquement est le reflet de l'apparition de fibrillations (Figure 11 B) et de fissures (Figure 11 C) au niveau de la surface articulaire. La profondeur de ces fibrillations augmente avec la sévérité de la maladie et peuvent être uniques ou ramifiées [79, 80]. Finalement, le tissu cartilagineux disparaît (Figure 11 D) sur une surface plus ou moins grande laissant l'os sous-chondral apparent (Figure 11E).

Au niveau microscopique, la densité cellulaire est modifiée. Une hyper-cellularité s'identifie par la présence d'agrégats de chondrocytes (ou clones) (Figures 11 C-D). Par contre, dans les formes sévère d'arthrose, la densité des chondrocytes diminue consécutivement à l'apoptose des cellules [81]. Dans une revue récente de littérature publiée en 2016, il a été observé que l'apoptose était associée à la dégradation du cartilage et au développement de l'arthrose [82]. Des données histologiques ont révélé une diminution de la densité cellulaire dans le cartilage arthrosique, suggérant que la mort cellulaire pourrait se produire pendant le processus arthrosique et même participer à l'apparition de l'arthrose [83]. D'autres études ont montré que l'apoptose se produisait plus fréquemment dans le cartilage arthrosique que dans le cartilage normal [84-86], et qu'il y avait une corrélation positive entre le nombre de chondrocytes apoptotiques et la

dégradation du cartilage/sévérité des lésions histologiques du cartilage [81]. Cependant, l'apoptose peut ne pas être le seul type de mort cellulaire rencontré et il est très probable que différents types de mort cellulaire (c'est-à-dire l'apoptose, la nécrose et l'autophagie) peuvent se produire indépendamment, séquentiellement et même simultanément pendant le processus arthrosique. L'autophagie quant à elle, décrit un processus cellulaire consistant en la dégradation d'un pool intracellulaire endommagé ou superflu de protéines, glucides, lipides et organites [87]. Il semble que ce processus évolue pendant la progression de l'arthrose et selon la couche de cartilage considérée [88]. Almonte-Becerril et ses collègues ont démontré que durant le stade précoce de l'arthrose, l'autophagie pourrait être activée dans le but d'éviter la mort cellulaire dans les zones superficielles et moyennes, alors qu'au stade tardif, les deux processus pourraient être activés, convergeant vers la mort cellulaire [88]. L'orientation vers le type de mort cellulaire peut dépendre de paramètres multiples tels que le stade arthrosique considéré, la couche cartilagineuse, l'intensité et la durée des stimuli, le modèle animal étudié, la situation *in vivo/in vitro* [82].

Le contenu en glycosaminoglycane de la matrice extracellulaire diminue progressivement avec la sévérité de la maladie (Figure 11 A) [89]. Des zones de minéralisation de la matrice extracellulaire peuvent apparaître [90]. Quant à la « *tidemark* », elle apparaît multipliée dans le cartilage arthrosique [91]. 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 épaississement de la couche calcifiée du cartilage. Le dédoublement de la *tidemark* serait la conséquence d'une réactivation du système d'ossification enchondrale 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* (Figure 11 D). Notons que la réplique 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 [92].

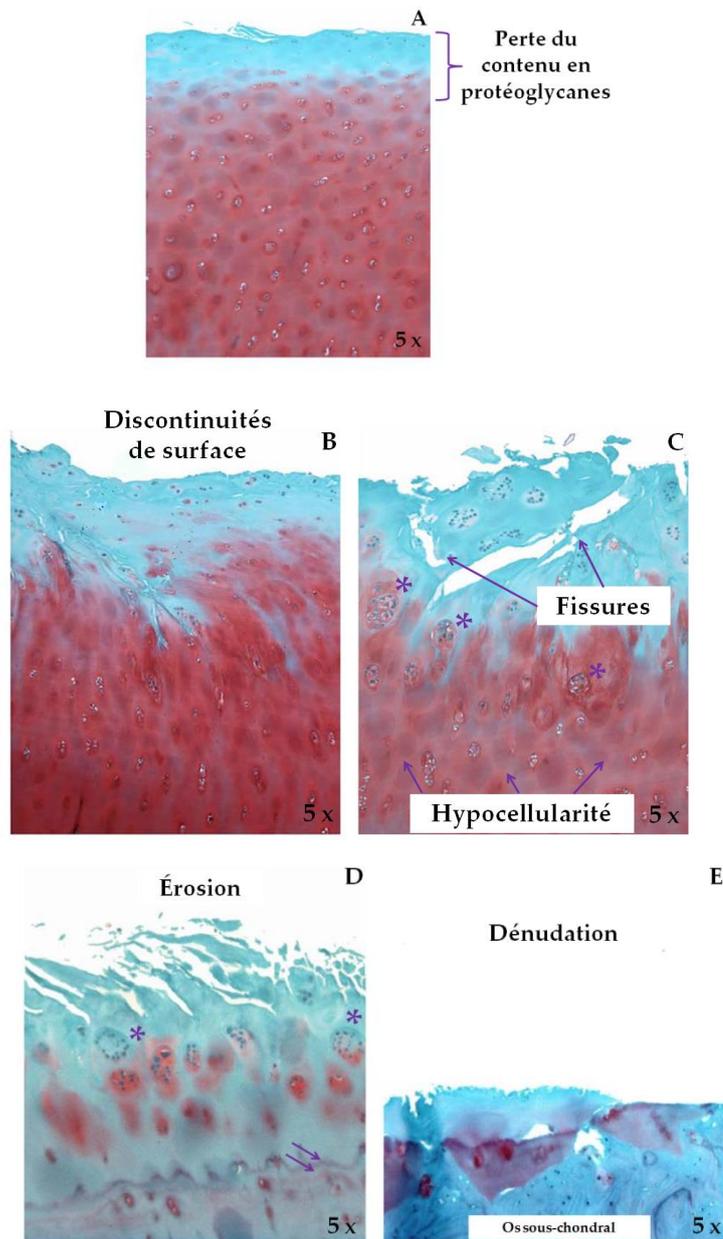


Figure 11 : Modifications structurelles du cartilage arthrosique selon *Pritzker et al.* [93], modifié par *Oprenyeszki 2015* [3]. A : perte du contenu en PG. B. Présence de fibrillations. C. Apparition de fissures, les étoiles indiquent les clones. D. Erosion, les flèches mauves montrent la « *tidemark* », les étoiles indiquent les clones. E. Dénudation, seul l'os sous-chondral est visible.

### 2.2.3.2 Au niveau de l'os sous-chondral

Afin d'assurer le maintien de l'intégrité cellulaire, le cartilage articulaire interagit avec l'os sous-chondral. Ce dernier joue un rôle capital dans la pathogenèse de l'arthrose [94]. En effet, lorsque les ostéoblastes de l'os sous-chondral sont soumis à de fortes contraintes mécaniques, ils expriment un phénotype pro-inflammatoire et un phénotype

pro-angiogénique qui contribuent aux changements structurels observables dans l'os sous-chondral arthrosique [95].

Dans les stades précoces d'arthrose, l'os sous-chondral subit un remodelage accru. Il en résulte une augmentation de l'épaisseur du plateau osseux sous-chondral, ce phénomène appelé sclérose de l'os sous-chondral, est caractérisé par l'accumulation de substance ostéoïde [96]. La sclérose osseuse est associée à un épaississement des travées osseuses et de la plaque ostéochondrale, à l'augmentation de la porosité du plateau osseux et à une diminution locale de la minéralisation de l'os et donc de sa rigidité [97]. Les ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral expriment un phénotype particulier, différent 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[98]. La formation d'excroissances osseuses, les ostéophytes sont également observables en radiographie. Ces derniers apparaissent aux extrémités de l'articulation [99]. Par ailleurs, des lésions semblables à des œdèmes sont observables en résonance magnétique nucléaire au niveau de la moelle osseuse et de l'os trabéculaire [100]. Au niveau du genou arthrosique, l'apparition de kystes intra-osseux à contenu liquidien fibreux ou nécrotique sont visibles en regard des lésions cartilagineuses, dans les régions où les contraintes mécaniques sont les plus importantes [101]. Au contraire, du côté opposé, une ostéopénie est souvent observée [102].

### 2.2.3.3 *Au niveau de la membrane synoviale*

La synoviale arthrosique est le siège de l'inflammation, appelée synovite, secondaire à la dégradation du cartilage. Elle s'amorce en regard des lésions cartilagineuses pour s'étendre par la suite à l'ensemble de la membrane synoviale [3, 46, 103].

Les modifications caractéristiques de 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 mononucléées (lymphocytes, monocytes/macrophages) dans le tissu épaissi par du tissu fibreux [104-106]. La membrane

synoviale normalement plane adopte une architecture papillaire ou villositaire. L'hypertrophie de l'*intima* est secondaire à l'augmentation du nombre de synoviocytes de type A qui s'organisent en couches multiples avec un dépôt fibreux. En effet, la fibrose de la synoviale est un processus commun, essentiellement observée dans les étapes tardives de l'arthrose [104, 107]. Au niveau de la *subintima*, une augmentation de la densité vasculaire mais aussi la présence d'un infiltrat cellulaire sont parfois observés [108]. L'infiltrat est formé de cellules mononucléées (monocytes/macrophages, lymphocytes T, lymphocytes B). De plus, le dépôt de fragments de débris articulaires (cartilage ou os) au niveau la membrane synoviale peut être à l'origine d'une réaction inflammatoire à corps étranger. Généralement plus importante dans les formes sévères d'arthrose, l'inflammation de la membrane synoviale peut aussi être observée dans les stades précoces de la progression de la maladie[109].

En comparant des biopsies de membrane synoviale prélevées chez des patients arthrosiques dans les zones normales/réactives ou zones enflammées, Lambert et ses collègues ont montré que les biopsies synoviales des zones enflammées (I) exprimaient un phénotype pro-inflammatoire. En effet, la production d'IL-6 et d'IL-8 était significativement plus élevée dans la zone I comparée à celle de la zone normale/réactive (N/R). De plus, les cellules synoviales de la zone I produisaient davantage de VEGF et moins de TSP-1 comparées à celles de la zone N/R. L'expression des facteurs pro-angiogéniques par les cellules synoviales étaient stimulées par l'IL-1 $\beta$ . Les biopsies de membrane synoviale des zones I exprimaient donc un phénotype pro-angiogénique [110].

#### 2.2.3.4 *Au niveau du liquide synovial*

Au cours de l'arthrose, la composition et les propriétés du liquide synovial sont modifiées. Par conséquent, la qualité du liquide est affectée. En effet, ses propriétés viscoélastiques sont amoindries et dès lors, son rôle de lubrification et d'absorption des contraintes mécaniques est fortement altéré, entraînant une accélération du processus d'érosion mécanique du cartilage.

La concentration des protéines dans le liquide synovial est en augmentation. En raison de la modification des propriétés de filtration de la membrane synoviale au cours du processus arthrosique, des protéines plasmatiques de haut poids moléculaire, tel que le fibrinogène, franchissent la barrière et se retrouvent dans le liquide synovial en quantité anormalement élevée [47]. La quantité des métalloprotéases matricielles (MMP) ainsi que des cytokines est augmentée alors que la concentration en AH est diminuée [111]. L'AH est dégradé par les formes activées de l'oxygène et les hyaluronidases [112, 113]. Parmi les centaines de hyaluronidases existantes, c'est principalement l'hyaluronidase-2 qui est présente au niveau des articulations[114]. L'activité biologique des molécules d'AH de plus petites tailles est différente de l'activité des chaînes natives de haut poids moléculaire. En effet, les molécules d'AH composées de chaînes comprenant 25 à 50 disaccharides possèdent une activité pro-inflammatoire, immunogène et angiogénique [115, 116] (Tableau 2).

Tableau 2 : Variation des propriétés de la composition du liquide synovial chez un individu sain et arthrosique [3].

Propriétés et composition du liquide synovial	Individu sain	Individu arthrosique	Variation
Volume (ml)	0,5 à 2	> 3,5	↗
AH (mg/ml)	2 à 4	< 2	↘
Poids moléculaire de l'AH (MDa)	4 à 6	< 4	↘
Lubricine (mg/l)	0,24	0,15	↘
Protéines totales (mg/l)	19 à 28	28 à 60	↗
Leucocytes (/mm <sup>3</sup> )	< 200	< 2000	↗
Neutrophiles (% de leucocytes)	10	> 25	↗
Module d'élasticité (Pa à 2,5 Hz)	± 100	± 8	↘
Module de viscosité (Pa à 2,5 Hz)	± 45	± 5	↘
Viscosité au repos (Pa.s)	2 à 40	0,1 à 1	↘

## 2.2.4 Physiopathologie de l'arthrose

Au cours de l'arthrose, on observe un déséquilibre entre les phénomènes de dégradation et les tentatives de réparation [117]. De nombreuses modifications principalement au niveau des tissus osseux, synoviaux et cartilagineux sont observées. Les facteurs biochimiques impliqués dans l'initiation et la progression de l'arthrose exercent leurs activités biologiques au sein de trois boucles pathologiques. Il s'agit des boucles physiopathologiques cartilagino-cartilagineuse, ostéo-cartilagineuse et synovio-cartilagineuse (Figure 12). Le chondrocyte occupe une position centrale et joue un rôle primordial dans l'ensemble de ces mécanismes physiopathologiques [118].

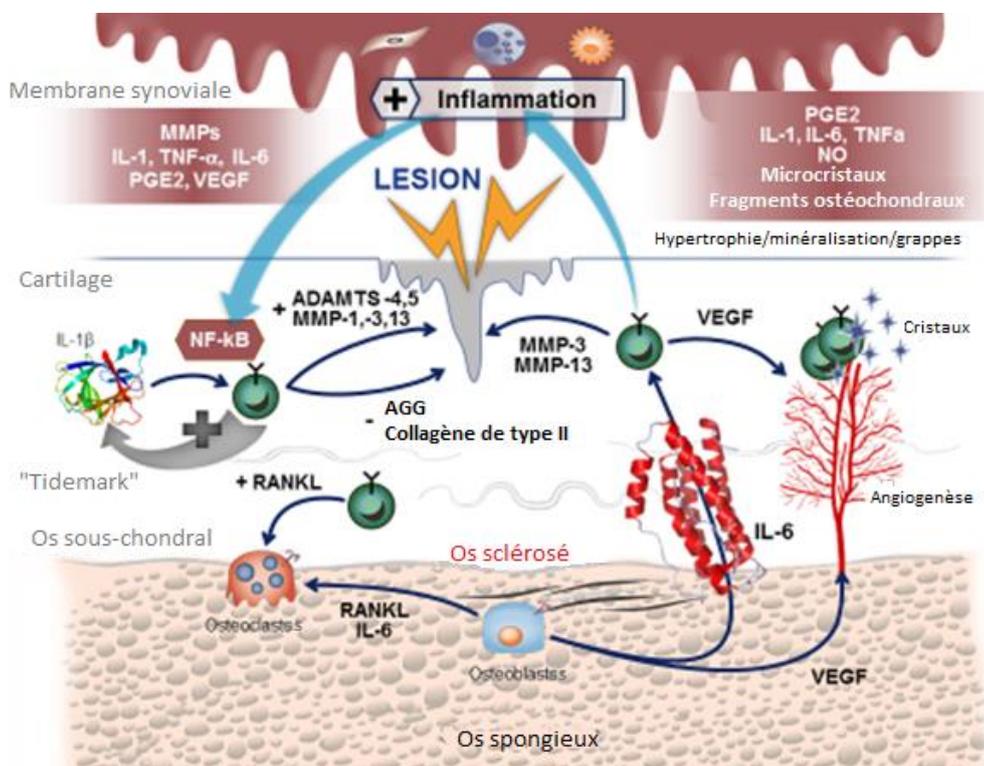


Figure 12: Représentation des boucles cartilagino-cartilagineuse, ostéo-cartilagineuse et synovio-cartilagineuse selon Y. Henrotin (2016), modifié par Comblain [46]. ADAMTS = *a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*; AGG = agrécan; IL = interleukine ; MMP = métalloprotéase matricielle ; NF- $\kappa$ B = nuclear factor  $\kappa$ B ; NO = oxyde nitrique ; TNF = *tumor necrosis factor* ; PGE<sub>2</sub> = prostaglandine E<sub>2</sub>; RANKL = *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; VEGF = *vascular endothelial growth factor*.

#### 2.2.4.1 Boucle cartilagino-cartilagineuse

La boucle cartilagino-cartilagineuse se déroule en plusieurs étapes qui sont plus ou moins imbriquées mais qui sont néanmoins distinctes par le phénotype des chondrocytes. En effet, selon leur localisation et l'évolution de la pathologie, les chondrocytes peuvent exprimer des phénotypes différents. Dans une première phase qualifiée d'anabolique, en réponse à une lésion au niveau du cartilage qui peut être induite par une lésion mécanique, les chondrocytes vont être stimulés. C'est le phénotype qualifié d'« anabolique ». Les chondrocytes subissent des modifications métaboliques et morphologiques [78]. Ils se divisent, prolifèrent, forment des agrégats (« *clusters* ») et synthétisent de manière abondante des composants de la matrice comme l'agrécan et les PG de petite taille, ou le collagène de type II [119-121]. Ils produisent également des facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  et l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF)-1 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-10) [9]. Cette phase est considérée comme une tentative du cartilage à réparer les lésions initiales de la matrice.

Dans les stades plus avancés de la maladie, une réponse catabolique s'ajoute à la réponse anabolique et se traduit par l'augmentation de la synthèse des enzymes protéolytiques par les chondrocytes. Il s'agit du phénotype « catabolique ». Le chondrocyte arthrosique sécrète dans son environnement immédiat des cytokines dont l'IL-1 $\beta$  qui stimule la production de quantités accrues de MMP par les chondrocytes, favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire [119]. C'est la boucle cartilagino-cartilagineuse (Figure 12).

Pour terminer, la prolifération excessive des chondrocytes des couches superficielles et intermédiaires va aboutir à leur dédifférenciation. Ces chondrocytes dits « hypertrophiques » forment des *clusters* cellulaires pouvant se composer de plus de vingt cellules et se caractérisent par la production de phosphatase alcaline tissu non spécifique (PA), de collagène de type X [122, 123], mais également par l'expression de *parathyroid hormone related protein* (PTHrP) [124], d'annexines [125] et de molécules de la minéralisation [126]. Ce processus de différenciation hypertrophique s'accompagne également d'une minéralisation de la matrice extracellulaire, d'un épaissement de la couche calcifiée du cartilage mais également de la multiplication de la *tidemark* et désigne le phénomène d'ossification endochondrale, responsable de la rigidité du cartilage [103].

#### 2.2.4.2 Boucle ostéo-cartilagineuse

L'arthrose met en œuvre une atteinte précoce de l'os sous-chondral, avec une modification rapide du renouvellement osseux. Il s'agit de la sclérose de l'os sous-chondral, caractérisée par un épaississement de l'os cortical sous-chondral [127]. L'implication de l'os sous-chondral dans la pathogenèse des lésions cartilagineuses connaît plusieurs origines qui restent controversées [128]. L'épaississement observé au niveau de l'os sous-chondral influence la répartition des contraintes mécaniques exercées sur le cartilage qui est à l'origine d'une dégradation accentuée de ce dernier [129, 130]. De plus, les modifications de la vascularisation de l'os sous-chondral peuvent également induire ou modifier l'évolution du processus arthrosique [127]. En effet, la découverte de l'existence de structures permettant la communication de médiateurs solubles entre l'os sous-chondral et le cartilage (microfractures, canaux vasculaires, vaisseaux sanguins) suggèrent un rôle de l'unité biomécanique os-cartilage dans le développement de l'arthrose [127, 131, 132].

Grâce à l'utilisation d'un modèle original de co-culture ostéoblastes/chondrocytes, une étude menée en 2005 par *Sanchez et al.*, a montré que les ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral contribuaient à la dégradation du cartilage [133]. En effet, les ostéoblastes des zones sclérosées, contrairement aux ostéoblastes des zones non-sclérosées, stimulaient les chondrocytes afin de produire davantage de MMP (MMP-3 et -13), inhibaient la synthèse d'AGG mais également de collagène de type II [133]. Ces observations démontrent la présence d'une communication entre le cartilage et l'os sous-chondral, et suggèrent que des facteurs provenant de l'os sous-chondral soient impliqués dans la dégradation du cartilage [103, 133] (Figure 12).

#### 2.2.4.3 Boucle synovio-cartilagineuse

Le processus arthrosique s'accompagne d'une inflammation de la membrane synoviale. Cette inflammation est consécutive à la libération dans le liquide synovial de débris ostéo-cartilagineux, de produits de dégradation matriciel mais également de microcristaux [134]. Le chondrocyte arthrosique participe également à l'induction du phénomène inflammatoire en produisant des quantités anormalement élevées de facteurs biochimiques tels que des cytokines, des prostanoides ou encore des formes activées de

l'oxygène (FAO). En réponse à la libération de ces médiateurs de l'inflammation par les chondrocytes, les synoviocytes vont être stimulés et sécrèteront à leur tour des enzymes stimulant la synthèse de molécules impliquées dans le catabolisme du cartilage et qui s'attaquent à la couche superficielle du cartilage [106]. Dès lors, un cercle vicieux s'installe entre le cartilage et la membrane synoviale, responsable de la dégénérescence du cartilage (Figure 12).

La présence accrue de motifs moléculaires associés aux dégâts, encore appelés DAMPs (*damage-associated molecular proteins*) dans les articulations arthrosiques suggère que ces molécules jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrose [135, 136]. Les DAMPs représentent un groupe hétérogène de molécules libérées dans de nombreuses circonstances comme la nécrose, une réaction inflammatoire, un traumatisme, ou une infection [135, 137]. Les membres importants de ce groupe sont les protéines intracellulaires (*high-mobility group box 1* - HMGB1), de la matrice extracellulaire (alarmines S100A8 et S100A9), et des molécules non protéiques (ATP, acide urique et ADN). La fixation des AGE sur le « *receptor for advanced glycation endproducts* » RAGE stimule des voies de signalisation comportant une activation des MAP kinases et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6 ou le TNF $\alpha$  et de MMP, responsables de la dégradation du cartilage (Figure 13) [137]. L'activation du récepteur RAGE avec ses ligands augmente donc l'expression du récepteur et déclenche une boucle de rétrocontrôle positif et l'installation d'un cercle vicieux cellulaire.

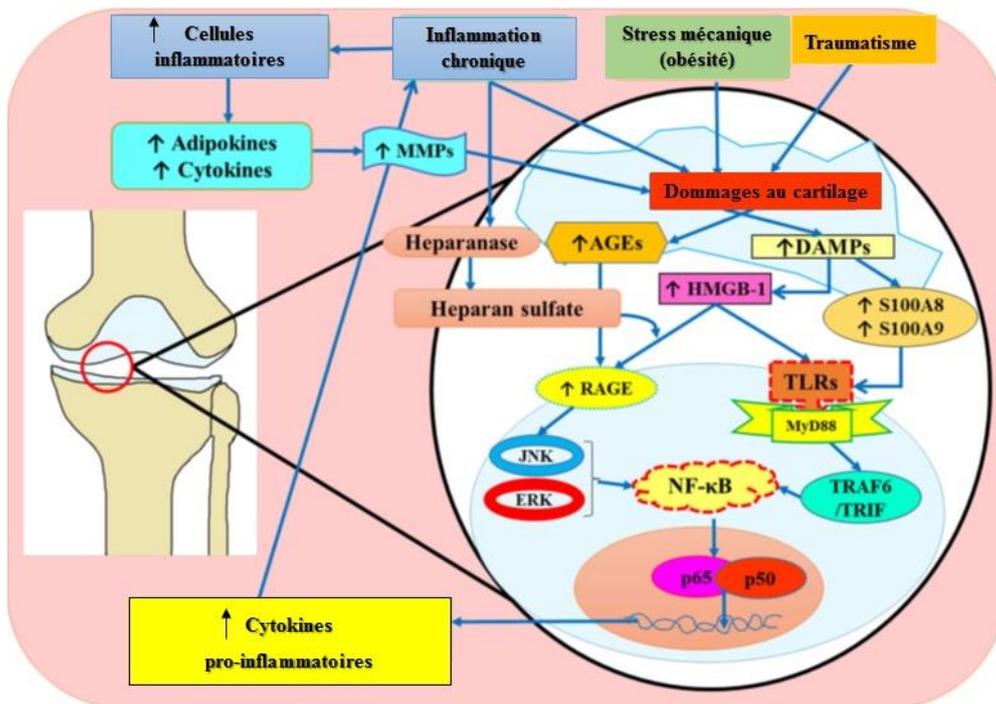


Figure 13 : Rôle des DAMPs dans la pathogenèse de l'arthrose. Modifié d'après Rosenberg *et al.* [137].

### 2.2.5 Les enzymes protéolytiques

Les chondrocytes synthétisent diverses substances chimiques responsables de la dégradation observée au cours de l'arthrose. Parmi ces substances, on retrouve essentiellement des enzymes protéolytiques dont les métalloprotéases matricielles (MMP). En effet, ces dernières jouent un rôle clé dans la dégradation des composants de la matrice. Elles ont été localisées en quantités anormalement élevées dans les régions adjacentes aux lésions du cartilage et dans le fluide synovial des patients arthrosiques [138-140].

Les MMP peuvent être classées en plusieurs sous-familles : les collagénases (MMP-1, -8, -13), les gélatinases (MMP-2, -9), les stromélysines (MMP-3, -10, -11) ainsi que les MMP membranaires (MMP-14, -15, -16, -17) [141]. Les collagénases sont responsables de la dégradation des collagènes, les stromélysines des composés non-collagéniques de la matrice tel que l'agrécan et pour finir les gélatinases du collagène dénaturé [142]. Les métalloprotéases membranaires sont quant à elles impliquées dans la dégradation non spécifique de certaines molécules de la matrice et dans l'activation d'autres MMP (MMP-2, MMP-13,...) [143].

Ces enzymes sont synthétisées sous forme inactive et vont par la suite être activées par une cascade d'enzymes protéolytiques. L'action de ces différentes enzymes est régulée par des inhibiteurs appelés « *tissue inhibitors of MMP* » (TIMP) [9]. Dans les tissus de l'articulation arthrosique, un déséquilibre entre la quantité de TIMP et de MMP s'installe progressivement, conduisant à un déficit en inhibiteurs et par conséquent à une augmentation de l'activité enzymatique de type MMP au sein des tissus pathologiques [144].

Les agrécanases -1 et -2, également nommées ADAMTS (*a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) -4 et -5 sont aussi impliquées dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage. Elles sont responsables de la dégradation de l'AGG au niveau du domaine interglobulaire (G1-G2) NH<sub>2</sub>-terminal (endroit différent du site de clivage de la MMP-3) ainsi qu'au niveau de quatre sites dans la région riche en CS de l'AGG [145-147].

Des cathepsines, des calpaïnes et des hyaluronidases sont également engagées dans la résorption du cartilage [148, 149].

#### 2.2.5.1 Les cytokines

Les cytokines, intervenant dans la communication entre les cellules, regroupent un ensemble de protéines et de glycoprotéines de faible poids moléculaire. Au sein de l'articulation, les cytokines sont produites par les chondrocytes, les cellules de la membrane synoviale et de l'os sous-chondral.

Les cytokines peuvent être classées en trois catégories : les cytokines cataboliques (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8, IL-17, IL-18,...), anaboliques (PDGF, IGF-1, GDF-5,...) ou régulatrices (IL-6, IL-4, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ ,...) selon l'activité biologique principale qu'elles exercent sur le cartilage [49].

L'IL-1 $\beta$  et le TNF, deux cytokines impliquées dans la dégradation du cartilage, ont largement été documentées et étudiées dans la littérature, c'est pourquoi nous les détaillerons dans le paragraphe suivant.

- **L'IL-1 $\beta$**  est la principale cytokine impliquée dans la physiopathologie de l'arthrose (Figure 14). Il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire qui est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 31 kDa (pro-IL-1 $\beta$ ), principalement par les monocytes/macrophages, mais

également par les chondrocytes, les ostéoblastes et les synoviocytes. Cette cytokine est libérée dans le milieu extracellulaire tandis que l'IL-1 $\alpha$  est principalement associée à la membrane cellulaire [9].

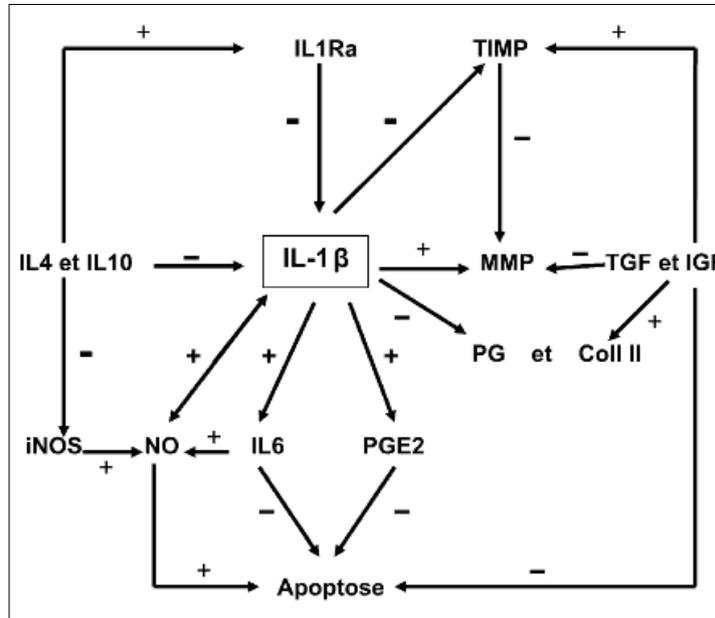


Figure 14 : IL-1 $\beta$  au cœur de la balance entre facteurs anaboliques et cataboliques au cours de l'arthrose. IL : interleukine ; IL1Ra : antagoniste du récepteur à l'IL-1 ; TIMP : *Tissue inhibitor of metalloproteinase* ; IGF : *Insulin-like growth factor* ; TGF : *Transforming growth factor* ; Coll II : collagène de type II ; PG : protéoglycane ; PGE2 : prostaglandine E2 ; NO : monoxyde d'azote ; iNOS : Forme inducible de la NO synthase. D'après Laadhar et al. [9].

L'IL-1 $\beta$  inhibe la synthèse des principales protéines matricielles tels que le collagène de type II et les protéoglycanes [9, 150].

Par ailleurs, elle stimule la synthèse par les chondrocytes de la majorité des MMP et des agrécanases, ce qui induit la dégradation des composants matriciels [151]. Par cette dégradation, l'IL-1 $\beta$  crée un déséquilibre entre le taux des enzymes et de leurs inhibiteurs en défaveur de ces derniers [152]. Le monoxyde d'azote (NO) est en partie responsable de cet effet inhibiteur ; sa production est stimulée par l'IL-1 $\beta$ . L'action du NO se traduit aussi par l'apoptose des chondrocytes [153]. L'IL-1 $\beta$  est également capable d'induire la production de prostaglandines pro-inflammatoires telle que la prostaglandine E2 (PGE2) [154]. L'action de l'IL-1 $\beta$  est régulée par le récepteur antagoniste (IL-1 Ra). La production de ce récepteur est inhibée par le NO, ce qui a pour effet d'augmenter en retour l'activité de l'IL-1 $\beta$  [155].

- Le TNF $\alpha$  est également une cytokine clé au cours de la physiopathologie de l'arthrose. Le précurseur du TNF $\alpha$  (26 kDa) est stocké au niveau de la membrane cellulaire. Sa libération dans le milieu extracellulaire et son activation nécessitent l'intervention d'une enzyme appelée TNF $\alpha$ - converting enzyme (TACE) [156]. *In vitro*, le TNF $\alpha$  agit de façon synergique avec l'IL-1 $\beta$ [151]. Tout comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  induit un déséquilibre fonctionnel au sein de la matrice cartilagineuse. En effet, il modifie le statut enzymatique du cartilage et réduit également la production de ses constituants. Il stimule la synthèse par les chondrocytes de la majorité des métalloprotéases et réduit la production de TIMP-1 et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) [144].

L'IL-6, une autre cytokine impliquée dans la physiopathologie de l'arthrose, agit en synergie avec l'IL-1 $\beta$  sur le chondrocyte en diminuant la production de collagène de type II et en augmentant la synthèse des MMP [157]. Chez les patients arthrosiques, l'IL-15 est associée à la sévérité de la douleur [158]. On la retrouve en concentration élevée dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrose à un stade précoce [159].

#### 2.2.5.2 Les formes activées de l'oxygène

L'oxygène peut être transformé de façon enzymatique en molécules très réactionnelles : les formes activées de l'oxygène (FAO). Parmi celles-ci, on retrouve essentiellement l'anion superoxyde (O $_2^{\bullet}$ ) et le monoxyde d'azote ( $\bullet$ NO), produits par les chondrocytes arthrosiques.

A partir de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote, d'autres formes activées de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$ ), le peroxynitrite (ONOO $^-$ ) sont formées. Ces molécules instables vont interagir et dénaturer les protéines de la matrice cartilagineuse [160, 161]. En effet, étant très agressives, elles sont normalement éliminées par des systèmes de défense antioxydants enzymatiques ou biochimiques. Une rupture de l'équilibre entre la production des FAO et les systèmes de défense antioxydants conduit à un stress oxydatif. Une production excessive et incontrôlée de FAO peut alors endommager le cartilage et participer aux mécanismes physiopathologiques de l'arthrose [162].

### 2.2.5.3 Les prostanoïdes

Les prostanoïdes, prostaglandines (PG) et thromboxanes, dérivent d'un précurseur commun, l'acide arachidonique. Ils sont produits à partir des phospholipides membranaires par une cascade enzymatique faisant intervenir la phospholipase A2, les cyclo-oxygénases (COX) et les prostaglandines E synthétases (PGES) [163].

Les chondrocytes, les ostéoblastes et les synoviocytes arthrosiques expriment des quantités accrues de COX-2 et de PGES et en conséquence, le taux de PGE<sub>2</sub> dans le liquide synovial de patients arthrosiques est anormalement élevé [164] (Figure 15).

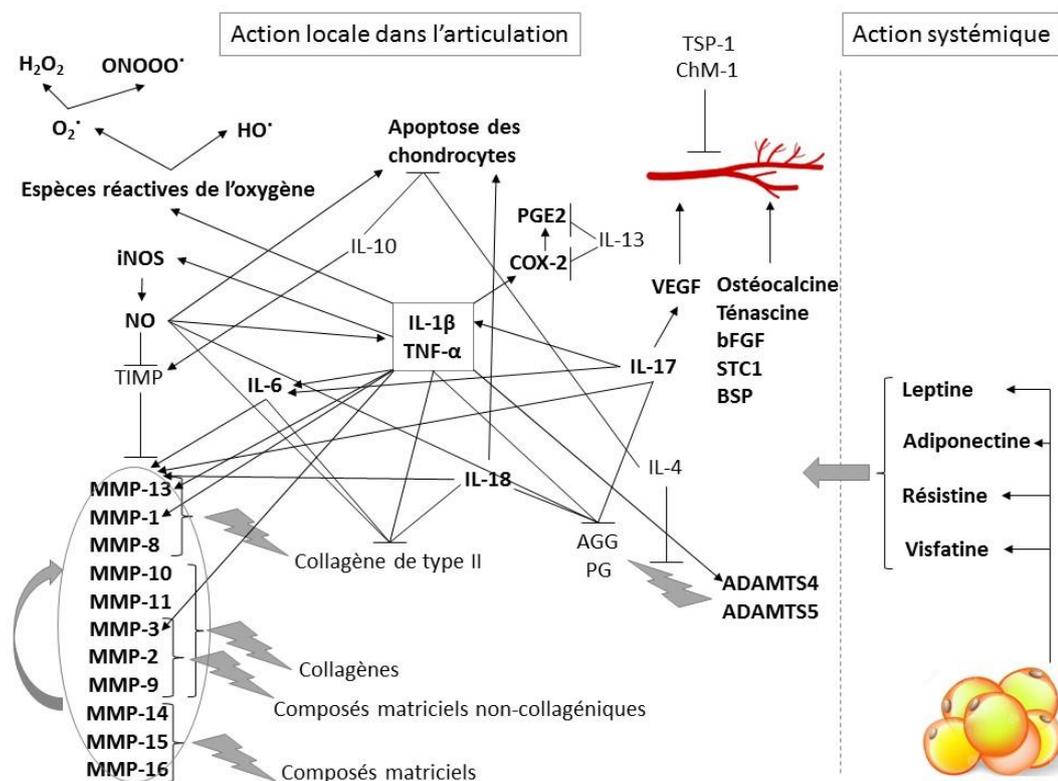


Figure 15 : Schéma représentatif de la physiopathologie de l'arthrose d'après Comblain [46]. Les facteurs écrits en gras sont ceux qui sont augmentés lors du développement d'arthrose. Les flèches représentent une stimulation. Les éclairs représentent une dégradation. Les lignes représentent une inhibition. ADAMTS = agrécanase ; AGG = agrécan ; bFGF = *basic fibroblast growth factor* ; BSP = *bone sialoprotein* ; ChM-1 = chondromoduline-1 ; COX-2 = cyclooxygénase-2 ; IL = interleukine ; iNOS = synthase induite d'oxyde nitrique ; NO = oxyde nitrique ; PG : protéoglycane ; PGE<sub>2</sub> = prostaglandine E<sub>2</sub> ; STC1 = stanniocalcine 1 ; TNF = *tumor necrosis factor*, TSP-1= thrombospondine-1 ; TIMP = inhibiteur de métalloprotéase matricielle ; VEGF = *vascular endothelial growth factor*.

#### 2.2.5.4 Les facteurs angiogéniques

Au cours du processus arthrosique, des vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses sensibles et sympathiques envahissent le cartilage articulaire. Ce phénomène, appelé angiogenèse, résulte 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.

Les protéoglycanes jouent un rôle anti-angiogénique important. La diminution du contenu en protéoglycanes de la matrice extracellulaire est associée à l'invasion vasculaire du cartilage [165]. En effet, les propriétés antiadhésives des GAG limitent l'adhésion des cellules endothéliales à la surface du cartilage. Lorsque le contenu en protéoglycanes est diminué, l'adhérence des cellules endothéliales à la surface du cartilage augmente [166].

De plus, les chondrocytes produisent de nombreux facteurs anti-angiogéniques. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment la thrombospondine-1 (TSP-1), glycoprotéine impliquée dans les interactions matrice-chondrocyte mais aussi la chondromoduline-1 (ChM-1), glycoprotéine responsable de l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales [167].

Le VEGF est un facteur pro-angiogénique largement étudié étant donné son implication dans le développement de l'arthrose. Il stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il stimule également la synthèse des MMP-1 et -3 par les chondrocytes arthrosiques [168]. D'autres facteurs pro-angiogéniques tels que la ténascine, l'ostéocalcine, le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), la stanniocalcine 1 (STC1), le TNF- $\alpha$  ou encore la *bone sialoprotein* (BSP) interviennent également [169-173] (Figure 15).

### 2.3 Les recommandations pour le traitement de l'arthrose

A ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de guérir de l'arthrose. La prise en charge de l'arthrose se concentre sur le traitement des symptômes. Néanmoins, il existe une série de recommandations associant des traitements non-pharmacologiques et pharmacologiques ayant pour objectifs de réduire la douleur et la raideur articulaire, de maintenir et d'améliorer la mobilité, de diminuer l'invalidité du patient, et de ralentir la

progression des lésions structurales de l'articulation. Une chirurgie prothétique est cependant indiquée pour les patients souffrant d'arthrose sévère [174].

En 2005, dans le but d'uniformiser les traitements de la gonarthrose et de la coxarthrose humaine, divers experts internationaux de l'OARSI se sont réunis. Pour ce faire, ils se sont basés sur les recommandations régionales et nationales existantes ainsi que sur la littérature scientifique publiée [3]. Cette rencontre a donné lieu à un consensus à la suite duquel l'OARSI publia en 2007 [175], 2008 [176], 2010 [177] et 2014 [178] des recommandations internationales globales destinées aux professionnels de la santé et aux patients.

En 2014, l'OARSI a demandé à treize experts internationaux une mise à jour des recommandations pour le traitement non-chirurgical de l'arthrose du genou en tenant compte du phénotype du patient (Tableau 3). Cette démarche a permis d'adapter le traitement des patients en fonction de leur état de santé ainsi que du nombre d'articulations touchées par l'arthrose.

Tableau 3 : Classification de l'arthrose selon quatre sous-phénotypes. Modifié de *McAlindon et al.* [178].

<b>Articulation arthrosique</b>	<i>Genoux uniquement</i> : présence d'arthrose symptomatique à un ou aux deux genoux uniquement.
	<i>Articulations multiples</i> : présence d'arthrose symptomatique aux genoux et à d'autres articulations (hanche, main, colonne vertébrale, etc.)
<b>Facteurs de comorbidités</b>	<i>Absents</i> : le patient atteint d'arthrose ne présente pas un état de santé avec des facteurs de comorbidités.
	<i>Présents</i> : le patient atteint d'arthrose présente un état de santé avec un des facteurs de comorbidités suivants: diabète, hypertension, pathologie cardiovasculaire, déficience rénale, saignement gastro-intestinal, dépression ou incapacité physique limitant l'activité incluant l'obésité.

La mise à jour des recommandations émises par les experts internationaux, sur base de la littérature scientifique a permis de dégager trois grandes modalités thérapeutiques pour chacun des quatre sous-phénotypes cliniques. Il s'agit des modalités qualifiées « d'appropriées », « d'incertaines » et « d'inappropriées ». Parmi celles-ci, les modalités thérapeutiques qualifiées « d'incertaines » ont été jugées ambiguës par les experts. Néanmoins, cette qualification n'est pas destinée à être une recommandation négative ou n'exclut pas l'utilisation de cette modalité thérapeutique. Elle implique davantage la relation entre le praticien et son patient qui détermine, en fonction de la balance risque-bénéfice, si cette modalité thérapeutique peut être administrée ou non [178].

La figure 16 présente en fonction des quatre sous-phénotypes cliniques, les modalités qualifiées « d'appropriées » pour le traitement non-chirurgical de la gonarthrose.

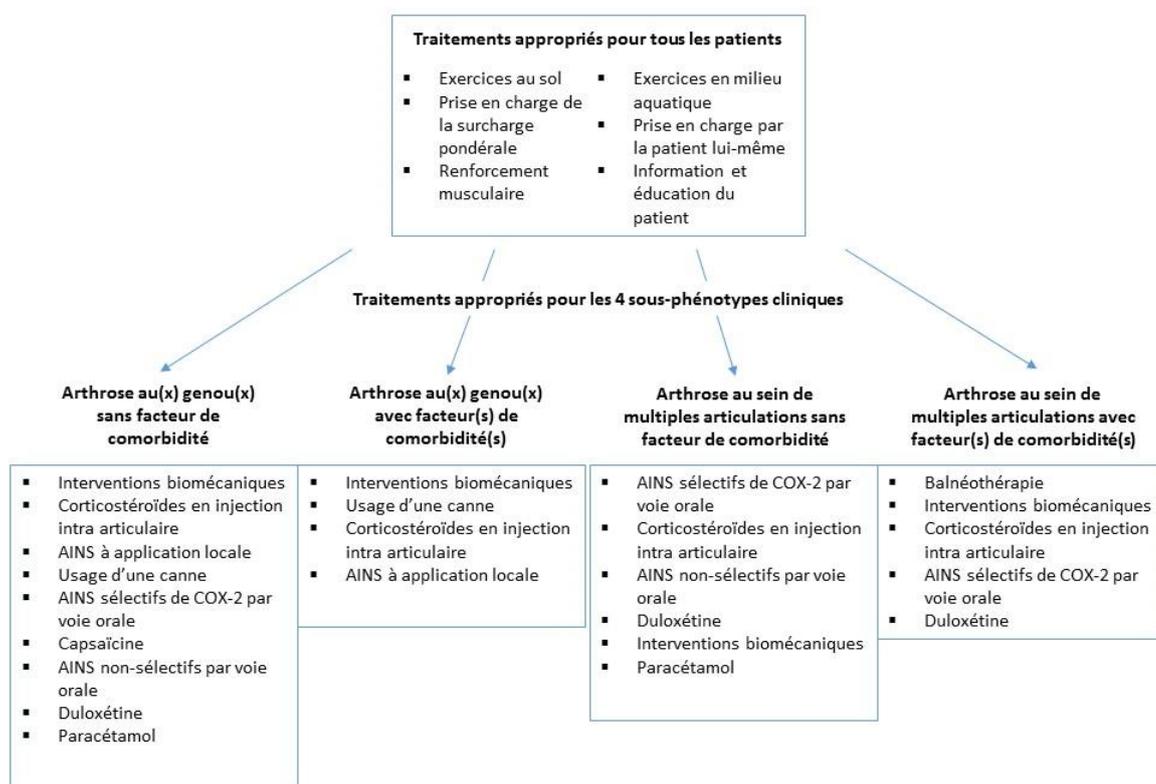


Figure 16 : Recommandations de l'OARSI pour le traitement non-chirurgical de l'arthrose. Adapté de McAlindon *et al.* [178] par Comblain [46]. AINS = anti-inflammatoires non-stéroïdiens ; COX-2 = cyclooxygénase 2.

La pyramide thérapeutique se construit comme suit (Figure 17) :

- Les traitements non-pharmacologiques présentant une observance faible ;
- Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et le paracétamol qui montrent une faible efficacité sur les symptômes de l'arthrose et des effets indésirables lorsqu'ils sont administrés pendant une longue période ;
- Les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL) et d'efficacité modérée, mais sans effet secondaires
- Les traitements intra-articulaires, essentiellement les corticostéroïdes et la viscosupplémentation à l'acide hyaluronique, efficace à condition de poser la bonne indication ;
- Et enfin, la chirurgie prothétique réservé aux cas les plus sévères.

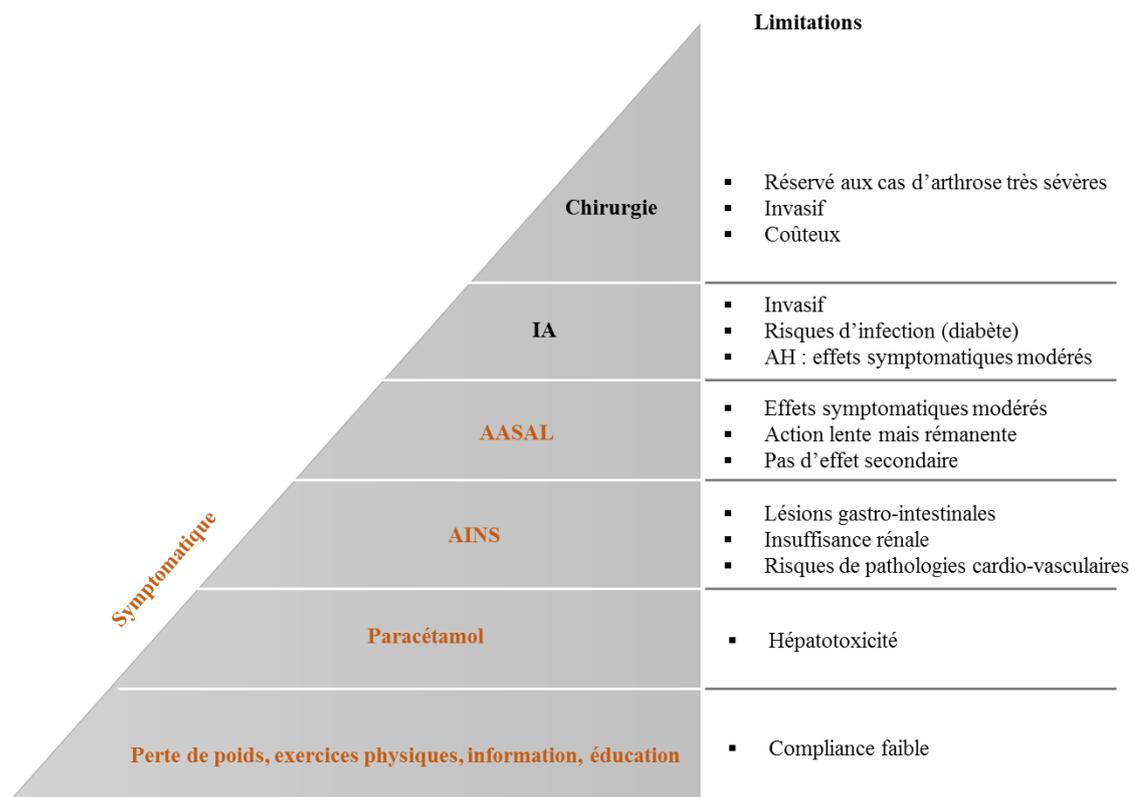


Figure 17 : Représentation pyramidale des traitements pour la prise en charge de la gonarthrose et leurs limitations. Adapté d'après Clegg *et al.* [179]. AASAL = anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente ; AH = acide hyaluronique ; AINS = anti-inflammatoires non-stéroïdiens ; IA = injection intra articulaire.

## 2.4 Diagnostic de l'arthrose et marqueurs biochimiques de l'arthrose

Un marqueur biologique est une caractéristique qui est mesurée et évaluée de manière objective comme un indicateur des processus physiologiques, pathologiques ou de la réponse à un traitement [180]. Les biomarqueurs sont classés en deux catégories distinctes : les marqueurs qualifiés de « secs », représentés par les données issues des échelles analogiques visuelles, de l'imagerie médicale, des questionnaires, des tests physiques, et les marqueurs qualifiés de « solubles », mesurés dans les fluides corporels comme le sérum, l'urine, le fluide synovial, et faisant appel à des analyses biochimiques (p.ex. immunologiques, spectrométrie de masse). Ces analyses offrent un reflet des variations de substances endogènes comme des protéines, fragments de protéines, glucides, métabolites ou acides nucléiques (p.ex. ARN) dans les fluides corporels.

De nombreux problèmes doivent encore être résolus avant d'espérer une prise en charge optimale du patient arthrosique. Les marqueurs biologiques solubles pourraient être utiles pour résoudre les problèmes suivants :

1. Le diagnostic de l'arthrose est fondé sur des données cliniques et radiologiques. Il n'est donc posé que tardivement, alors que les altérations du cartilage, de l'os sous-chondral et des tissus péri-articulaires sont déjà présentes. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) permet de déceler les altérations structurales précoces de l'arthrose, mais il reste un outil de recherche difficilement accessible en pratique quotidienne. De plus, l'IRM, comme la radiographie standard, donne une image statique de l'altération du cartilage, mais ne permet pas d'explorer les changements métaboliques qui se produisent au cours du développement de la maladie (Figure 18) [181].



Figure 18 : Place des marqueurs biologiques dans le diagnostic de l'arthrose [181].

2. La recherche clinique, et donc le développement de nouvelles thérapies, sont extrêmement coûteux et nécessitent des essais cliniques de très longue durée. Le *Gold Standard* de l'évaluation des altérations se produisant au sein de l'articulation reste le pincement de l'interligne. Or, cette variable est très peu reproductible et sensible, et impose un suivi de longue durée sur des cohortes importantes.
3. Notre connaissance des différents phénotypes de la pathologie reste insuffisante pour une bonne définition des indications thérapeutiques.
4. Enfin, nous avons besoin d'outils qui nous permettent de mettre en place un suivi personnalisé des patients.

L'ensemble de ces problématiques souligne le rôle décisif que devraient jouer dans le courant de la prochaine décennie les marqueurs biologiques du métabolisme de l'os, de la synoviale ou du cartilage pour le diagnostic, le pronostic et la surveillance de l'efficacité thérapeutique. Il s'agit d'outils indispensables à la mise en place d'une médecine de précision.

La classification BIPEDS distingue les marqueurs solubles en fonction de leur pertinence clinique [182]. Elle liste six catégories de biomarqueurs selon les informations cliniques qu'ils fournissent : sévérité de la maladie, investigation, pronostic, diagnostic,

sécurité et efficacité thérapeutiques. Les marqueurs peuvent être également classés en 4 catégories selon leur niveau de qualification comme marqueur de substitution dans le développement des médicaments. Les niveaux proposés sont « exploration », « démonstration », « caractérisation » et enfin « substitution » [183, 184]. A ce dernier stade, les marqueurs biologiques solubles se substituent à des critères cliniques ou radiologiques de référence. A ce jour, aucun marqueur n'a atteint ce niveau de qualification [185]. L'utilisation de ces marqueurs biologiques en routine quotidienne n'est toujours pas d'actualité et il reste nécessaire de les qualifier sur des cohortes importantes de patients, puis d'en réaliser l'industrialisation et la production. Cela passe par une automatisation de l'analyse en respectant des directives européennes strictes.

La découverte d'un nouveau marqueur biologique peut résulter de deux démarches différentes [60, 183]. La première est la méthode « *top-down* ». Elle part d'une hypothèse fondée sur la connaissance de la pathogénie pour aboutir au développement de méthodes de dosage qui seront testées sur des populations de patients pour en évaluer la pertinence. Les marqueurs dénommés CTX-II, Coll2-1 ou Coll2-1NO2 sont issus de cette méthode [186, 187]. La deuxième voie est la méthode « *bottom-up* ». Elle part de la comparaison du profil protéomique ou métabolomique de fluides biologiques de sujets sains ou arthrosiques [183]. L'identification de protéines ou des fragments de protéines qui différencient les deux groupes et la confrontation de ces données avec ce que l'on connaît de la maladie débouchent sur la sélection de nouvelles cibles et le développement de tests. A titre d'exemple, les marqueurs issus de la fibuline-3 (Fib3-1, Fib3-2, Fib3-3) ont été découverts par des analyses protéomiques comparatives de l'urine de sujets sains ou arthrosiques [188]. Une fois le marqueur identifié, il faut mettre au point un test permettant sa quantification dans les fluides biologiques. Ce test doit être robuste et démontrer sa précision, sa reproductibilité, sa spécificité, sa stabilité et sa sensibilité. Ce processus est appelé *validation*. Ensuite, il faut mesurer le marqueur dans les fluides biologiques d'un grand nombre de sujets représentatifs de la population générale afin de démontrer sa pertinence clinique. Ce processus est appelé *qualification*.

Plusieurs marqueurs biochimiques du remodelage osseux ou cartilagineux ont été proposés [189, 190] (Figure 19). Parmi ceux-ci, cinq biomarqueurs sériques et urinaires font

l'objet d'une attention particulière. Il s'agit de l'acide hyaluronique, de la COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*), de CTX-II (*C-telopeptide of type II collagen*), de C2C (*Collagen type II cleavage*) ainsi que du peptide de la triple hélice du collagène de type II, soit sous sa forme native (Coll2-1), soit sous sa forme nitrée (Coll2-1 NO<sub>2</sub>) [187]. Cependant, à ce jour, il n'existe aucun marqueur biochimique pour le diagnostic précoce de la maladie qui différencie les phénotypes d'arthrose et puisse être utilisé comme critère diagnostique par les cliniciens.

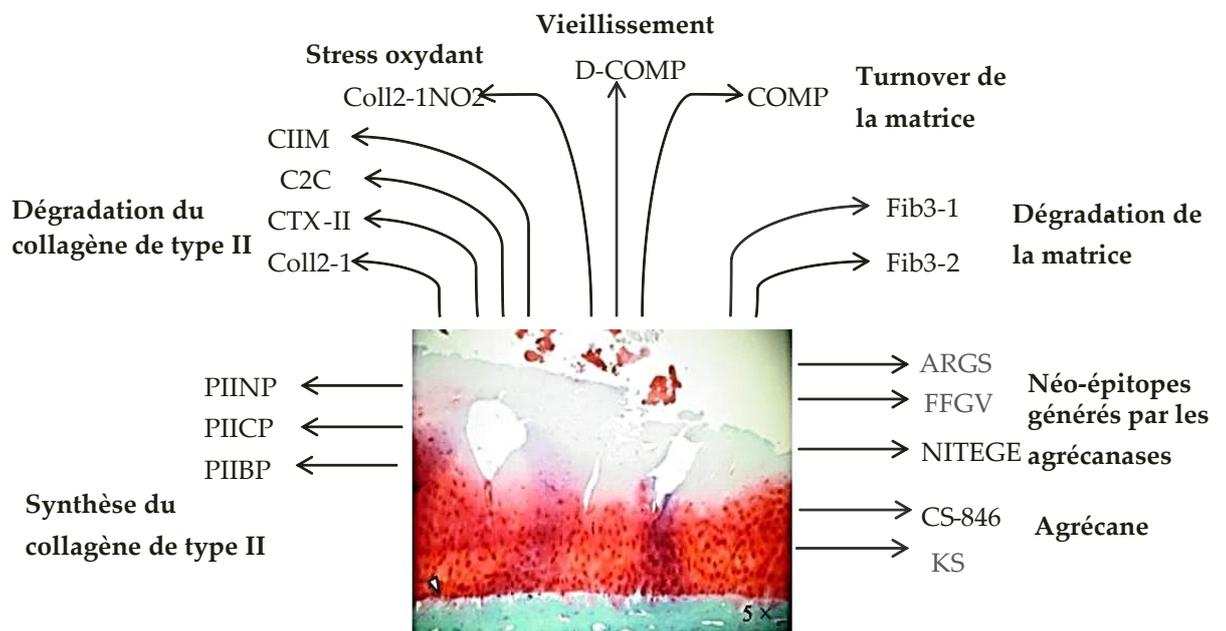


Figure 19 : Un aperçu des biomarqueurs solubles dérivés du cartilage. Modifié de Henrotin *et al.* [32].

## 2.5 La glycation, l'oxydation et la nitration des protéines

Dans les systèmes physiologiques, les protéines peuvent subir différents types de modifications spontanées et continues (Figure 20).

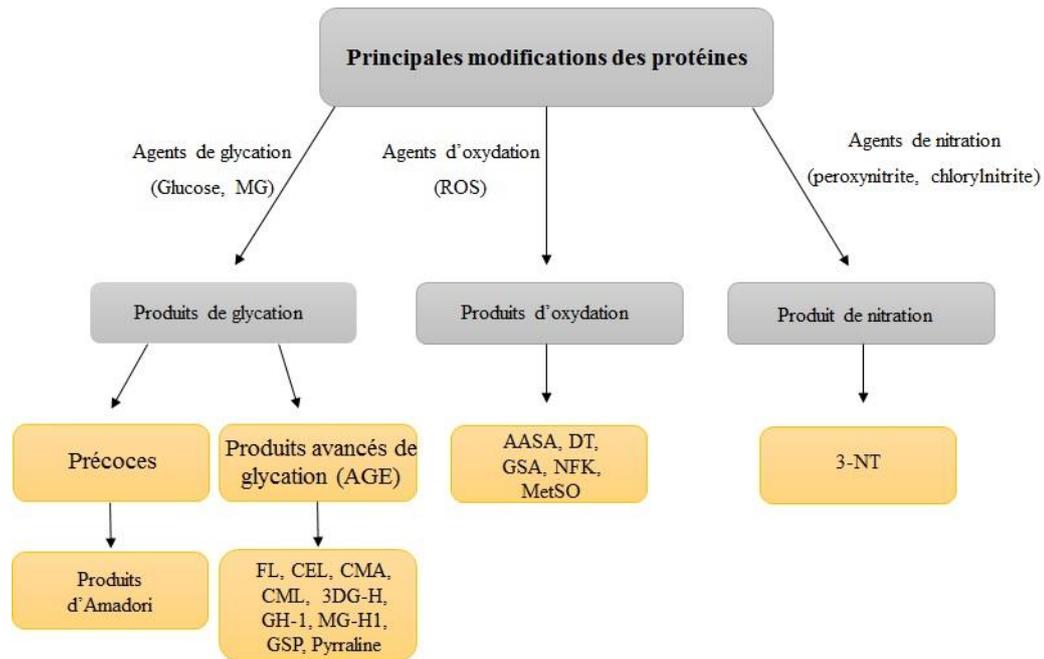


Figure 20 : Schéma général représentant les principales modifications des protéines.

Premièrement, les protéines peuvent subir des modifications par des agents de glycation tels que le glucose ou encore le méthylglyoxal (MG). Ces modifications conduisent à la formation des produits de glycation. On distingue les produits de glycation précoces (protéines intermédiaires), encore appelés produits d'Amadori, formés lors des premières étapes de la réaction de glycation et les produits avancés de glycation (AGE), formés lors de la dernière étape de la réaction de Maillard [191]. Les AGE peuvent d'une part, résulter de processus oxydatifs produisant de la Nε-carboxyméthyl lysine (CML) et de la pentosidine et d'autre part, résulter de processus non-oxydatif produisant de la fructosyl-lysine (FL) et de l'hydroimidazolone dérivée du méthylglyoxal (MG-H1).

Le terme de glycation non enzymatique désigne les modifications post-traductionnelles tardives, provoquées par la fixation d'« oses simples » ou de leurs dérivés sur les groupements aminés des protéines. Cette réaction chimique se déroule spontanément dans l'organisme sans avoir besoin d'être accélérée par une enzyme [192]. Etant irréversible et cumulative, il ne faut pas la confondre avec la glycosylation, réaction enzymatique post-traductionnelle précoce [193].

Deuxièmement, les protéines peuvent subir des modifications par des agents oxydants tels que les ROS (espèces actives de l'oxygène) (superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle) et conduire à la formation de produits d'oxydation. Les produits d'oxydation majeurs dans les systèmes physiologiques sont le sulfoxyde de méthionine (MetSO), la dityrosine (DT), la N-formylkynurénine (NFK), le semialdéhyde alpha-amino adipique (AASA) et le semialdéhyde glutamique (GSA). La DT est également formée enzymatiquement par Duox (double oxydase) [194].

Troisièmement, les protéines peuvent subir des modifications mineures par des agents de nitration (peroxynitrite, chlorynitrite et autres) et conduire à la formation de produits de nitration, le principal étant la 3-nitrotyrosine (3-NT) [195].

### 2.5.1 Mécanisme de la réaction de glycation

La réaction de glycation, décrite pour la première fois par Maillard, se déroule en trois étapes, avec une formation précoce de produits appelés « produits d'Amadori », suivie de la production d'intermédiaires réactifs (notamment des aldéhydes comme le méthylglyoxal) et aboutissant à la formation de composés de structures complexes, dénommés produits avancés de glycation (AGE) (Figure 21).

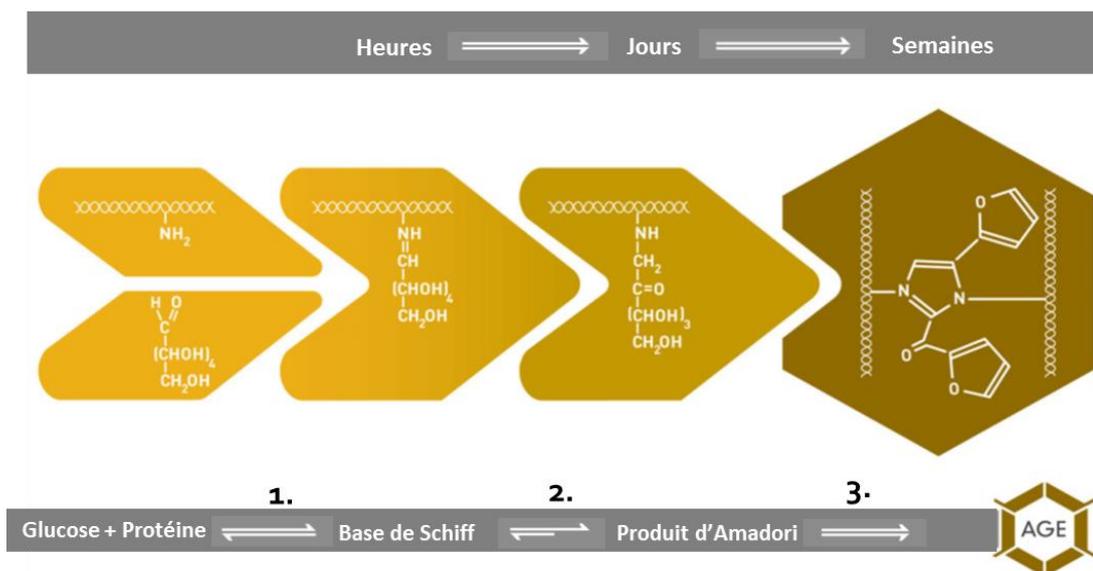


Figure 21 : Les différentes étapes de la réaction de Maillard. Adapté d'après Hartog *et al.* [196].

- 1) Formation rapide et réversible d'une base de Schiff instable par combinaison de la fonction aldéhyde du glucose avec un résidu aminé de la protéine (Lysine, Arginine) [197] ou la fonction amine N-terminale [198].
- 2) Réarrangement d'Amadori pour aboutir aux produits de glycation dits précoces ou fructosamines qui sont des protéines intermédiaires.
- 3) Accumulation lente et irréversible, par réarrangements, transferts d'hydrogène et oxydation, de produits avancés de glycation (AGE) ou produits de réaction de Maillard. Ces produits terminaux de glycation sont des protéines de durée de vie prolongée se caractérisant par une pigmentation brune, leur fluorescence [199, 200] et leur implication dans la formation de liaisons croisées entre protéines [201].

La plupart des étapes de la glycation sont accompagnées par un stress oxydatif (réactions d'oxydation) à tel point que l'ensemble du processus est souvent désigné sous le nom de glycoxydation. Les produits intermédiaires de ces étapes conduisent, par exemple, à la formation d'aldéhydes réactifs (MG) ainsi qu'à la formation de certains AGE comme la pentosidine ou la N $\epsilon$ -carboxyméthyl lysine (CML) [192, 202].

Les AGE qui s'accumulent au niveau tissulaire, notamment sur les protéines à longue durée de vie comme le collagène de type I, peuvent subir des clivages par d'autres protéines, passer dans la circulation sanguine, pour être partiellement éliminés dans l'urine. La réaction de glycation modifie d'une part, la structure des protéines et d'autre part, leurs fonctions (activité biologique ou enzymatique). Les protéines glyquées interviennent dans de nombreux phénomènes tels que le remodelage tissulaire, l'apoptose, l'inflammation ou encore l'angiogenèse [192].

La formation des produits avancés de glycation, outre le cas du diabète, est un phénomène accru dans diverses pathologies comme l'insuffisance rénale terminale [203], et au cours du vieillissement [204]. Outre le glucose, d'autres oses ou dérivés sont susceptibles de participer à la glycation des protéines comme le galactose, le fructose, le ribose et l'acide ascorbique. Les  $\alpha$ -oxoaldéhydes très réactifs comme le méthylglyoxal et le 3-désoxyglucosone sont également des précurseurs importants des AGE *in vivo* [199, 200].

## 2.5.2 Caractérisation des produits avancés de glycation

Seuls quelques AGE ont pu être caractérisés et identifiés *in vivo* (Figure 22) : les dérivés hydroimidazolones produits de la réaction avec le 3-désoxyglucosone ont été retrouvés dans les rétines de patients diabétiques [205]. Des dérivés monolysyles ont également été caractérisés. C'est le cas du N $\epsilon$ -carboxyméthyl-lysine (CML) issu du clivage de résidus fructose-lysines des fructosamines et dont la concentration au niveau du collagène de la peau est fortement liée au développement de la rétinopathie [206].

La N $\epsilon$ -carboxyéthyl lysine (CEL) et les sels d'imidazolium (GOLD et MOLD) ont également été isolés *in vitro* et sont issus de la réaction du méthylglyoxal et du glyoxal avec les protéines [207]. De même, des produits obtenus par le couplage de deux acides aminés glyqués, comme la pentosidine [208], ont été identifiés. La pyrraline a été détectée au niveau des protéines sériques de patients diabétiques [209]. La CML et la pentosidine sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs cliniques de la formation de produits de glycoxydation *in vivo* [210].

De plus, des produits d'Amadori peuvent également être obtenus par la glycation des résidus arginine et aboutissent notamment à la N $\epsilon$ -carboxyméthylarginine (CMA) [211]. Ces produits d'oxydation terminaux, n'étant plus modifiés, augmentent tout au long du diabète sucré et représentent des marqueurs d'une hyperglycémie durable chez les patients diabétiques.

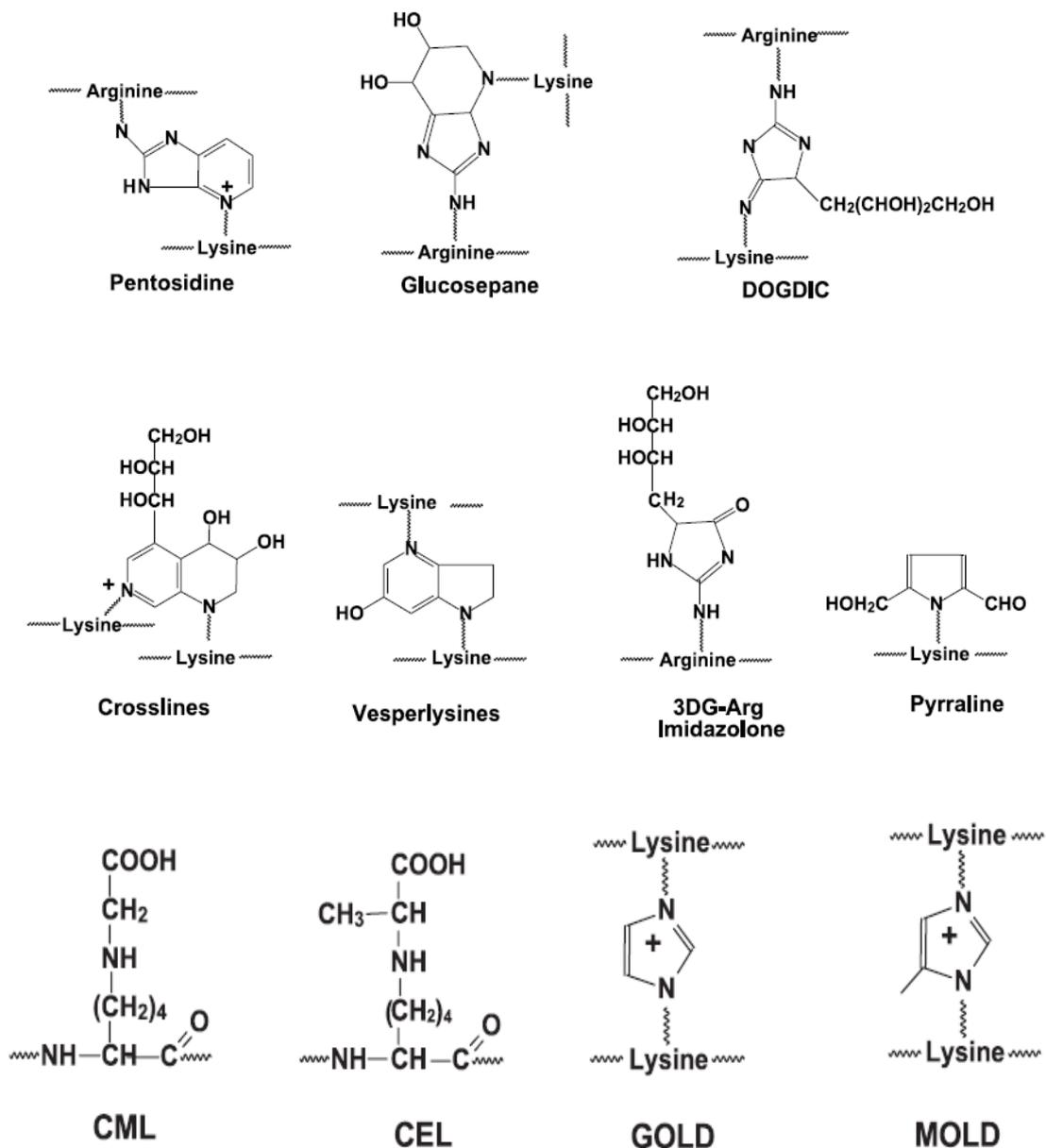


Figure 22 : Structures d'AGE caractérisées *in vivo* selon Ahmed *et al.* ; Thorpe *et al.* [212, 213].

### 2.5.3 Fonctions biologiques et physiologiques des AGE

Les produits avancés de glycation présentent différentes fonctions biologiques et physiologiques. Parmi les AGE, certains sont des protéines réticulées (« *cross-links* ») comme la pentosidine, issues de la réaction de Maillard, ou encore des facteurs de reconnaissance pour des récepteurs spécifiques de liaison des AGE à la surface cellulaire

(CML, MG-H1) et enfin d'autres sont des marqueurs de prédiction des risques de processus pathologiques (FL) [212].

Les AGE circulent dans le sang et sont éliminés par voie rénale. Les effets néfastes des AGE proviennent d'une part d'altérations structurales et fonctionnelles des protéines et d'autre part d'une interaction avec des récepteurs cellulaires [192]. Les conséquences fonctionnelles des AGE sur les protéines sont nombreuses et touchent principalement les protéines circulantes et les protéines de la matrice extracellulaire. Les protéines impliquées sont généralement des protéines possédant une longue durée de vie, comme le collagène. Il est maintenant bien connu que les pontages provoqués par les AGE et en particulier la pentosidine sur le collagène entraînent une rigidité de ces molécules de collagène [214]. Brièvement, les AGE jouent également un rôle important dans la protéinurie diabétique en diminuant la liaison des protéoglycanes à la matrice extracellulaire et en favorisant la fuite rénale des protéines [215, 216]. Ils sont également responsables de l'opacification progressive observée au niveau oculaire et de l'apparition de la cataracte survenant au cours du diabète mais aussi du vieillissement [217, 218].

Hormis les modifications structurales et fonctionnelles, les AGE exercent également leurs effets cellulaires par interaction avec des protéines membranaires et des récepteurs [219] dont le plus connu est le récepteur des AGE (RAGE), une glycoprotéine de 45 kDa exprimée à la surface de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, musculaires lisses, monocytes et lymphocytes. La fixation des AGE sur RAGE déclenche un stress oxydant intracellulaire. CML serait particulièrement impliqué dans ce processus [192, 220].

Les conséquences fonctionnelles et cellulaires des AGE sont multiples. De très nombreuses données expérimentales soulignent l'importance des anomalies induites par les AGE dans le développement des lésions tissulaires mais aussi au cours du vieillissement et de l'insuffisance rénale (troubles d'élimination des AGE) [192, 220].

#### 2.5.4 Implication des AGE dans la physiopathologie de l'arthrose

La première preuve de l'accumulation d'AGE dans le cartilage humain vieillissant a été publiée il y a plus d'une décennie [208]. La plupart des études pertinentes ont focalisé leur recherche sur la pentosidine, un des produits avancés de glycation. C'est ainsi que *Sell et Monier* ont montré que le cartilage de sujets âgés contenait un niveau relativement élevé de pentosidine en comparaison aux autres tissus humains (peau, œil) [208]. D'autres études ont corroboré ces observations et ont montré que certains AGE comme FL, CML et la pentosidine s'accumulaient dans le réseau de collagène du cartilage avec le vieillissement [221, 222]. L'accumulation des AGE dans le cartilage articulaire est responsable de modifications des propriétés mécaniques de ce dernier. En effet, la rigidité du réseau de collagène est fortement et positivement corrélée avec son niveau en AGE [214].

Bien que très peu étudié à l'heure actuelle, l'implication des AGE dans la physiopathologie de l'arthrose est un sujet de recherche grandissant. Plusieurs études ont mis en évidence un taux plus élevé d'AGE (pentosidine, CEL, CML) dans le cartilage arthrosique en comparaison au cartilage normal [223-225]. Des taux sériques plus élevés de CEL ont été observés chez des patients arthrosiques par rapport aux patients sains [226]. *DeGroot et al.* ont montré que l'accumulation d'AGE au sein de la matrice du cartilage s'accompagne d'une diminution de synthèse des PG [227, 228]. De plus, la membrane synoviale des articulations arthrosiques présente un taux de CML plus élevé que la membrane synoviale saine [229]. *Eaton et al.* ont observé que des taux élevés en AGE au niveau de la peau étaient associés à la progression de l'arthrose du genou chez l'homme mais pas chez les femmes [230]. D'autres études ont montré que les AGE induisaient l'apoptose dans les chondrocytes arthrosiques humains et augmentaient l'expression des MMP (MMP -3 et -13), perturbant l'homéostasie du cartilage [231-233]. Récemment, il a été démontré que la mémantine, un antagoniste du récepteur NMDA, proposée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, diminuait la dégradation du collagène de type II et de l'agrécan induite par les AGE dans les chondrocytes SW1353 humains (lignée de cellules de chondrosarcome humain) [234].

En conclusion, toutes ces données suggèrent qu'un niveau élevé d'AGE dans le tissu cartilagineux (1) rend le tissu plus vulnérable aux dommages, (2) limite les activités de

réparation et (3) favorise le développement et la progression des lésions du cartilage tels qu'observés dans l'arthrose.

### **3 Partie *in vitro***

#### **3.1 Introduction**

Dans la partie *in vitro* de ce travail, notre objectif était d'étudier la production des produits de glycation, d'oxydation et de nitration par les chondrocytes humains stimulés ou non par l'IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  induit une série de changements métaboliques identiques à ceux observés *in vivo* comme la production de MMP ou de ROS. Nous avons choisi un nouveau modèle de culture de chondrocytes en multicouches car dans ce modèle, une matrice extracellulaire s'accumule progressivement autour des cellules.

Des chondrocytes arthrosiques primaires ont étéensemencés à haute densité et cultivés dans un milieu enrichi avec 10 % de FBS. Dans ces conditions, les chondrocytes peuvent se multiplier et former des couches de cellules se superposant les unes aux autres, entourées d'une matrice produite par les cellules elles-mêmes. Au terme de trois semaines de culture, la multicouche de cellules forme une membrane dans laquelle les cellules ne peuvent plus être observées individuellement. Les multicouches de chondrocytes ont été traitées avec de l'IL-1 $\beta$  pendant 10 jours. Les milieux de culture ainsi que les cellules ont été collectés afin d'analyser ultérieurement la production des produits de glycation, d'oxydation et de nitration.

#### **3.2 Matériel et méthodes**

##### **3.2.1 Culture des chondrocytes articulaires humains**

###### **3.2.1.1 Prélèvements des échantillons de cartilage**

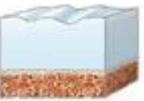
Les cultures ont été réalisées à partir de cartilage articulaire humain prélevé lors de la mise en place de prothèse totale du genou. Les prélèvements cartilagineux étaient effectués au niveau de l'articulation fémoro-tibiale et fémoro-patellaire.

Dans ce travail, nous avons utilisé des prélèvements de cartilage provenant de quatre adultes, deux hommes et deux femmes, dont l'âge était compris entre 51 et 71 ans (moyenne de 70 ans).

Tous les prélèvements utilisés ont été obtenus après le consentement éclairé du patient. Dans un premier temps, l'étude était expliquée oralement par le chirurgien orthopédique, et dans un second temps, un consentement écrit a été recueilli. Cette procédure de consentement a été approuvée par le Comité d'Ethique de l'Université Catholique de Louvain (numéro de dossier : B403201214793).

A l'examen macroscopique, tous les prélèvements de cartilage présentaient des lésions dont la sévérité a été évaluée à l'aide de l'échelle de Moskovitz [235] (Tableau 4).

Tableau 4: Classification des lésions du cartilage articulaire selon *Moskovitz et al.* [235].

	<p><b>Stade 0</b> : cartilage normal présentant une bonne élasticité et de couleur blanche.</p>
	<p><b>Stade I</b> : le cartilage est œdématié, anormalement mou à la palpation. La surface reste régulière. La zone de ramollissement est parfois très limitée, visible sous l'aspect d'une tache jaune-gris. L'œdème est présent sur une ou plusieurs surface(s) articulaire(s).</p>
	<p><b>Stade II</b> : le cartilage présente, sur au moins une surface articulaire, une ou plusieurs fissure(s) profonde(s) qui s'entrecroisent, donnant une fragmentation en motte. La fragmentation peut être plus fine et prendre l'aspect classique de « chair de crabe cuite ». Cette image s'accompagne d'un ramollissement à la palpation.</p>
	<p><b>Stade III</b> : l'os sous-chondral apparaît dépourvu de tout revêtement cartilagineux sur au moins une surface dont le diamètre est supérieur à 5 mm. Cette lésion est visible sur une ou plusieurs surface(s) articulaire(s).</p>

### 3.2.1.2 Isolement des chondrocytes

De fines lamelles de cartilage étaient excisées en évitant la couche calcifiée. Elles étaient par la suite lavées plusieurs fois dans du DMEM [Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Lonza, Verviers, Belgique)] contenant 10 mM d'HEPES [N-(2-hydroxy éthyl) piperazine'-(2- ethanesulfonic acid), Lonza, Verviers, Belgique], 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Lonza, Verviers, Belgique). Dans la suite du texte, ce milieu sera nommé « milieu de base ». Les lamelles de cartilage étaient alors découpées en fragments d'environ 1 mm<sup>3</sup>.

Afin de libérer les chondrocytes de la matrice extracellulaire, une succession de digestions enzymatiques était réalisée. Les fragments de cartilage étaient incubés sous agitation constante et à 37°C dans le milieu de base, avec successivement de la hyaluronidase (0,5 mg/ml, 30 minutes, type IV-S, Sigma Aldrich, Bornem Belgique), de la pronase E (1 mg/ml, 60 minutes dans le milieu de base enrichi par 5 µg/ml de polymyxine, 10 µg/ml de gentamycine et 10 µg/ml de vancomycine, Merck, Louvain, Belgique), et enfin, de la collagénase clostridiale (0,6 mg/ml, 16 heures, type IA, Sigma Aldrich, Bornem, Belgique).

Après digestion, les cellules étaient filtrées à travers une membrane de nylon de porosité égale à 70 µm, lavées trois fois, et comptées à l'aide d'une plaque de Neubauer. A ce moment, la viabilité cellulaire, estimée par le test d'exclusion du bleu de trypan, était supérieure à 95 %. Cette méthode permet de récolter entre 2 et 4 x 10<sup>6</sup> chondrocytes par gramme de cartilage.

Les cellules étaient suspendues dans du DMEM supplémenté de 10 % de FBS (*fœtal bovine serum*) (Lonza, Verviers, Belgique), 10 mM d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, 2 mM de glutamine (Lonza, Verviers, Belgique) et 20 µg/ml de proline (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) à la densité cellulaire de 0,25 x 10<sup>6</sup> cellules/ml pour les chondrocytes humains.

### 3.2.1.3 Mise en culture

Un modèle de culture en « multicouches » a été développé. Pour ce faire, les chondrocytes arthrosiques primaires étaientensemencés dans des plaques six puits à la

densité de  $0,5 \times 10^6$  cellules/puits en ajoutant 2 ml du milieu de culture (voir composition dans le paragraphe précédent) par puits et cultivés dans un milieu enrichi par 10 % de FBS.

Les multicouches de chondrocytes étaient traitées avec de l'IL-1 $\beta$  humaine recombinante produite par *E.coli* (Roche Pharmaceuticals, Bruxelles, Belgique) à la concentration finale de 1,7 ng/ml (soit  $10^{-10}$  M) sur une période prolongée (Figure 23). Cette concentration était souvent utilisée dans la littérature [46, 236-238] et est connue pour induire une réponse optimale du chondrocyte. Chaque condition expérimentale était testée en triplicata dans 2 cultures de chondrocytes indépendantes. Les milieux de culture ainsi que la cytokine testée étaient renouvelés tous les 3 jours. Le milieu conditionné était conservé à chaque changement de milieu dans des masterblock (Thermo Fisher Scientific, Tournai, Belgique) à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

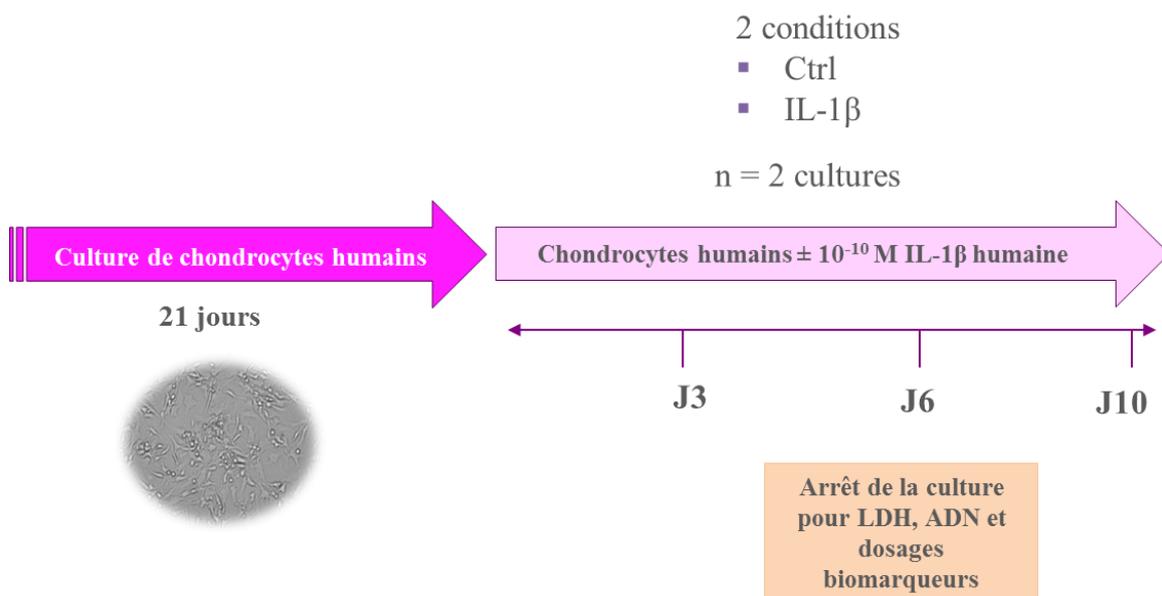


Figure 23 : Représentation schématique du protocole réalisé sur les chondrocytes humains.

#### 3.2.1.4 Arrêt de la culture

Au terme de respectivement 3, 6 et 10 jours, les milieux de culture conditionnés étaient prélevés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'analyse. Les chondrocytes étaient récoltés à l'aide d'un scrapeur et étaient ensuite lysés par ultrasons (50 Hz) pendant 20 sec à  $4^{\circ}\text{C}$  dans 1 ml de tampon Tris-HCl pH 7,4.

### 3.2.2 Dosages biochimiques

#### 3.2.2.1 *Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase*

La viabilité cellulaire était estimée en quantifiant la lactate déshydrogénase (LDH) dans les milieux de culture conditionnés. Un échantillon de 100 µl de milieu de culture conditionné ou de la courbe de dilution du standard (LDH de muscle de lapin, gamme de concentrations comprise entre 12,5 et 2000 ng/ml) (Roche, Bruxelles, Belgique) était mélangé à 50 µl de tampon Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) contenant 0,1 % d'albumine sérique de bœuf (BSA) et 800 mM de lactate (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique). Ensuite, 50 µl du réactif colorimétrique (1,6 mg/ml de chlorure de p-iodonitrotetrazolium (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique), 4 mg/ml de nicotinamide-adénine dinucléotide (Roche, Bruxelles, Belgique), et 0,4 mg/ml de méthosulfate de phénazine (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)) étaient ajoutés. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance était lue à une longueur d'onde de 492 nm à l'aide du spectrophotomètre Labsystems iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finlande). Le pourcentage de cellules mortes était calculé en utilisant la formule suivante :  $\frac{\text{LDH du surnageant de culture}}{\text{LDH du surnageant de culture} + \text{LDH des extraits cellulaires}} \times 100$ .

#### 3.2.2.2 *Quantification de l'acide désoxyribonucléique*

L'acide désoxyribonucléique (ADN) a été quantifié selon la méthode fluorométrique de Hoechst [239]. Cette méthode est basée sur le principe de la fluorescence émise par un réactif, le bis-benzimidazole, lorsque celui-ci se lie à l'ADN. La technique était directement appliquée aux extraits cellulaires après leur dissociation par des ultrasons. La courbe de référence était réalisée à partir d'ADN de placenta humain (Sigma Aldrich, Bornem, Belgique), solubilisé dans du tampon Tris-HCl 5mM pH 7,4 dans une gamme de concentration comprise entre 0,3125 et 20 µg/ml. Deux cents microlitres de la solution réactive (0,2 mg/ml solution Hoechst dye) (Life Technologies, Gand, Belgique) étaient alors ajoutés aux 50 µl d'extraits cellulaires ou aux 50 µl des solutions de référence. Après 45 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la lecture de la fluorescence était effectuée à l'aide d'un fluorimètre Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki,

Finlande), en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 356 nm et une longueur d'onde d'émission de 458 nm.

### 3.2.2.3 *Analyse d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés dans le surnageant de culture multicouches de chondrocytes humains primaires*

La concentration des produits de glycation, d'oxydation et de nitration dans le surnageant de culture de chondrocytes était quantifiée grâce à une analyse de dilution isotopique stable en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à l'aide du système Acquity™ UPLC couplé à un spectromètre de masse triple quadripolaire en tandem « Xevo TQ-S » (Waters, Manchester, UK) [240].

A noter qu'il est important de distinguer, d'une part, les produits de glycation, d'oxydation et de nitration également appelés acides aminés glyqués, oxydés et nitrés, résultant de la protéolyse des protéines glyquées, oxydées et nitrées et d'autre part, les protéines glyquées, oxydées et nitrées (également appelées dans la suite de ce travail protéines « modifiées »). Les échantillons étaient maintenus à 4°C dans l'échantillonneur automatique pendant l'analyse du lot. La source d'ionisation du spectromètre de masse était l'électronébulisation, encore appelée « *electrospray* ». Les températures de la source d'ionisation et du gaz de désolvatation étaient respectivement de 120°C et 350°C, le débit de gaz de désolvatation était de 900 L/h et la tension capillaire était de 0,60 Kv. Du gaz argon à la pression de  $5,0 \times 10^{-3}$  mbar était présent dans la cellule de collision.

Les analytes déterminés étaient: les produits d'oxydation, la dityrosine (DT), la N-formylkynurénine (NFK), le semialdéhyde  $\alpha$ -amino adipique (AASA), le sulfoxyde de méthionine (MetSO) et le semialdéhyde glutamique (GSA); le produit de nitration, 3-nitrotyrosine (3-NT); et les produits de glycation N $\epsilon$ -fructosyl-lysine (FL), N $\epsilon$ -carboxyméthyl-lysine (CML), N $\epsilon$ -carboxyéthyl-lysine (CEL), N $\epsilon$ -carboxyméthyl-arginine (CMA), l'hydroimidazolone dérivée du glyoxal, l'hydroimidazolone dérivée du méthylglyoxal et la 3-désoxyglucosone (G-H1, MG-H1 et 3DG-H), le glucosepane (GSP).

### 3.2.3 Analyses statistiques

Afin d'investiguer une possible différence entre les deux groupes, un modèle mixte a été appliqué aux données. Les variables indépendantes considérées dans ce modèle étaient le temps ainsi qu'un terme d'interaction (temps x groupe) et la variable de classement groupe (témoin ou traité à l'IL-1 $\beta$ ). Cette approche statistique permet la comparaison des courbes d'évolution des biomarqueurs des deux groupes tout en tenant compte de la présence de données longitudinales. Les résultats ont été considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% ( $P < 0,05$ ). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel statistique SAS (version 9.3 pour Windows).

## 3.3 Résultats

### 3.3.1 Analyse d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés dans le surnageant de culture multicouches de chondrocytes humains primaires

Pour les produits de glycation, l'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M augmentait la production de CEL, de GH-1, de CMA, de 3DG-H et de Glucosepane (Figures 24 C-D-F-G-H). Cette augmentation de production était uniquement significative pour la CMA ( $p=0,0380$ ) et le glucosepane ( $p=0,0113$ ) pendant l'intervalle 6-10 jours en comparaison à la condition témoin. Pour les acides aminés oxydés, l'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M augmentait la production de AASA ( $p=0,0296$ ), de dityrosine ( $p=0,0461$ ) et de NFK ( $p=0,0391$ ) de manière significative pendant l'intervalle 6-10 jours en comparaison aux témoins (Figures 25 B-C-E).

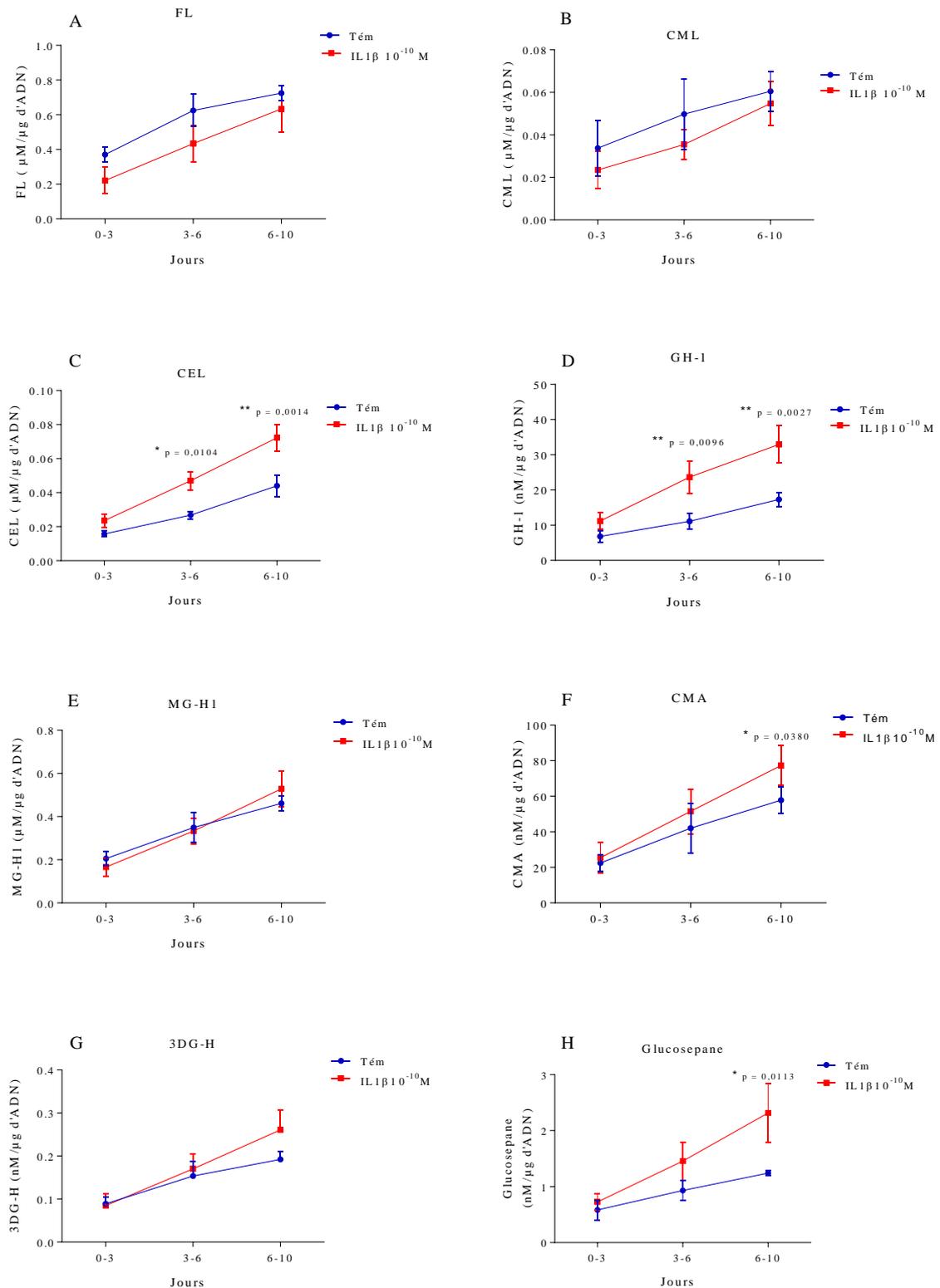


Figure 24 : Concentrations des produits de glycation dans le surnageant de culture multicouches. Valeurs cumulées  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

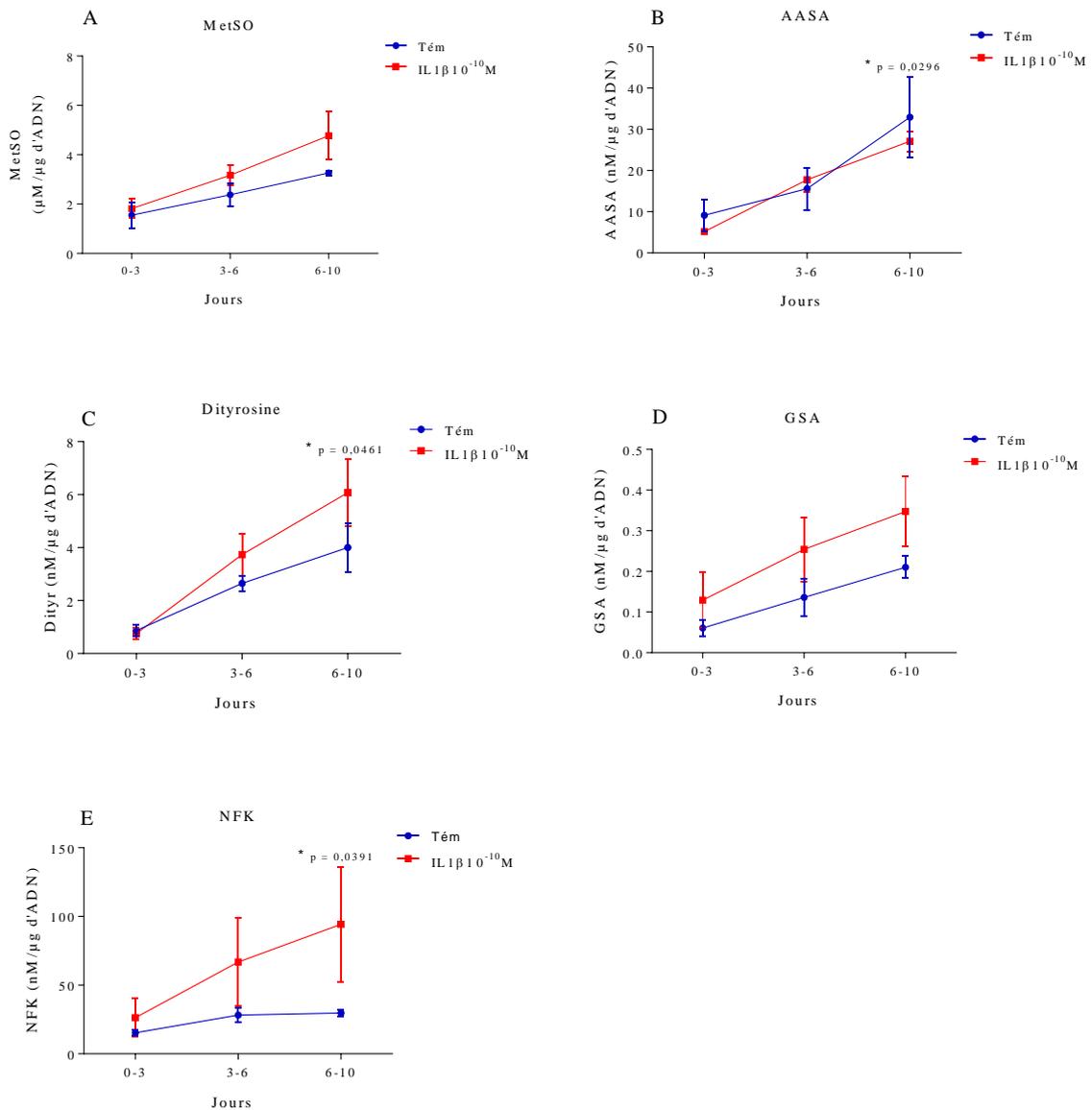


Figure 25 : Concentrations des produits d'oxydation dans le surnageant de culture multicouches. Valeurs cumulées  $\pm$  SEM. \*= $p < 0,05$ .

Grâce à notre étude statistique longitudinale, nous avons observé que tous les biomarqueurs évoluaient de manière significative au cours du temps ( $p < 0,0001$ ). De plus, la comparaison des courbes d'évolution des cultures témoins et traitées à l'IL-1 $\beta$ , montrait qu'elles étaient significativement différentes pour les marqueurs CEL, G-H1, et 3-NT ( $p = 0,0023^{**}$ ,  $p = 0,0071^{**}$  et  $p < 0,0001^{***}$ , respectivement) (Figure 24 C-D et Figure 26).

De plus, en comparaison avec les témoins, l'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M augmentait significativement la production de 3-NT à tous les intervalles de culture ( $p < 0,0001$ ) (Figure 26).

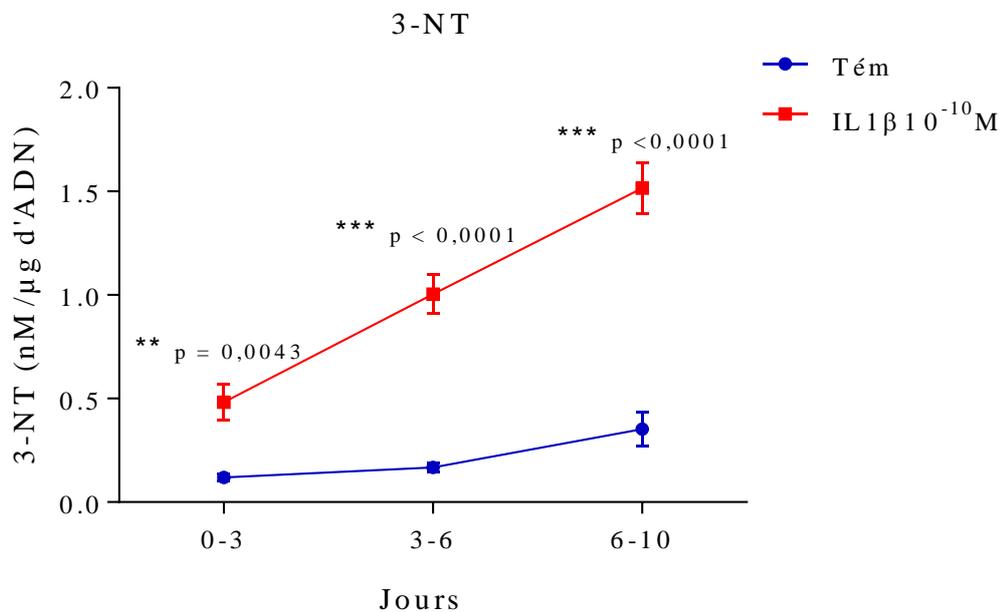


Figure 26 : Valeurs cumulées du produit de nitration 3-NT dans le surnageant de culture multicouches  $\pm$  SEM de deux cultures indépendantes. \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ .

### 3.4 Discussion

Pour la première fois, en collaboration avec l'Université de Warwick, nous avons étudié la production d'un nombre important de produits de glycation, d'oxydation et de nitration par des chondrocytes humains arthrosiques en culture. Plus précisément, nous avons utilisé une approche originale associant un modèle de culture de chondrocytes en multicouches et l'analyse par LC-MS/MS des milieux de culture conditionnés. Cette technique offre une spécificité analytique supérieure à celle des immunodosages ou à la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour les analytes de faibles poids moléculaires. De plus, elle possède un débit plus élevé d'analyse en comparaison à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) [241].

En culture multicouches, les chondrocytes prolifèrent, se superposent et s'entourent d'une matrice extracellulaire. Au terme de trois semaines de culture, les cellules forment une membrane dans laquelle les cellules ne peuvent plus être observées individuellement. Ce modèle offre plusieurs avantages :

- les chondrocytes primaires, directement prélevés lors de la pose d'une prothèse du genou chez le patient, présentent l'avantage de dériver directement de l'organe pathologique, et donc de conserver le phénotype arthrosique. Les chondrocytes ainsi cultivés, présentent une morphologie et un métabolisme très proches de celui des chondrocytes *in vivo* [242, 243] ;
- l'étude de la formation de la matrice extracellulaire ;
- enfin, il permet de reproduire *in vitro* l'environnement matriciel du chondrocyte et les interactions entre la cellule et sa matrice péri-cellulaire.

Ce modèle était donc adapté à l'étude de la formation des AGE, et plus particulièrement à l'étude de l'influence des cytokines sur celle-ci. L'IL-1 $\beta$  est une cytokine très active sur le chondrocyte. Elle induit *in vitro* un ensemble de dérèglements métaboliques identiques à ceux observés *in vivo* au sein du cartilage arthrosique. En effet, elle joue un rôle important dans la dégradation du cartilage en stimulant la synthèse de ROS et de MMP et en inhibant la synthèse des constituants matriciels [244].

Pour la première fois, nous avons démontré sur ce modèle que l'IL-1 $\beta$  augmentait la production de certains AGE et de 3-NT. Ces résultats montrent que l'IL-1 $\beta$  est capable d'induire la production d'AGE *in vitro*. Ce mécanisme est directement impliqué dans la physiopathologie de l'arthrose mais aussi dans le vieillissement du cartilage et la perte de ses propriétés mécaniques. Dès l'âge de 20 ans, les niveaux d'AGE dont CEL, CML ou encore la pentosidine augmentent de manière constante avec l'âge dans les collagènes et les protéoglycanes du cartilage articulaire [221, 245]. Comme précisé ci-dessus, l'IL-1 stimule la production de formes activées de l'oxygène [232]. Or les ROS sont impliquées dans la formation des AGE [232, 246, 247]. A l'inverse, une augmentation de la production de ROS par les AGE a été observée dans des chondrocytes primaires de lapin en culture [232]. Toutes ces observations nous permettent d'établir le lien existant entre l'IL-1 et les AGE. Ce

lien peut être établi via la production des ROS. En effet, les AGE sont maintenant connus pour stimuler plusieurs voies de signalisation. Ils augmentent la formation des ROS, de NO, de RAGE ainsi que l'activation des MAP kinases qui par des molécules intermédiaires, activent différentes cibles dont le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'activation de ces cibles augmente par la suite l'expression de différentes cytokines inflammatoires dont l'IL-1 [246] (Figure 27).

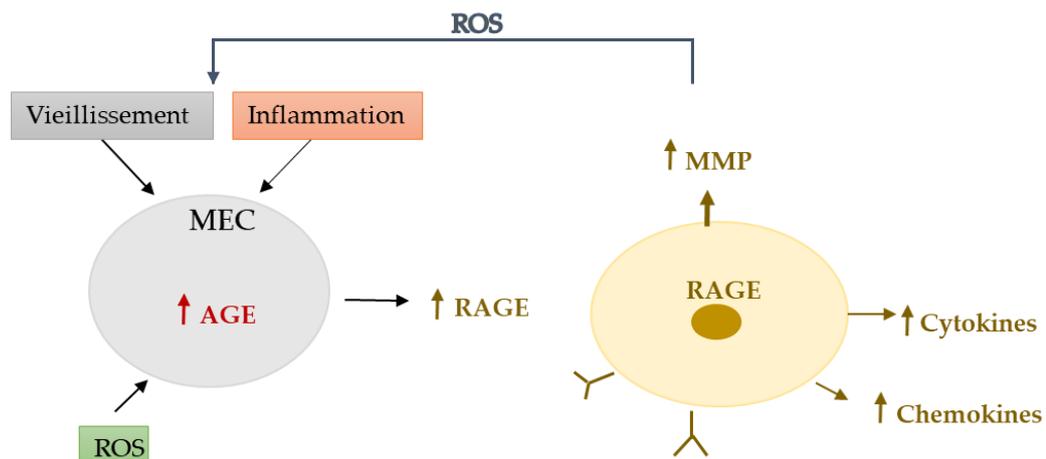


Figure 27 : Schéma illustrant le cycle de perturbations cellulaires induites par l'accumulation d'AGE dans la matrice. AGE = *Advanced Glycation Endproducts* ; MEC = matrice extracellulaire ; MMP = métalloprotéase matricielle ; RAGE = *Receptor for advanced glycation endproducts* ; ROS = espèces réactives de l'oxygène.

Les effets de l'IL-1 $\beta$  ont également été testés sur divers types cellulaires. Des chondrocytes humains stimulés à l'IL-1 $\beta$  produisent des facteurs cataboliques qui induisent la libération de MMP [248]. Les MMP, responsables de la dégradation de la matrice du cartilage, jouent un rôle crucial dans l'initiation et la progression des lésions du cartilage au cours du processus arthrosique [249]. Dans des chondrocytes de lapin, les AGE augmentaient de manière significative l'expression de MMP-9, démontrant une nouvelle fois l'effet destructeur des AGE sur les chondrocytes [250]. Ceci pourrait expliquer que les AGE, après accumulation dans la matrice extracellulaire, sont libérés dans la cavité articulaire et ensuite dans la circulation sanguine.

Notre étude présente cependant quelques limitations :

- Nous avons uniquement étudié le surnageant de culture. A l'avenir, il serait intéressant d'étudier les produits de glycation, d'oxydation et de nitration accumulés dans la matrice. Il est tout à fait envisageable de doser ces produits dans les extraits cellulaires par LC-MS/MS. Néanmoins, il existe également sur le marché des kits ELISA permettant de doser quelques AGE particuliers dont CML et CEL (*CML et CEL Immunoblot kit, Cell Biolabs, Inc., USA*). En effet, plusieurs publications ont utilisé ces trousse de dosage pour mesurer les AGE [251-254]. Cependant, ces dosages ELISA présentent une spécificité analytique moindre en comparaison à la LC-MS/MS. De plus, le panel d'AGE qu'il est possible de détecter avec ces kits est beaucoup moins étoffé.

- Nous pouvons également nous poser la question de savoir ce que nous mesurons dans le surnageant de culture. Est-ce une synthèse ou le produit de dégradation de la matrice cartilagineuse ? Il s'agit probablement du résultat des produits néoformés et de leur libération dans le milieu de culture par la dégradation enzymatique ou oxydative de la matrice extracellulaire.

- Les milieux de culture ont été enrichis avec 10% de FBS. Le FBS contient une large gamme de facteurs de croissance, d'hormones, de vitamines ainsi que des acides aminés indispensables à la croissance cellulaire [255]. Afin d'apporter tous les nutriments nécessaires au maintien en vie des cellules durant une période prolongée de culture (3 semaines), nous avons donc enrichi notre milieu avec 10 % de FBS. On pourrait dès lors s'interroger sur l'influence du FBS sur la production des produits de glycation, d'oxydation et de nitration.

En conclusion, l'IL-1 $\beta$  augmente la concentration de certains AGE et de la 3-NT dans les milieux de culture de chondrocytes humains cultivés en trois dimensions. Ce résultat témoigne du rôle joué par l'IL-1 dans la formation et la libération des AGE, des molécules impliquées dans la réaction inflammation et la dégradation des tissus conjonctifs. Ce modèle expérimental permettra à l'avenir de mieux comprendre les mécanismes de formation des AGE et d'étudier l'influence de traitement sur la formation de ces motifs moléculaires.

## 4 Partie in vivo

### 4.1 Introduction

Un modèle d'arthrose spontanée chez le cobaye a été utilisé afin d'étudier la progression des lésions tissulaires à différents moments de l'évolution de la maladie.

Le modèle d'arthrose spontanée chez le cobaye Dunkin-Hartley est particulièrement intéressant par ses similitudes histopathologiques avec la pathologie humaine. L'apparition de la pathologie articulaire chez le cobaye et l'humain est à la fois liée à l'âge et à la prise de poids. Les lésions spontanées au niveau du genou sont symétriques et sont plus prononcées dans la zone non couverte par le ménisque du compartiment médial. Ceci correspond à la localisation observée dans l'arthrose idiopathique chez l'homme. Ce modèle d'arthrose chez le cobaye est caractérisé par une rupture précoce des fibrilles de collagène dans le cartilage articulaire (2 mois). Des kystes osseux (2-3 mois), un épaissement de l'os sous-chondral (3-12 mois) et le développement d'ostéophytes (3-12 mois) précèdent la perte histologique de protéoglycanes (4-6 mois) et les fibrillations (7-12 mois) [256]. L'IL-1 $\beta$  et les enzymes de dégradation MMP-3 et MMP-13 sont impliquées dans le processus, comme chez l'homme [12, 256, 257].

L'objectif de notre étude était d'étudier la progression de la pathologie arthrosique et de corrélérer les taux sériques des marqueurs biochimiques avec la sévérité des lésions histologiques du cartilage mais aussi avec les propriétés mécaniques du cartilage (Mach-1, Biomomentum, Canada) et des paramètres de la marche (CatWalk XT, Noldus, Pays-Bas). Jusqu'à ce jour, la majorité des études réalisées à l'aide du Mach-1 et du CatWalk portaient sur les rats et les souris [258-260]. Une mise au point importante a dû être réalisée en préambule à cette étude.

## 4.2 Matériel et méthodes

### 4.2.1 Population

Soixante cobayes mâles Dunkin-Harley provenant des Laboratoires Charles River (Paris, France), âgés de 3 semaines avec un poids compris entre 250 et 300 gr, ont été inclus dans l'étude. Les cobayes, identifiés à l'aide d'une puce électronique implantée au niveau dorsal, étaient acclimatés une semaine avant le début de l'étude. Les cobayes étaient élevés dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. Ils étaient hébergés à raison de 3 cobayes par cage et alimentés avec une nourriture standard pour cobayes (Tecnilab, Pays-Bas) contenant de l'acide ascorbique (393.53 mg/kg) et de la vitamine D3 (1972.54 IU/kg). Ils recevaient de l'eau *ad libitum*. Des tuyaux PVC étaient ajoutés dans les cages afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement et de minimiser leur stress.

Toutes les expérimentations sur les cobayes étaient conduites après approbation de la Commission d'Éthique Animale de l'Université de Liège (dossier 14-1648). Les procédures utilisées dans cette étude étaient conçues pour être conformes aux pratiques admises afin de minimaliser et/ou éviter la douleur, le stress et l'inconfort des animaux. Le nombre d'animaux par groupe était choisi en fonction des recommandations internationales de l'Osteoarthritis Research Society International (OARSI) publiées en 2010 [257].

Les 60 cobayes étaient randomisés en cinq groupes de 12 cobayes selon le moment du sacrifice, de la manière suivante :

- Groupe 1 : l'euthanasie de ce groupe était réalisée à l'âge de 4 semaines.
- Groupe 2 : euthanasié à la semaine 12.
- Groupe 3 : euthanasié à la semaine 20.
- Groupe 4 : euthanasié à la semaine 28.
- Groupe 5 : euthanasié à la semaine 36.

Le plan de l'étude est résumé à la Figure 28.

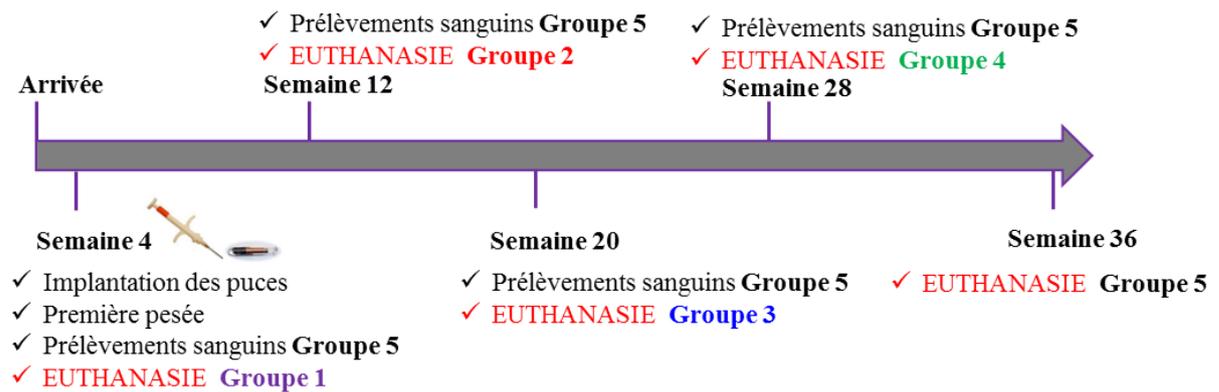


Figure 28 : Résumé du plan de l'étude.

#### 4.2.2 Mesure du poids des animaux

Le poids de chaque cobaye était enregistré et les résultats exprimés en grammes :

- Le jour de son arrivée au sein de l'animalerie ;
- Chaque semaine (jour et heure fixe) ;
- Avant chaque prise de sang ;
- Le jour de l'euthanasie.

#### 4.2.3 Prélèvements sanguins

Des échantillons de sang étaient prélevés aux semaines 4, 12, 20, 28 et 36 au niveau des veines superficielles des oreilles, le matin, sous anesthésie avec un mélange de kétamine (32 mg/kg) et de xylazine (3 mg/kg) par injection sous-cutanée. A la semaine 4 et toutes les 8 semaines jusqu'à la semaine 36, du sang était collecté par ponction intra-cardiaque juste avant l'euthanasie, sous anesthésie générale à l'aide de pentobarbital sodique 200 mg/kg par voie intra-péritonéale. Le sang était centrifugé à 2000 g durant 5 min. Le sérum était ensuite prélevé et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

#### 4.2.4 CatWalk XT

Le CatWalk XT (Noldus, Pays-Bas, Figure 29) est un système semi-automatisé d'analyse de la démarche des rongeurs. Il est composé d'un couloir sur une plaque en verre que le cobaye traverse de part en part. La lumière verte envoyée à cette plaque n'est

réfractée qu'au niveau des zones de contact des pattes de l'animal avec la plaque. Par conséquent, les empreintes de pattes sont rendues visibles et celles-ci sont capturées par une caméra vidéo haute fréquence positionnée en dessous du couloir. Le plafond lumineux émet quant à lui une lumière rouge. Celle-ci permet de distinguer le contour de l'animal lors des enregistrements, ce qui facilite la classification correcte des pattes (antérieure/postérieure gauches, antérieure/postérieure droites). Le réceptacle sur la droite (*goal box*) peut contenir par exemple la cage de l'animal (récompense), ce qui motive l'animal à traverser le couloir et facilite l'acquisition de sessions de haute qualité.

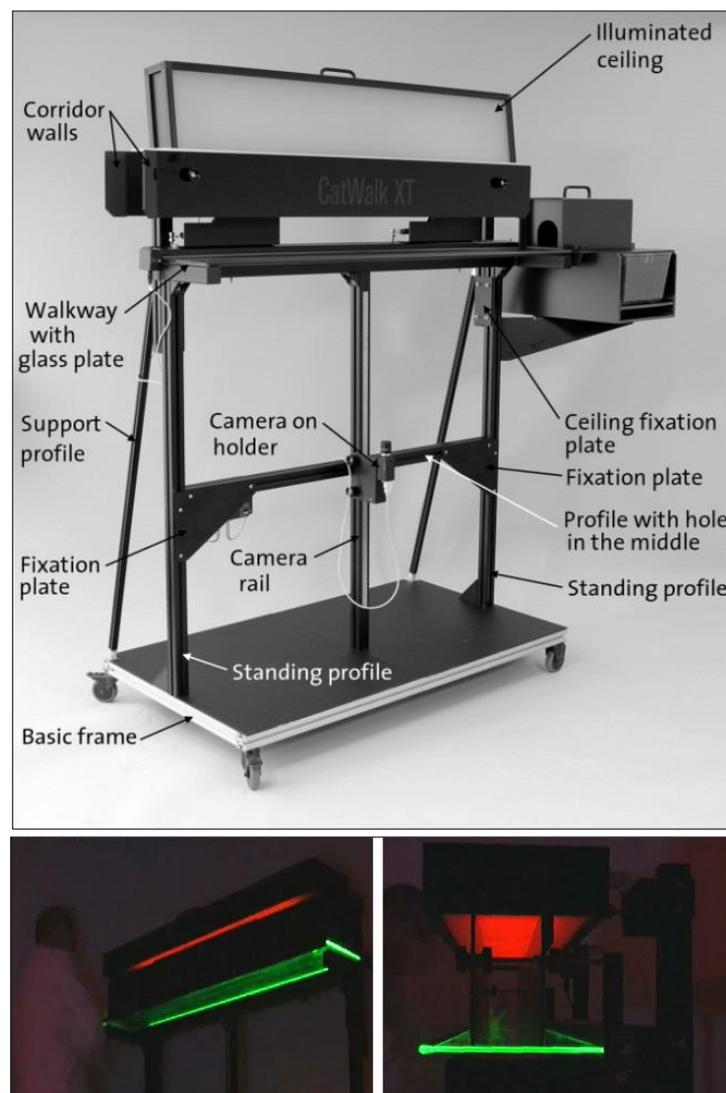


Figure 29 : Illustration du système CatWalk XT [261].

Au cours de cette étude, les cobayes de chaque groupe subissaient une période d'entraînement d'une semaine avant de commencer l'acquisition des sessions sur le

CatWalk. Cette période d'habituatation était importante et permettait aux animaux de traverser le couloir sans interruption ni désagrément. Ainsi, tous les cobayes partaient d'une situation de départ similaire. Cet élément était important pour permettre de comparer diverses sessions au cours d'une expérience et de déceler les anomalies de la démarche liées au traitement plutôt que les différences de qualité de session. Le CatWalk XT était calibré avant chaque enregistrement de session. Tous les enregistrements d'empreintes d'animaux étaient effectués entre 7h00 et 15h00. L'expérience était réalisée par le même expérimentateur tout au long de l'étude et dans l'obscurité afin d'améliorer le contraste de l'image de l'empreinte de patte. L'enregistrement était effectué la veille de l'euthanasie dans les différents groupes. Une marche satisfaisante était définie comme une marche ininterrompue à travers la plateforme à une vitesse supérieure à 10 cm/sec (Figure 30). Trois passages valides étaient enregistrés.

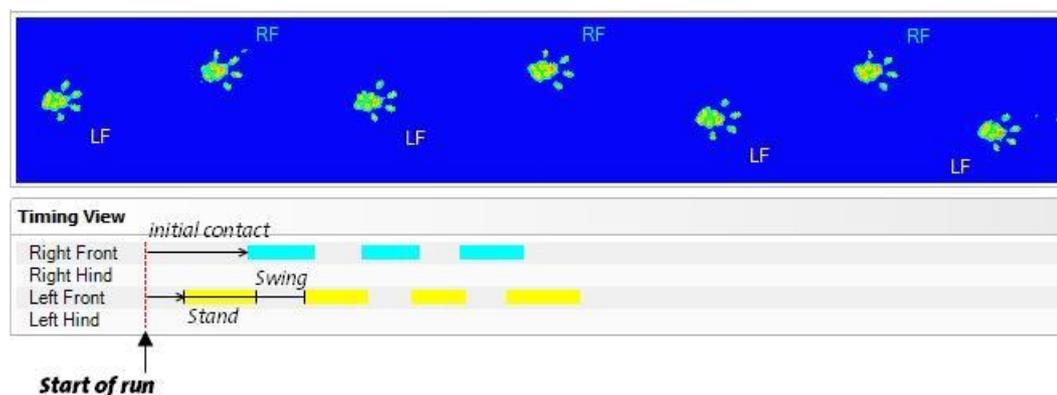


Figure 30 : Illustration d'un exemple de marche satisfaisante [261]. *Initial contact*, *Stand + swing = step cycle*.

Après classification des empreintes, les différents paramètres étaient calculés automatiquement à l'aide du logiciel Catwalk XT (version 10.5). Les paramètres étudiés au cours de cette étude étaient les suivants (Figure 31) :

- *Run average speed* (vitesse moyenne du déplacement)
- *Swing speed* (vitesse de propulsion) : vitesse de la patte pendant le swing. Le swing étant défini comme étant la durée (exprimée en seconde) d'absence de contact de la patte avec la plaque de verre.

- *Stride length* (longueur de la foulée) : distance entre les placements successifs de la même patte.
- *Print area* (surface de l’empreinte) : surface de l’empreinte complète (y compris les doigts).
- *Base of support* (base de soutien) : élément de mesure de l’écartement des pattes antérieures ou postérieures lors de la marche.

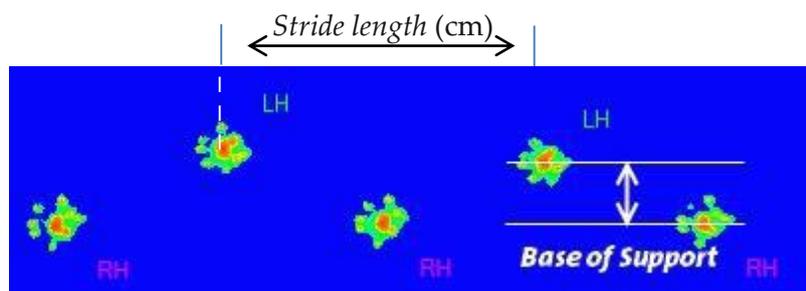


Figure 31 : Principaux paramètres de mesure étudiés sur la CatWalk XT [261] . LH = *Left Hind* ; RH = *Right Hind*.

Les valeurs moyennes des paramètres obtenus à partir de trois marches satisfaisantes étaient calculées pour chaque animal.

#### 4.2.5 Euthanasie

Après pesée, l’euthanasie des cobayes étaient réalisée après l’injection sous cutanée d’un mélange de kétamine (32 mg/kg) et de xylazine (3 mg/kg), suivie d’une ponction de sang intra-cardiaque sous Euthasol 200 mg/kg (Pentobarbital 400 mg/ml). Les organes vitaux principaux étaient observés en vue de détecter d’éventuelles anomalies (cœur, voies digestives et urinaires, glandes surrénales).

#### 4.2.6 Prélèvements post-mortem

Juste après l’euthanasie, le foie et les glandes surrénales étaient pesées. Le rein droit et un morceau de foie étaient fixés dans du paraformaldéhyde 4% avant d’être inclus en paraffine. L’articulation du genou droit de chaque animal était fixée 24h dans du paraformaldéhyde 4% et conservée à 4°C jusqu’à l’analyse histologique.

Le genou droit de chaque animal était prélevé par la section du tibia et du fémur en vue des analyses histologiques. Ensuite, le genou droit était disséqué comme suit (Figure 32) :

- Une dissection grossière de l'articulation était réalisée afin de ne garder qu'une partie du fémur et du tibia (étapes 1 à 3),
- Une coupe coronale 3-4 mm juste devant le ligament était ensuite réalisée (étape 4 et 5),
- le tibia était coupé 5 mm en dessous du cartilage de croissance et le fémur était coupé à ras du plateau tibial.

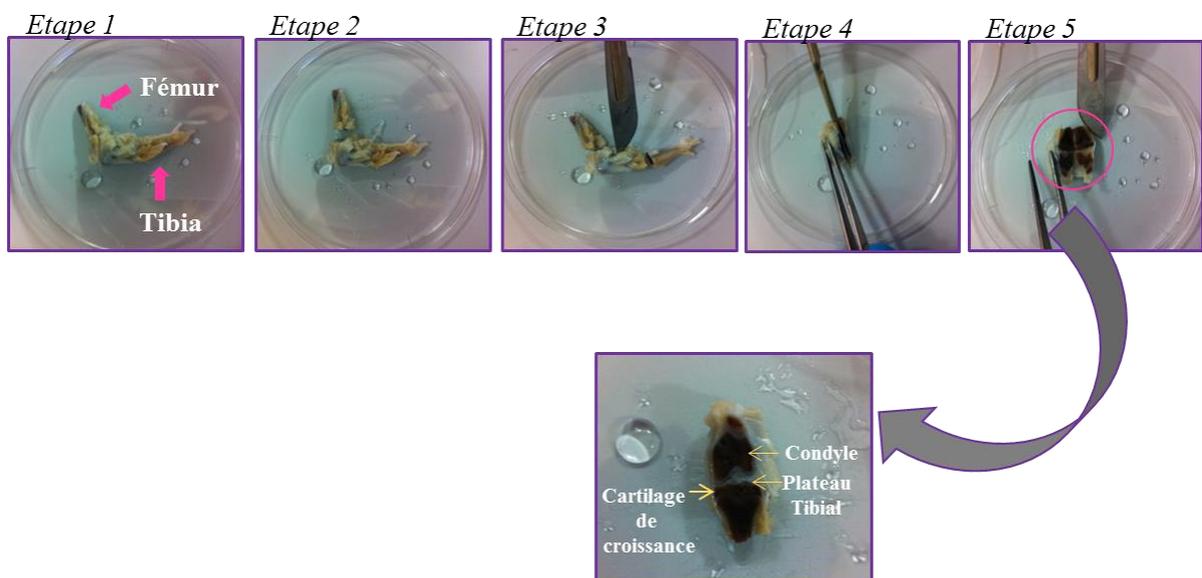


Figure 32 : Schéma illustrant les différentes étapes de la dissection du genou droit.

Le genou gauche de chaque animal était également prélevé en vue de permettre les analyses des propriétés mécaniques du cartilage à l'aide du Mach-1 (Biomomentum, Canada). Pour ce faire, le genou gauche était prélevé par la section du tibia et du fémur. Par la suite, la cavité articulaire était ouverte afin de séparer le plateau tibial et les condyles fémoraux. A ce stade, les quatre compartiments de l'articulation pouvaient être clairement identifiés : le compartiment médial, le compartiment latéral, les condyles fémoraux et le plateau tibial (Figure 33). Le plateau tibial et les condyles fémoraux de chaque animal étaient ensuite stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

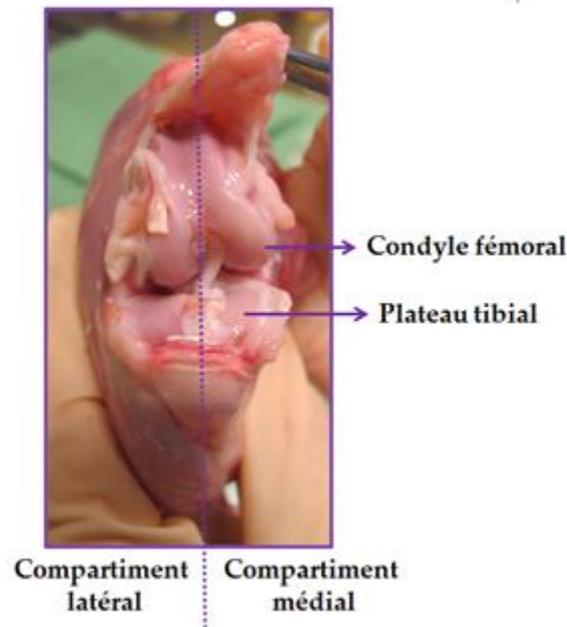


Figure 33 : Compartiments de l'articulation du genou [3].

#### 4.2.7 Analyse histologique des biopsies

##### 4.2.7.1 Décalcification et inclusion en paraffine

Avant l'inclusion en paraffine, les genoux droits des cobayes étaient préalablement décalcifiés pendant 4h à 4°C à l'aide du DC2 medium (VWR, Belgique). Les échantillons décalcifiés étaient ensuite disséqués comme illustré à la figure 15, déshydratés par passages successifs dans des bains de concentrations croissantes en méthanol, incubés dans des bains d'isopropanol puis de xylène et enfin inclus dans la paraffine, à l'aide de l'automate Leica ASP 300S (Leica, Diegem, Belgique). Les blocs de paraffine étaient découpés en sections de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide du microtome Leica RM 2555 (Leica), dans la zone centrale non recouverte par les ménisques, suivant le plan de Cushin (Figure 34), tel que recommandé par l'OARSI.

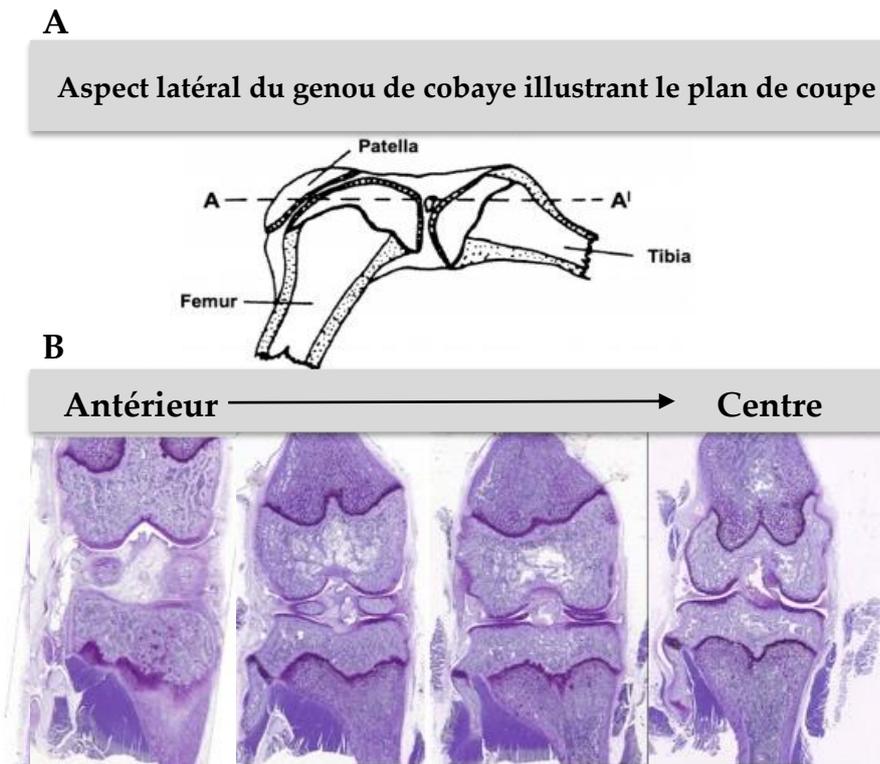


Figure 34 : (A) Plan de coupe de l'articulation du genou du cobaye. (B) Série de quatre sections prises à des intervalles de 200 µm dans le plan coronal. Adapté de Kraus *et al.* [257].

#### 4.2.7.2 Coloration à la safranine-O/fast green

Trois coupes, espacées de 200 µm, réalisées dans les zones dites «portantes» des condyles fémoraux et du plateau tibial étaient colorées à la safranine-O/fast green suivant les recommandations de l'OARSI [257]. Ces coupes étaient déparaffinées et réhydratées par passages successifs dans des bains de xylène, de méthanol en concentrations décroissantes et d'eau déminéralisée. Afin de mettre en évidence les noyaux des chondrocytes présents dans la matrice cartilagineuse, les coupes étaient incubées 5 minutes dans une solution d'hémaréine de Weigert (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les coupes étaient rincées avec de l'eau déminéralisée et incubées 1 minute dans une solution de chlorure ferrique 14 % pour être ensuite, incubées 1 minute dans une solution de fast green 0,2 % (Sigma-Aldrich), rincées dans une solution d'acide acétique 1 % et incubées 2 minutes 30 dans une solution de safranine-O 0,1 % (Sigma-Aldrich). Enfin, les coupes étaient rincées dans du méthanol 100 % et observées au microscope.

### 4.2.7.3 Coloration au bleu de toluidine

Des coupes supplémentaires étaient colorées à l'hématoxyline-éosine suivant les recommandations de l'OARSI [257]. Ces coupes étaient déparaffinées et réhydratées par passages successifs dans des bains de xylène, d'isopropanol en concentrations décroissantes et d'eau déminéralisée. Elles étaient alors incubées 10 minutes dans une solution de bleu de toluidine, rincées avec de l'eau déminéralisée avant d'être observées au microscope.

### 4.2.8 Evaluations histologiques du cartilage

Les coupes colorées à la safranine-O/fast green étaient évaluées en double aveugle selon le score histologique de l'OARSI[257] (Tableau 5). Le score 0 correspondait à une situation normale alors que le score le plus élevé de chaque critère était associé au stade le plus sévère des lésions.

Tableau 5 : Evaluations histologiques des modifications du cartilage selon *Kraus et al.* [257].

Paramètre	Grade	Description
Structure du cartilage articulaire	0	Surface normale, lisse, ininterrompue
	1	Légères irrégularités de surface (ondulations)
	2	Surface irrégulière, 1-3 fissures superficielles ou présence de « franges »
	3	>3 fissures et/ou perte de cartilage <b>dans la zone superficielle</b>
	4	1-3 fissures s'étendant jusque <b>dans la zone moyenne</b>
	5	>3 fissures et/ou perte de cartilage jusque <b>dans la zone moyenne</b>
	6	1-3 fissures s'étendant jusque <b>dans la zone profonde</b>
	7	>3 fissures et/ou perte de cartilage jusque <b>dans la zone profonde</b>
8	Fissures ou perte de cartilage jusque la zone de cartilage calcifié	

<b>Contenu en protéoglycane</b>	0	Uniforme à travers le cartilage articulaire
	1	Diminué uniquement <b>dans la zone superficielle</b> et < à la moitié du condyle/plateau
	2	Diminué uniquement <b>dans la zone superficielle</b> dans plus de la moitié du condyle/plateau
	3	Diminué dans la <b>zone superficielle et moyenne</b> et < à la moitié du condyle/plateau
	4	Diminué dans la <b>zone superficielle et moyenne</b> dans plus de la moitié du condyle/plateau
	5	Diminué <b>dans les 3 zones</b> et < à la moitié du condyle/plateau
	6	Diminué <b>dans les 3 zones</b> dans plus de la moitié du condyle/plateau
<b>Cellularité</b>	0	Normale (1/2 cellules par lacune)
	1	Diffuse/légère hypercellularité
	2	Régions d'hypercellularité et clones
	3	Diffuse hypocellularité
<b>Intégrité de la tidemark</b>	0	<i>Tidemark</i> intacte - une seule <i>tidemark</i>
	1	<i>Tidemark</i> traversée par des vaisseaux et/ou multiple <i>tidemark</i>
<b>Ostéophyte</b>	0	Pas d'ostéophyte
	1	Petit ostéophyte : modification structurelle
	2	Ostéophyte moyen : bosse )
	3	Ostéophyte important : boucle )

#### 4.2.9 Evaluations histologiques de la membrane synoviale

Les membranes synoviales présentes sur les coupes colorées à la safranine-O/fast green étaient également évaluées en double aveugle (Tableau 6). Le score 0 correspondait à une situation normale alors que le score le plus élevé de chaque critère était associé au stade le plus sévère.

Tableau 6 : Scores histologiques pour l'évaluation de la membrane synoviale selon *Kraus et al.* [257].

Paramètre	Grade	Description
Hyperplasie du <i>lining</i> cellulaire	0	1-2 couches de cellules
	1	3-5 couches de cellules
	2	6 couches de cellules ou plus
Hyperplasie des villosités	0	Absence
	1	Peu et courtes
	2	Marquée (forme digitale)
	3	Marquée et diffuse
Degré d'infiltration cellulaire par des lymphocytes et mononucléaires	0	Normale
	1	Quelques cellules éparses
	2	Cellules nombreuses
	3	Début d'organisation de cellules en nodules
	4	Plusieurs nodules
	5	Nombreux nodules

#### 4.2.10 Analyse par indentométrie

Les propriétés mécaniques du cartilage étaient étudiées grâce à l'indentomètre mécanique Mach-1 (Biomomentum, Canada, Figure 35).



Figure 35 : Représentation du testeur mécanique Mach-1 (Biomomentum, Canada).

Ce testeur multiaxial est doté de fonctionnalités propres au logiciel Mach-1 Motion : « Scan XY » et « Normal Indentation ». La fonction « Scan XY » déplace les axes linéaires X et Y vers des positions prédéfinies avant d'exécuter une série d'analyses à chacune de ces positions. Ces dernières peuvent être générées grâce au logiciel « Cartilage Mapping » de Biomomentum. La fonction « Normal Indentation » détecte précisément la hauteur et l'orientation de la surface à la position XY. Il enregistre la charge (avec une cellule de charge multiaxiale) lors du déplacement simultané des trois axes linéaires à différentes vitesses de façon à ce que l'indenteur sphérique suive le profil de déplacement désiré sur un axe normal à la surface de l'échantillon. De plus, une troisième fonction, « Find Contact » déplace quant à elle l'aiguille à vitesse constante alors qu'elle pénètre la surface du cartilage et s'arrête au niveau de l'os.

L'articulation du genou gauche (condyles fémoraux et plateau tibial) de chaque animal était utilisée. Avant l'analyse, les échantillons étaient décongelés à température ambiante dans du tampon phosphate salin (PBS) pendant 30 minutes pour atteindre l'équilibre avant de commencer l'expérience. Par la suite, les condyles fémoraux ou le plateau tibial étaient fixés avec de la colle Loctite® 4013 (Henkel, USA) dans un petit récipient en plastique. Tout au long de l'analyse, l'échantillon était immergé dans un récipient contenant du PBS. En utilisant la vue de dessus de l'échantillon, au moins 50 positions par surface articulaire étaient testées en utilisant le protocole d'indentation et de

mesure d'épaisseur automatisé. Le module instantané, encore appelé Young Modulus (mesure de la rigidité du cartilage) et l'épaisseur étaient calculés en utilisant le logiciel Mach-1 Analysis.

#### 4.2.10.1 Cartographie automatique en indentation

Les propriétés mécaniques étaient cartographiées *ex-vivo*, en utilisant la technique d'indentation à l'aide du Mach-1. Pour ce faire, la technique détectait précisément l'orientation de la surface du cartilage à chaque position et enregistrait la charge normale avec une cellule de charge multiaxiale. Des indentations perpendiculaires étaient obtenues en déplaçant les 3 axes de l'appareil à des vitesses différentes tout en gardant l'indenteur sphérique (diamètre = 0.5 mm) fixe et perpendiculaire à la surface (Figure 36).

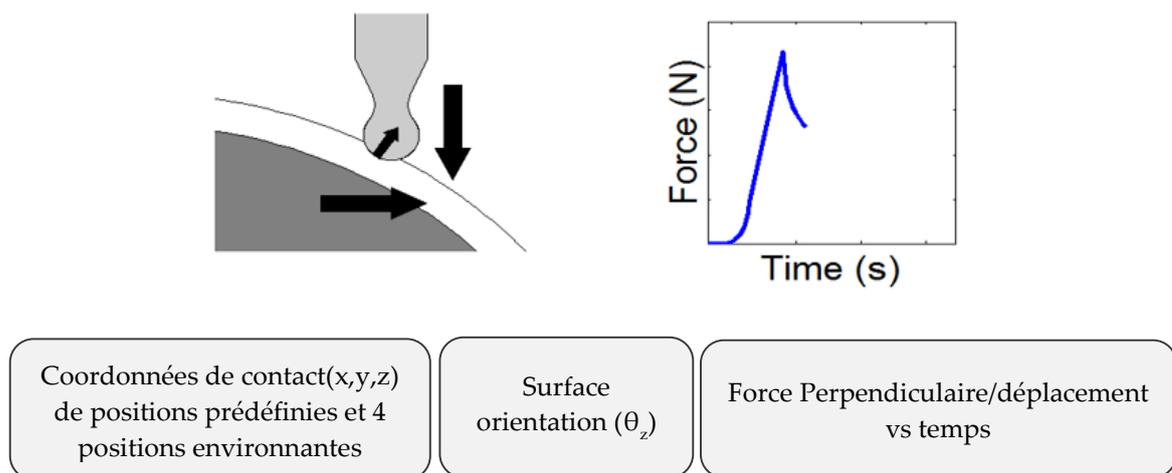


Figure 36 : Illustration de la cartographie automatique en indentation. Le Mach-1 possède 3 axes et il utilise trois composantes de déplacement pour fournir un déplacement perpendiculaire sur la base de l'orientation de la surface. Adapté de *Sim et al.* [260].

#### 4.2.10.2 Cartographie automatique de l'épaisseur

L'épaisseur du cartilage était cartographiée à l'aide de la technique de l'aiguille [262] en remplaçant l'indenteur sphérique par une aiguille (26G 1/2", BD Microlance, VWR, Belgique) à l'aide de la fonction « Scan XY » (décrite précédemment) et de la fonction « Find Contact » (Figure 37). Le Mach-1 déplaçait verticalement l'aiguille vers l'échantillon à une vitesse constante jusqu'à ce qu'elle pénètre dans la surface du cartilage et s'arrête dans l'os.

La différence entre la position verticale de la surface (où la charge commence à augmenter) et la position verticale de l'interface cartilage/os (au point d'inflexion dans la courbe charge/déplacement) était une mesure de l'épaisseur verticale [262]. L'épaisseur du cartilage était calculée en tenant compte de l'orientation de la surface obtenue lors de la cartographie automatique en indentation par la fonction « Normal Indentation ».

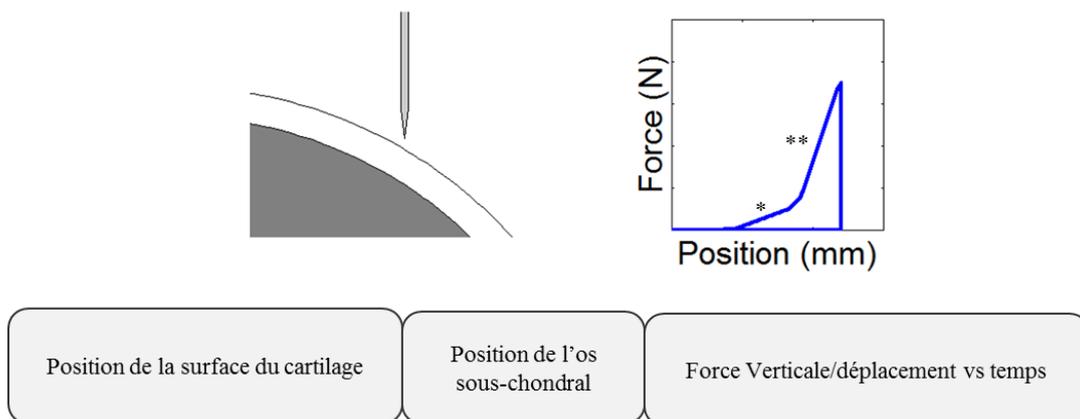


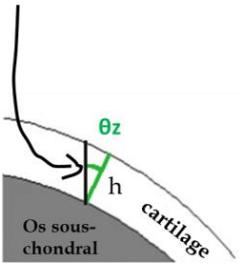
Figure 37 : Illustration de la cartographie automatique de l'épaisseur. L'indenteur sphérique est remplacé par une aiguille. Une petite augmentation de charge (\*) est observée lorsque l'aiguille atteint la surface articulaire. Ensuite, une forte augmentation de la charge (\*\*) est observée lorsque l'aiguille atteint l'os sous-chondral. Adapté de *Sim et al.* [260].

#### 4.2.10.3 Traitement de l'information

A partir des résultats de la cartographie automatique de l'épaisseur, l'épaisseur du cartilage était mesurée à chaque position par la différence entre la position verticale de la surface (où la charge commence à augmenter) et celle de l'interface os/cartilage (correspondant au premier point d'inflexion dans la courbe déplacement/force) (Tableau 7A). Le module instantané à chaque position était obtenu en ajustant la courbe charge-déplacement (avec l'épaisseur correspondante) à un modèle élastique en indentation [263] (Tableau 7B).

Tableau 7 : Traitement des données pour les propriétés mécaniques en indentation. (A) Epaisseur (B) Module instantané. Adapté de *Sim et al.* [260].

Traitement des données pour les propriétés mécaniques en indentation

(A) Epaisseur	(B) Module instantané
<p>Distance verticale = position os sous-chondral – position surface du cartilage</p>  <p>Epaisseur (h) = Distance Verticale x cosinus (<math>\theta_z</math>)</p>	$MI = \frac{P}{H} \cdot \frac{1-\nu^2}{2ak \left(\frac{a}{h}\right)^\nu}$ <p>→</p> <p>P = charge ; H= profondeur d'indentation ; a= rayon de la zone de contact ; <math>\nu</math>= coefficient de Poisson ; k= facteur de correction dépendant de a/h et <math>\nu</math></p>

#### 4.2.11 Analyse d'acides aminés et de protéines glyqués, oxydés et nitrés dans le sérum des cobayes

La teneur en produits de glycation, d'oxydation et de nitration dans le sérum était quantifiée par digestions enzymatiques grâce à une analyse de dilution isotopique stable en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) [240]. Les concentrations d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés ainsi que l'hydroxyproline dans le sérum étaient déterminées de manière similaire dans l'ultrafiltrat sérique. L'ultrafiltrat sérique (50  $\mu$ l) était recueilli par ultrafiltration (seuil de séparation de 10 kDa) à 4°C. La protéine lavée finale (100  $\mu$ l) était délipidée et hydrolysée enzymatiquement [240, 264]. L'hydrolysate de protéine (25  $\mu$ l, équivalent à 32  $\mu$ g) ou l'ultrafiltrat (5  $\mu$ l) était mélangé avec des analytes standards isotopiques stables (en quantités telles qu'indiquées précédemment [265]) et analysés par LC-MS/MS en utilisant un système Acquity™ UPLC couplé à un spectromètre de masse triple quadripolaire en tandem « Xevo TQ-S » (Waters, Manchester, UK). Les échantillons étaient maintenus à 4°C dans l'échantillonneur automatique pendant l'analyse du lot. La source d'ionisation du spectromètre de masse était l'électronébulisation, encore appelée *electrospray*. Les températures de la source d'ionisation et du gaz de désolvatation étaient respectivement de

120°C et 350°C. Le débit de gaz de désolvatation était de 900 L/h et la tension capillaire était de 0,60 Kv. Du gaz argon à la pression de  $5,0 \times 10^{-3}$  mbar était présent dans la cellule de collision.

Les analytes déterminés étaient: les produits d'oxydation, la dityrosine (DT), la N-formylkynurénine (NFK), le semialdéhyde  $\alpha$ -amino adipique (AASA), le sulfoxyde de méthionine (MetSO), le semialdéhyde glutamique (GSA) et le glucosepane (GSP), le produit de nitration 3-nitrotyrosine (3-NT) et les produits de glycation, N $\epsilon$ -fructosyl-lysine (FL), N $\epsilon$ -carboxyméthyl-lysine (CML), N $\epsilon$ -carboxyéthyl-lysine (CEL), N $\epsilon$ -carboxyméthyl-arginine (CMA), l'hydroimidazolone dérivée du glyoxal, l'hydroimidazolone dérivée du méthylglyoxal et la 3-désoxyglucosone (G-H1, MG-H1 et 3DG-H), la pentosidine et leurs acides aminés apparentés. Les concentrations des produits d'oxydation, de nitration et de glycation étaient normalisées par rapport à leurs précurseurs de résidus d'acides aminés et étaient exprimées en mmol/mol d'acide aminé modifié tandis que les concentrations des produits libres apparentés étaient exprimées en  $\mu$ M ou nM. Les structures chimiques et les significations biochimique et clinique de ces analytes ont été décrites antérieurement [266].

#### 4.2.12 Analyses statistiques

Les résultats étaient exprimés par la moyenne  $\pm$  l'erreur type. Le total du score histologique du cartilage et de la membrane synoviale était obtenu par la somme des valeurs moyennes attribuées à chaque critère. Le score 0 correspondait à une situation normale alors que les scores 21 (cartilage) et 10 (membrane synoviale) étaient associés à une sévérité maximum. Il était également considéré pour chaque critère séparément. Les quatre compartiments de l'articulation étaient analysés ensemble mais aussi séparément.

La moyenne des deux scores, après la lecture des trois coupes, était prise en compte pour l'analyse statistique.

L'ensemble des analyses statistiques était effectué avec le logiciel GraphPad Prism, version 6. Le test de normalité D'Agostino & Pearson était réalisé afin d'apprécier la distribution normale de l'échantillon. Les données étaient analysées avec le test de la variance « One-way ANOVA » suivi, si positif, par le post-test de comparaison multiple TUKEY. Les analyses ne présentant que des résultats avec deux conditions expérimentales

ont été comparées avec un test t de Student. Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives lorsque la p-valeur était inférieure à 0,05. Une correction de Bonferroni était appliquée pour les acides aminés glyqués et oxydés, l'hydroxyproline et les protéines sériques citrullinées.

Au vu de la distribution dissymétrique des biomarqueurs, une transformation logarithmique était appliquée afin de satisfaire l'hypothèse de Normalité. Une analyse de la variance (ANOVA) était réalisée afin de comparer chaque biomarqueur ainsi que les différents paramètres dans les groupes d'âge. L'association entre les biomarqueurs et les paramètres était soumise à un test de corrélation. Un modèle de régression multiple comprenant comme variables indépendantes l'âge, le paramètre ainsi qu'un terme d'interaction entre ces deux facteurs était construit afin d'investiguer l'influence de ce paramètre dans la relation biomarqueur - âge (facteur confondant potentiel). Les résultats ont été considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% ( $P < 0,05$ ). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel statistique SAS (version 9.4 pour Windows).

## **4.3 Résultats**

### **4.3.1 Hébergement et évolution du poids**

Soixante cobayes étaient inclus dans cette étude. Tous les animaux étaient soumis à un examen quotidien pendant l'étude. Deux cobayes du dernier groupe sont morts au cours de l'étude (semaines 30 et 31). Au départ, les cobayes avaient le même poids ( $282 \pm 2.5$  g). Pendant l'étude, les 5 groupes ont gagné du poids de la même manière. Aucune différence de poids entre les groupes n'a été observée. A la fin de l'étude (semaine 36), le poids des cobayes était en moyenne de  $1016,4 \pm 25,4$  g (Figure 38).

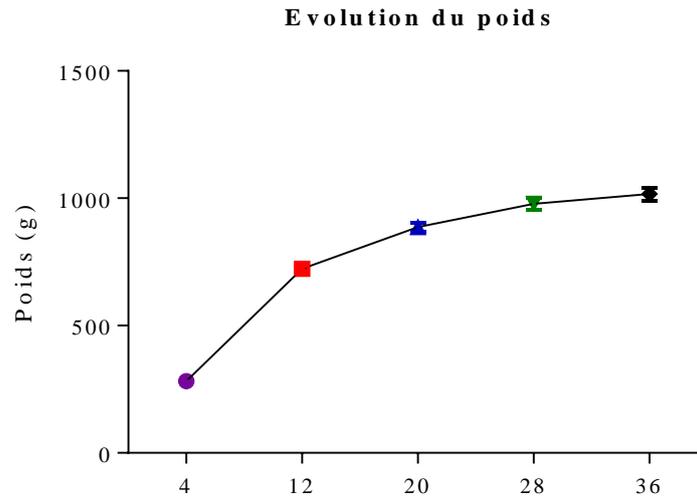


Figure 38 : Evolution du poids des cobayes tout au long de l'étude.

### 4.3.2 CatWalk XT

Grâce à cette technologie, nous avons évalué différentes variables de la capacité locomotrice des cobayes.

#### 4.3.2.1 Vitesse moyenne de déplacement

Une augmentation significative de la vitesse moyenne de déplacement ( $p < 0,01$ , Figure 39) était observée entre les semaines 4 et 28. Ensuite, la vitesse moyenne diminuait entre les semaines 28 et 36.

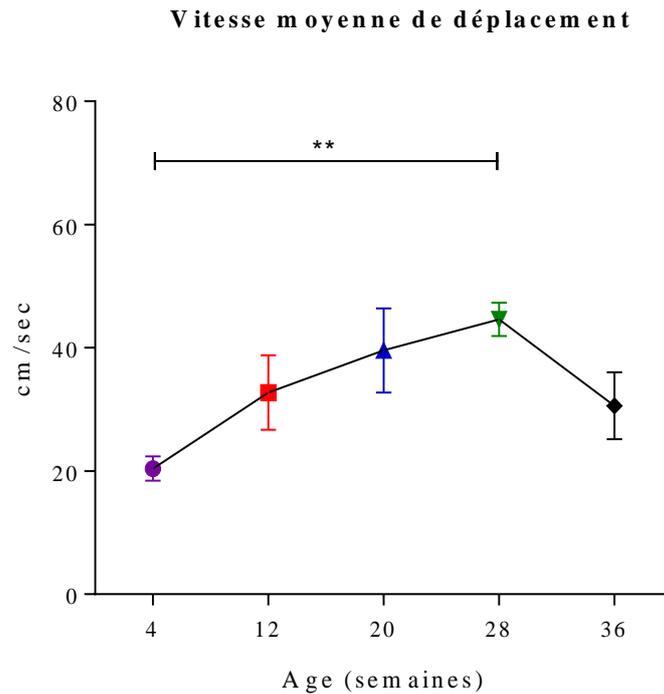


Figure 39 : Vitesse moyenne de déplacement dans chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \*\* =  $p < 0,01$ , One-way ANOVA avec post-test de TUKEY.

#### 4.3.2.2 Vitesse de propulsion

La vitesse de propulsion des membres antérieurs (A) et postérieurs (P) augmentait avec l'âge jusqu'à la semaine 28. Ensuite, elle diminuait légèrement entre les semaines 28 et 36. Avant la semaine 28, la vitesse de propulsion des membres antérieurs était supérieure à celle des membres postérieurs. Cependant, la différence n'était significative qu'à la semaine 12 ( $p < 0,05$ , Figure 40). Aux semaines 28 et 36, les vitesses de propulsion étaient comparables entre les membres antérieurs et postérieurs.

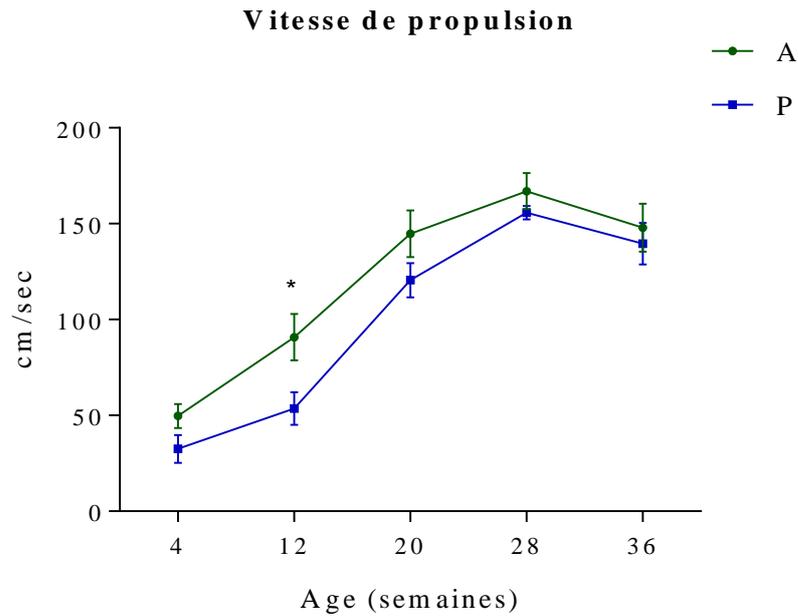


Figure 40 : Vitesse de propulsion dans chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.

#### 4.3.2.3 Longueur de la foulée

Entre les semaines 4 et 28, la longueur de la foulée augmentait avec l'âge. Elle était plus importante pour les pattes antérieures que postérieures aux semaines 4 et 12. La différence entre les pattes antérieures et postérieures était significative à la semaine 4. ( $p < 0,001$ , Figure 41). Par contre, les valeurs étaient comparables aux semaines 20, 28 et 36.

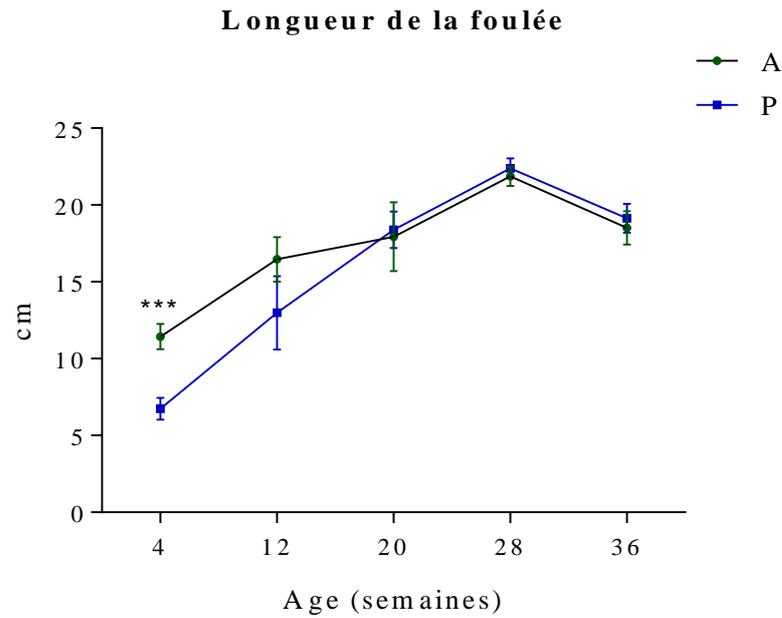


Figure 41 : Longueur de la foulée dans chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \*\*\* =  $p < 0,001$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.

#### 4.3.2.4 Surface de l'empreinte

En général, la surface de l'empreinte des pattes postérieures était moins grande que celles des pattes antérieures. Des différences significatives entre les pattes antérieures et postérieures étaient observées aux semaines 4 ( $p < 0,001$ ), 12 ( $p < 0,001$ ) et 28 ( $p < 0,05$ ) (Figure 42).

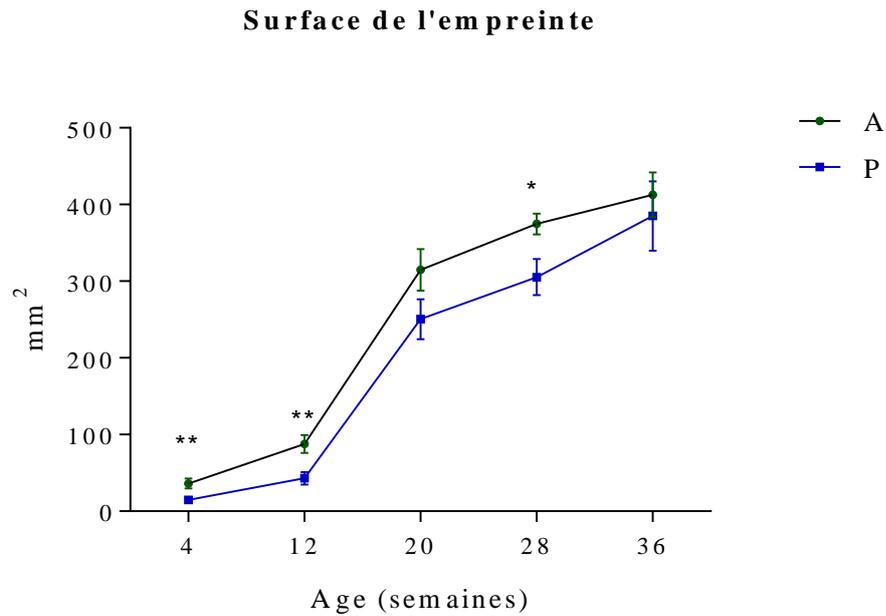


Figure 42 : Surface de l'empreinte dans chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.

#### 4.3.2.5 Base de soutien

La base de soutien arrière était significativement plus élevée que la base de soutien avant et ce durant toute l'observation ( $p < 0,0001$ , Figure 43).



Figure 43: Base de soutien dans chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , t de Student. A = membres antérieurs, et P = membres postérieurs.

### 4.3.3 Evaluations histologiques du cartilage

Les lésions du cartilage, dans les zones dites « portantes » des condyles fémoraux (médial et latéral) et du plateau tibial (médial et latéral) étaient évaluées.

#### 4.3.3.1 Score global

L'évaluation histologique des lésions du cartilage selon les recommandations de l'OARSI montrait que les cobayes développaient spontanément une arthrose sévère du genou (Figure 44).

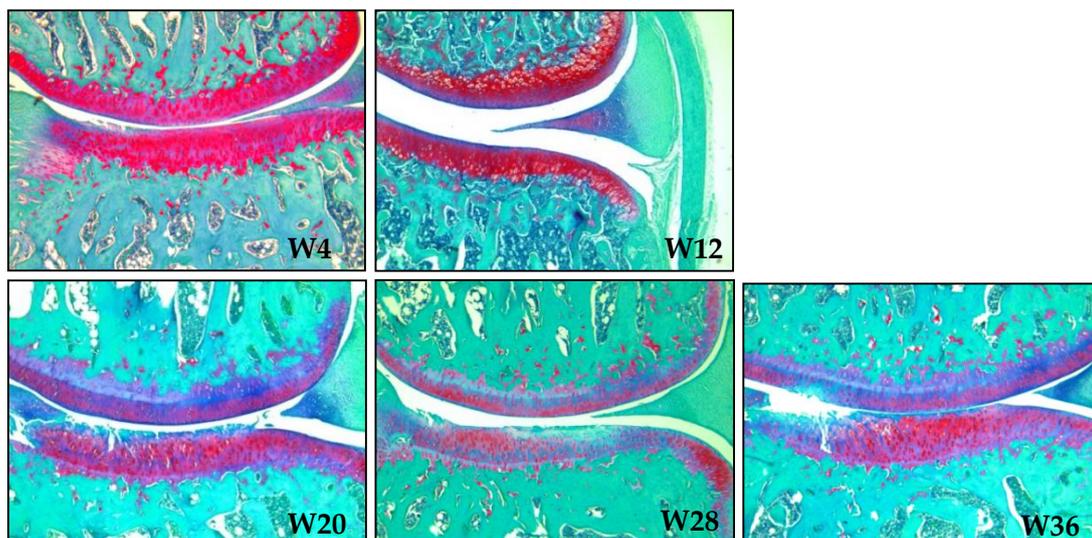


Figure 44 : Images représentatives du compartiment médial de l'articulation droite des cobayes de chaque groupe au fil du temps. Coloration Safranine-O / fast green / hématoxyline, grossissement de 4x.

Chez tous les animaux, le score histologique global, correspondant à la somme des scores des quatre compartiments de l'articulation, augmentait de manière significative avec l'âge jusqu'à la semaine 28 ( $p < 0,0001$  entre la semaine 4 et 28) et ensuite, se stabilisait (entre les semaines 28 et 36) (Figure 45).

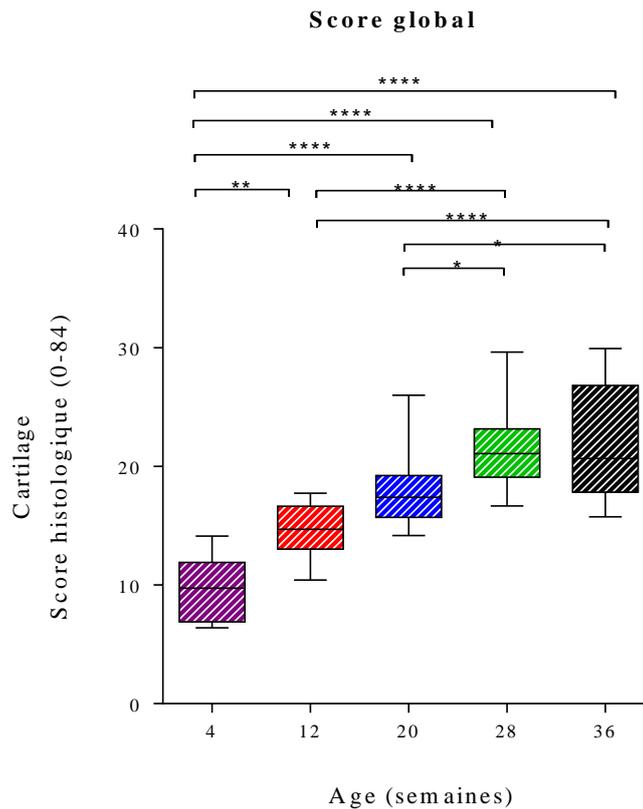


Figure 45: Score histologique global attribué à chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , One-way ANOVA avec post-test de TUKEY.

#### 4.3.3.2 Score des compartiments condyles fémoraux et plateau tibial

L'analyse histologique des condyles fémoraux et du plateau tibial montrait une augmentation significative de la sévérité des lésions histologiques avec l'âge. Cependant, le profil d'augmentation du score histologique n'était pas le même suivant le compartiment étudié. Une augmentation plus lente et moins importante de la sévérité des lésions était observée dans le compartiment fémoral en comparaison au compartiment tibial (Figure 46). A la semaine 36, le score histologique était significativement plus élevé dans le compartiment tibial que dans le compartiment fémoral ( $p = 0,0005$ ).

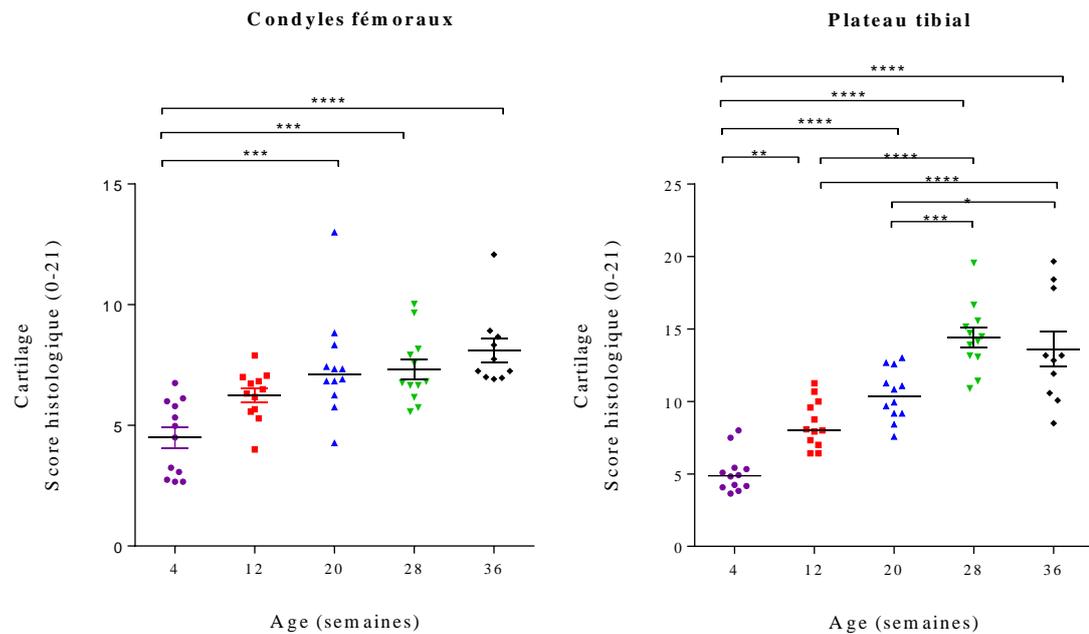


Figure 46 : Score histologique des compartiments condyles fémoraux et plateau tibial du cartilage attribué à chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ , One-way ANOVA avec post-test de TUKEY.

#### 4.3.3.3 Score des compartiments médial et latéral

Nous avons également comparé les lésions dans le compartiment médial et latéral. Pour ce faire, nous avons additionné d'une part, les scores des compartiments médiaux fémoral et tibial et d'autre part, ceux des compartiments latéraux fémoral et tibial. Le score histologique augmentait de manière significative avec l'âge dans tous les compartiments. Cependant, le profil d'augmentation du score histologique n'était pas le même dans tous les compartiments étudiés. Une augmentation plus lente du score histologique avec l'âge était observée dans le compartiment latéral en comparaison à celui du compartiment médial (Figure 47). A la semaine 36, le score histologique était significativement plus élevé dans le compartiment médial que dans le compartiment latéral ( $p = 0,0012$ ).

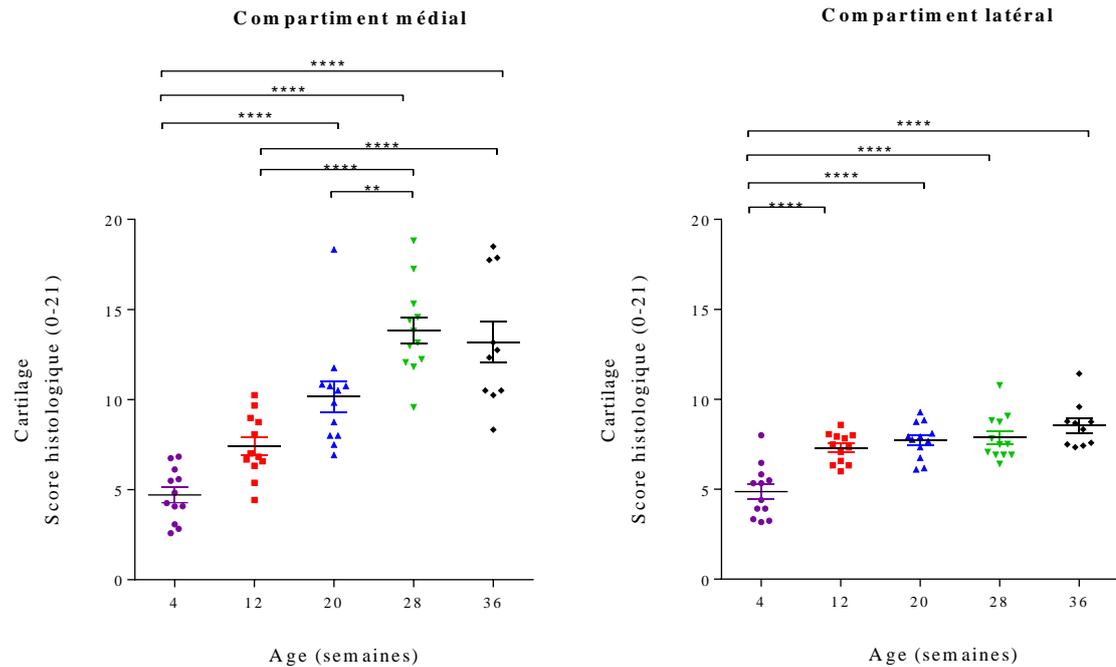


Figure 47 : Score histologique des compartiments médial et latéral du cartilage attribué à chaque groupe. Moyenne  $\pm$ SEM, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA avec post-test de TUKEY.

#### 4.3.4 Evaluations histologiques de la membrane synoviale

Les échantillons de membrane synoviale étaient évalués dans la région en périphérie de la rotule. Le score histologique global était la somme des scores pour les critères hyperplasie cellulaire, hyperplasie des villosités, degré d'infiltration cellulaire par des lymphocytes et mononucléaires.

##### 4.3.4.1 Score global

L'analyse montrait une augmentation significative de la synovite entre les semaines 4 et 28 et les semaines 4 et 36 ( $p < 0,01$ , Figure 48).

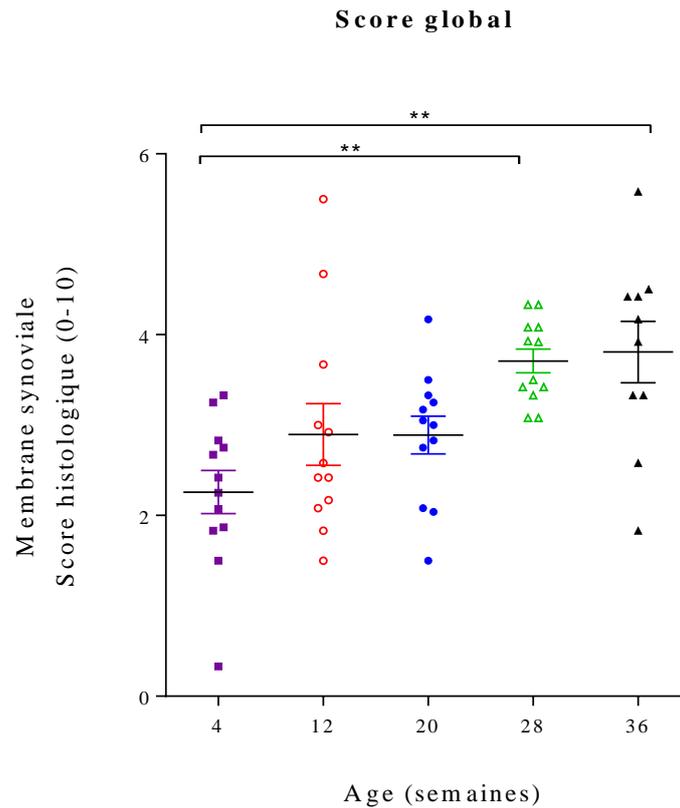


Figure 48 : Score histologique global de la membrane synoviale attribué chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \*\* =  $p < 0,01$ , One-way ANOVA avec post-test TUKEY.

#### 4.3.4.2 Analyse des critères

Une analyse des trois différents critères était également réalisée séparément. Le premier critère analysé était l'hyperplasie des cellules synoviales. Ce critère correspondait au nombre de couches de cellules constituant la membrane synoviale. Le deuxième critère analysé était l'hyperplasie des villosités de la membrane synoviale. Enfin, le dernier critère pris en compte dans cette analyse était le degré d'infiltration cellulaire par des lymphocytes ou des cellules mononucléaires péri-vasculaires.

Une augmentation significative des scores des critères d'hyperplasie était observée (Figure 49). Par contre, le critère infiltration cellulaire par les lymphocytes et les cellules mononucléaires péri-vasculaires n'augmentait pas significativement avec l'âge de l'animal. (Figure 49).

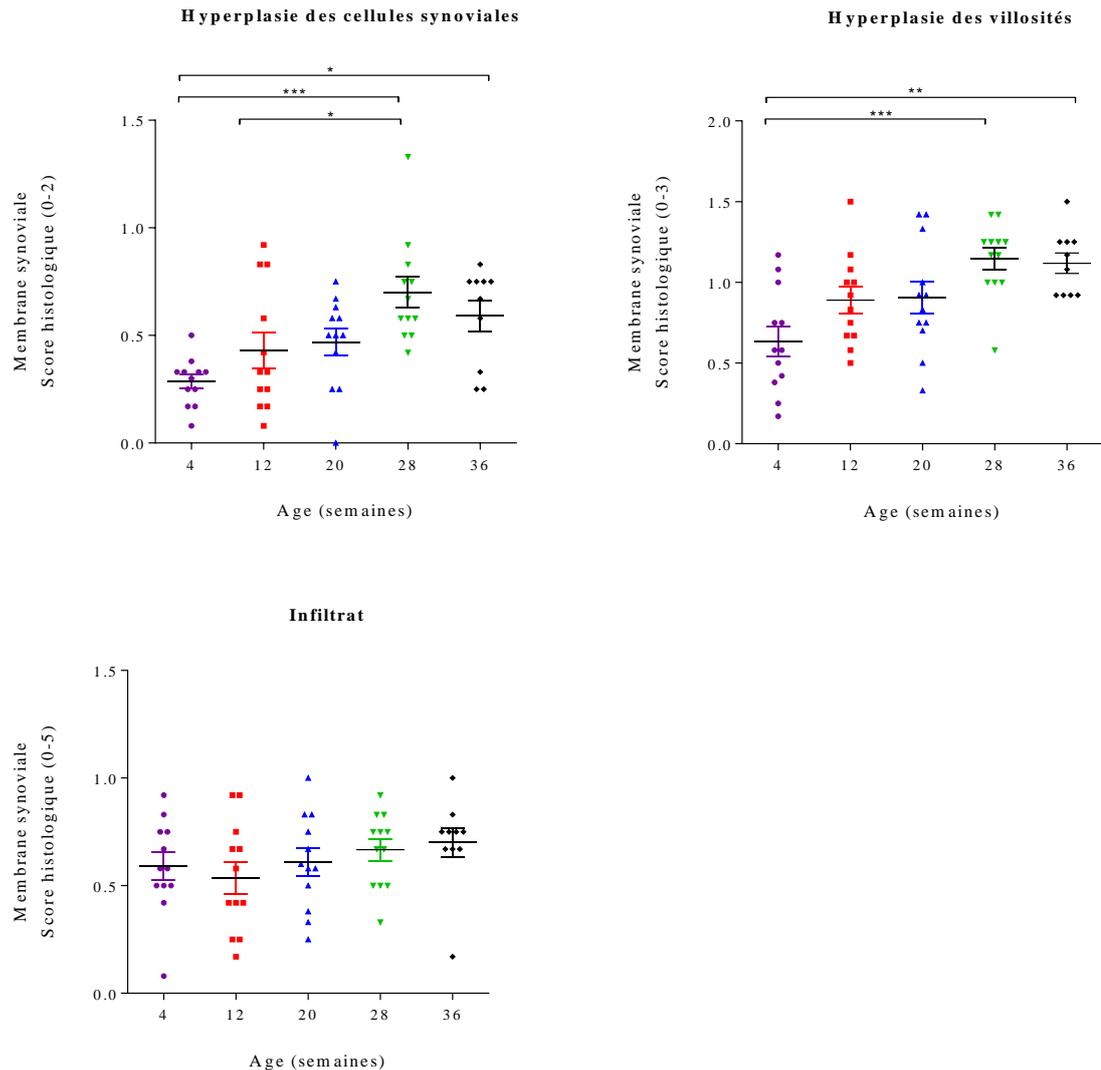


Figure 49 : Score histologique détaillé des différents critères de la membrane synoviale attribué à chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , one-way ANOVA avec post-test de TUKEY.

#### 4.3.5 Mach-1

Les propriétés mécaniques du cartilage étaient étudiées à l'aide du Mach-1 (Biomomentum, Canada). Des différences significatives de l'épaisseur (Figure 50) et du module instantané (Figure 51) au cours du temps étaient observées. L'épaisseur du cartilage diminuait progressivement jusqu'à la semaine 20 et était ensuite stable entre les semaines 28 et 36 (Figure 50). A l'inverse, le module instantané ou rigidité du cartilage augmentait progressivement entre les semaines 4 et 20 (condyles fémoraux,  $p < 0,0001$  ; plateau tibial,  $p < 0,05$ ). Une corrélation significativement négative était observée entre le score

histologique global et l'épaisseur du cartilage (condyles fémoraux :  $r = -0,346$ ,  $p = 0,009$ , plateau tibial :  $r = -0,273$ ,  $p = 0,045$ ). Par contre, une corrélation significativement positive était observée entre le score histologique global et le module instantané (condyles fémoraux :  $r = 0,566$ ,  $p < 0,0001$  ; plateau tibial :  $r = 0,442$ ,  $p = 0,0012$ ). Lorsque les critères histologiques étaient analysés individuellement, il apparaissait que la structure du cartilage et la teneur en protéoglycanes étaient le mieux corrélées avec le module instantané du côté des condyles fémoraux ( $r = 0,581$ ,  $p < 0,0001$  ;  $r = 0,517$ ,  $p < 0,0001$ ). Au niveau du plateau tibial, les associations les plus fortes étaient trouvées entre la structure du cartilage et l'intégrité de la *tidemark* et le module instantané ( $r = 0,435$ ,  $p = 0,0014$  ;  $r = 0,433$ ,  $p = 0,0015$ ).

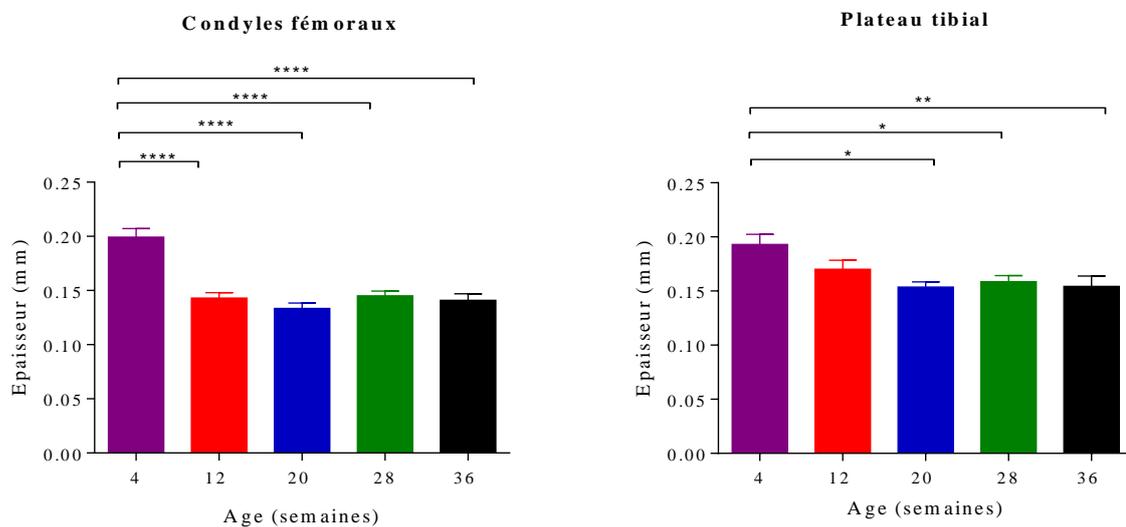


Figure 50 : Distribution de l'épaisseur (condyles fémoraux et plateau tibial) du cartilage attribuée à chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; one-way ANOVA avec post-test de TUKEY.

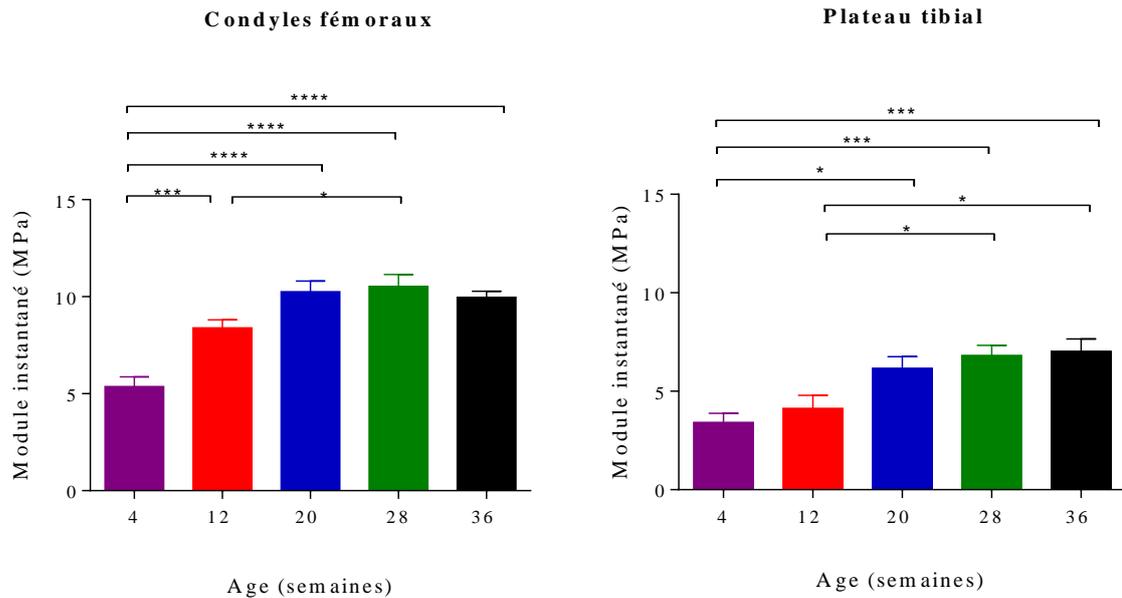


Figure 51 : Distribution du module instantané (condyles fémoraux et plateau tibial) du cartilage dans chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; one-way ANOVA avec post-test de TUKEY.

L'analyse des propriétés mécaniques du cartilage était également réalisée séparément sur les condyles latéral et médial et les plateaux tibiaux latéral et médial (Figure 52).

L'épaisseur du cartilage ne variait pas de manière significative entre le côté médial et le côté latéral du plateau tibial au cours du temps (Figure 52 C). Néanmoins, au niveau des condyles fémoraux, des différences significatives de l'épaisseur étaient observées entre le côté médial et latéral aux semaines 20 ( $p = 0,0098$ ), 28 ( $p = 0,0174$ ) et 36 ( $p = 0,0044$ ) (Figure 52 A). De plus, des différences significatives du module instantané entre les deux côtés étaient observées aux semaines 36 (condyles fémoraux,  $p < 0,0001$ ) et 28 (plateau tibial,  $p = 0,0084$ ) (Figure 52 B et D, respectivement).

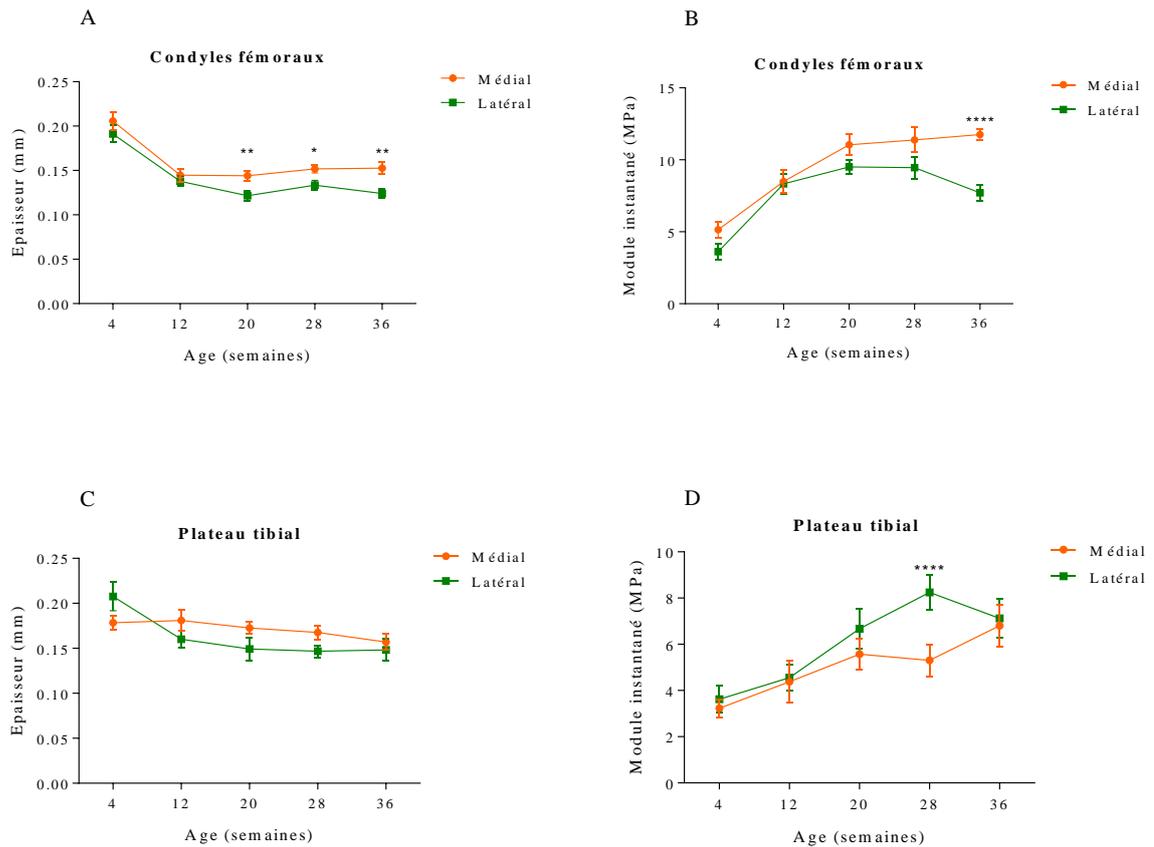


Figure 52: Distribution de l'épaisseur et du module instantané (condyles fémoraux et plateau tibial) du cartilage (côté médial vs côté latéral) attribuée à chaque groupe. Moyenne  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; t de Student.

#### 4.3.6 Analyse d'acides aminés et de protéines glyqués, oxydés et nitrés dans le sérum des cobayes

De nombreux marqueurs (marqueurs de glycation, d'oxydation, de nitration) ont été mesurés dans le sérum des cobayes prélevés à chaque sacrifice.

Les concentrations sériques des produits de glycation FL, G-H1, 3DG-H et CEL restaient inchangées de la semaine 4 à la semaine 28, puis augmentaient de 2 à 3 fois à la semaine 36 (Figures 53 A - C- E- H). Le taux sérique de CMA était significativement plus bas à la semaine 28 qu'à la semaine 4 (Figure 53 D). Les taux sériques de MG-H1, 3DG-H et CML étaient plus faibles aux semaines 12 et 20 qu'à la semaine 4 mais 2 à 3 fois plus élevés à la semaine 36 par rapport à la semaine 4 (Figures 53 B-E-G). Le glucosepane augmentait progressivement avec l'âge des animaux (Figure 53 F).

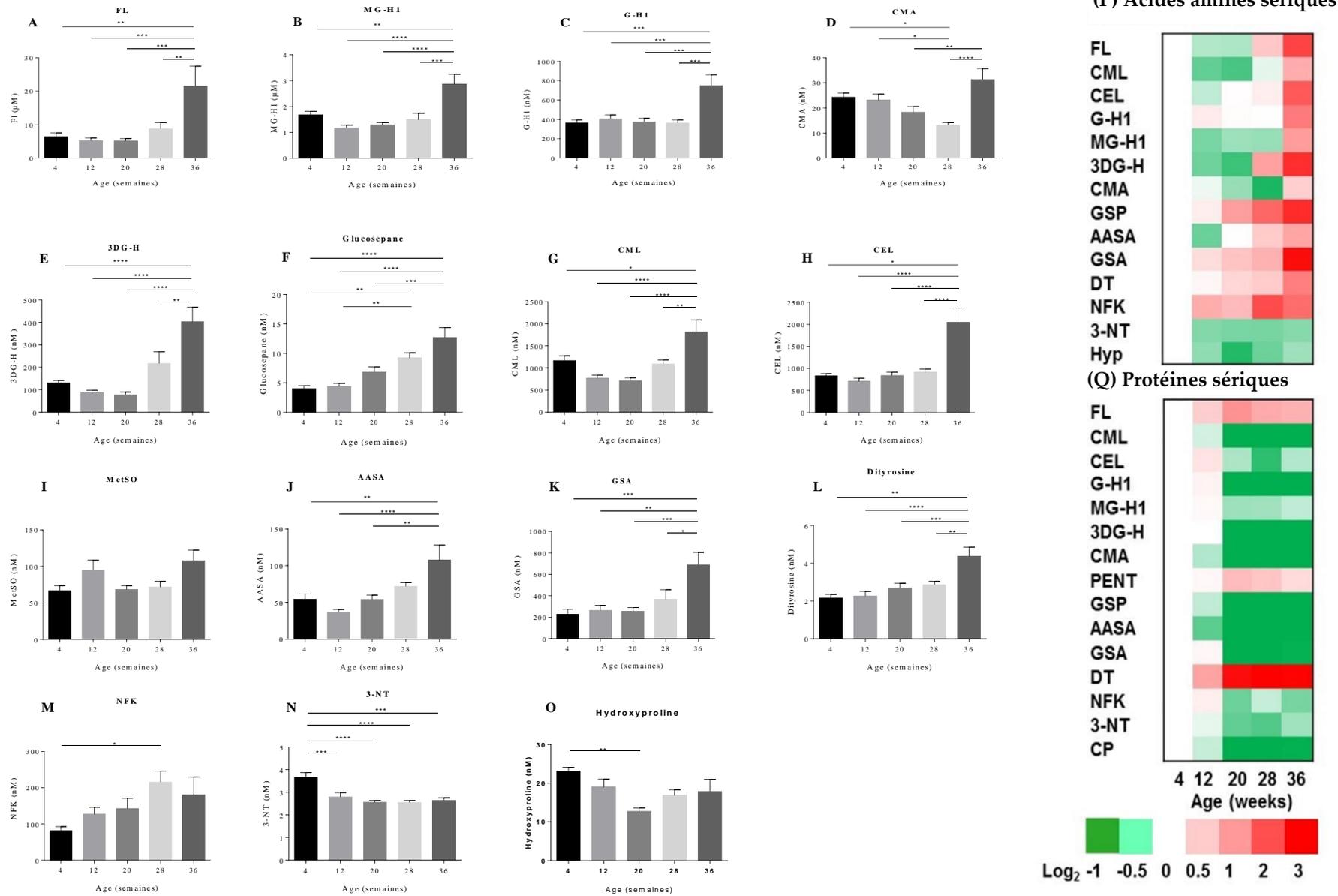
Par rapport à la semaine 4, les taux sériques d'acides aminés oxydés, MetSO, AASA, GSA et Dityrosine (Figure 53 I-J-K-L) étaient significativement plus élevés à la semaine 36 (2 fois plus hauts que les niveaux de base à 4 semaines). Les taux sériques de NFK augmentaient progressivement avec l'âge et étaient significativement plus élevés à la semaine 28 par rapport à la semaine 4 ( $p < 0,05$ ) (Figure 53 M).

Par contre, les concentrations sériques de 3-NT (Figure 53 N) diminuaient entre les semaines 12 et 36 en comparaison avec celles mesurées à la semaine 4. L'hydroxyproline, un marqueur de résorption osseuse diminuait significativement durant les 20 premières semaines et ensuite ré-augmentait légèrement jusqu'à la semaine 36 ( $p < 0,001$ ) (Figure 53 O).

Dans notre modèle de régression multiple, après ajustement avec le poids, nous pouvons conclure que les variations des taux sériques des produits de glycation, d'oxydation et de nitration observés au cours du temps sont dues à l'âge et non au poids des cobayes.

Les taux sériques de la plupart des protéines glyquées, oxydées et nitrées (protéines « modifiées »), diminuaient entre les semaines 12 et 20 et restaient diminués par la suite, excepté pour la pentosidine, FL, et la dityrosine qui augmentaient au cours du temps. Les modifications des taux sériques des acides aminés et de protéines glyqués, oxydés et nitrés dans le sérum des cobayes sont résumées dans les « *heat maps* » (cartes thermiques) (Figure 53 P-Q).

**Figure 53 : Concentrations sériques d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés dans le modèle d'arthrose spontanée chez le cobaye. (A) FL, (B) MG-H1, (C) G-H1, (D) CMA, (E) 3DG-H, (F) GSP, (G) CML et (H) CEL, (I) MetSO, (J) AASA, (K) GSA, (L) DT, (M) NFK, (N) 3-NT, (O) Hydroxyproline. Moyenne  $\pm$  SEM (nM). Significativité : \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; One-way ANOVA avec post-test de TUKEY. Représentation des « *heat maps* » des taux sériques des acides aminés (P) et de protéines (Q) glyqués, oxydés et nitrés.**



Dans les analyses de corrélation, la plupart des produits sériques de glycation et d'oxydation étaient corrélés les uns aux autres, les corrélations étant principalement attribuables à l'augmentation marquée de la plupart des produits à la semaine 36.

CMA et 3-NT étaient positivement corrélés à la pyrraline ( $r = 0,73$  et  $r = 0,52$ ,  $p < 0,001$ ) alors que NFK était corrélé négativement à la pyrraline. FL, AGE à l'exception du CMA et des marqueurs d'oxydation sauf NFK et 3-NT corrélaient positivement ensemble ( $r = 0,48 - 0,92$ ,  $p < 0,001$ ). L'hydroxyproline était positivement corrélée à CML ( $0,59$ ,  $p < 0,001$ ). Par contre, il n'y avait pas de corrélation entre les produits de glycation, d'oxydation et de nitration avec les protéines citrullinées (PC) - Tableau 8.

Tableau 8 : Corrélation entre les acides aminés glyqués, oxydés et nitrés et l'hydroxyproline. Corrélations statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) après une correction de Bonferroni de 15.

Analyte															
Pyrraline															
FL															
CML		0,69													
CEL		0,69	0,88												
G-H1		0,66	0,86	0,92											
MG-H1		0,77	0,85	0,91	0,84										
3DG-H		0,83	0,72	0,79	0,69	0,85									
CMA	0,73					0,44									
GSP		0,51	0,60	0,60	0,50	0,52	0,59								
AASA		0,56	0,57	0,56	0,50	0,60	0,64		0,47						
GSA		0,73	0,63	0,70	0,69	0,66	0,65	0,52	0,49	0,62					
DT		0,48	0,65	0,77	0,74	0,75	0,63		0,59	0,54	0,61				
NFK	- 0,47								- 0,43	0,47					
3-NT	0,52													- 0,43	
Hyp			0,59												
	Pyrraline	FL	CML	CEL	G-H1	MG-H1	3DG-H	CMA	GSP	AASA	GSA	DT	NFK	3-NT	Hyp

FL ( $r = 0,33$ ), G-H1 ( $r = 0,26$ ), 3DG-H ( $r = 0,27$ , tous  $p < 0,05$ ) et CEL ( $r = 0,43$ ,  $p < 0,001$ ) étaient positivement corrélés avec le score histologique global – Tableau 9.

De la même manière, les produits d'oxydation étaient positivement corrélés avec le score histologique global : AASA ( $r = 0,38$ ,  $p < 0,01$ ), GSA ( $r = 0,36$ ,  $p < 0,01$ ), dityrosine ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,001$ ), NFK ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,001$ ) et GSP ( $r = 0,58$ ,  $p < 0,0001$ ) - Tableau 9. En revanche, 3-NT ( $r = -0,46$ ,  $p < 0,001$ ) et CP ( $r = -0,52$ ,  $p < 0,001$ ) étaient corrélés négativement avec le score histologique global - Tableau 9.

**Tableau 9 : Corrélation des acides aminés glyqués, oxydés et nitrés et des protéines citrullinées (CP) avec le score histologique global. Les coefficients de corrélation en gras sont statistiquement significatifs. \* Coefficient de corrélation significatif après application d'une correction de Bonferroni de 15.**

	Score histologique global	
	Coefficient corrélation r	p-valeur
<b>Biomarqueurs</b>		
<i>Produits de glycation</i>		
FL	0,33	0,012
CEL	0,43	0,0007
3DG-H	0,27	0,044
G-H1	0,26	0,046
Glucosepane	0,58	<0,0001*
<i>Produits d'oxydation</i>		
AASA	0,38	0,0029*
Dityrosine	0,42	0,0009*
GSA	0,36	0,0062*
NFK	0,42	0,0011*
<i>Produits de nitration</i>		
3-NT	- 0,46	0,0003*
<i>Autre</i>		
CP	- 0,52	<0,0001*

L'épaisseur du cartilage était corrélée négativement avec GSA (condyles fémoraux :  $r = -0,28$  et plateau tibial :  $r = -0,33$ ,  $p < 0,05$ ) et positivement avec 3-NT ( $p < 0,05$ ) et Hyp (condyles fémoraux :  $r = 0,47$ ,  $p < 0,001$  et plateau tibial :  $r = 0,39$ ,  $p < 0,01$ ). Le module instantané était corrélé positivement avec : le glucosepane (condyles fémoraux :  $r = 0,52$  et plateau tibial :  $r = 0,56$ ,  $p < 0,0001$ ), AASA (condyles fémoraux :  $r = 0,27$ ,  $p < 0,05$  et plateau

tibial :  $r = 0,40$ ,  $p < 0,01$ ), la dityrosine (condyles fémoraux :  $r = 0,01$  et plateau tibial :  $r = 0,35$ ,  $p < 0,05$ ) et NFK (condyles fémoraux :  $r = 0,36$ ,  $p < 0,01$  et plateau tibial :  $r = 0,33$ ,  $p < 0,05$ ). Au contraire, il existait une corrélation négative du module instantané avec 3-NT (condyles fémoraux :  $r = -0,46$ ,  $p < 0,001$  et plateau tibial :  $r = -0,41$ ,  $p < 0,01$ ) et CP (condyles fémoraux :  $r = -0,53$ ,  $p < 0,000$  et plateau tibial :  $r = -0,33$ ,  $p < 0,05$ ) – Tableau 10.

Tableau 10 : Analyse de corrélation des produits de glycation, d'oxydation et de nitration avec les propriétés mécaniques du cartilage analysées par le Mach-1. \* Coefficient de corrélation significatif après application d'une correction de Bonferroni de 15.

Biomarqueurs	Epaisseur				Module instantané			
	Condyles fémoraux		Plateau tibial		Condyles fémoraux		Plateau tibial	
	Coeff. corrélation r	p-valeur						
<i>Produits de glycation</i>								
FL							0,30	0,031
CMA					- 0,32	0,017		
Glucosepane					0,52	<0,0001*	0,56	<0,0001*
<i>Produits d'oxydation</i>								
AASA					0,27	0,043	0,40	0,004
GSA	- 0,29	0,033	- 0,33	0,015			0,35	0,013
Dityrosine					0,34	0,010	0,36	0,010
NFK					0,37	0,006	0,33	0,018
<i>Produits de nitration</i>								
3-NT	0,33	0,013	0,29	0,034	- 0,46	0,0004*	- 0,41	0,003*
<i>Autres</i>								
Hyp	0,47	0,0003*	0,39	0,003*	- 0,38	0,0037		
CP					- 0,53	<0,0001*	- 0,33	0,018

## 4.4 Discussion

### 1. Choix et validation du modèle

Nous avons choisi le cobaye Dunkin-Hartley comme modèle d'arthrose spontanée dans le but d'étudier la relation entre la progression de la pathologie arthrosique et les taux sériques des marqueurs biologiques. Plus particulièrement, nous avons recherché des relations entre la sévérité des lésions histologiques du cartilage et de la membrane synoviale, les propriétés mécaniques du cartilage, ainsi que la mobilité des animaux et les taux de ces marqueurs. Ce modèle est particulièrement attractif car il présente de nombreuses similitudes histopathologiques avec la pathologie humaine. Dans ce modèle, l'apparition de l'arthrose est associée à l'âge et à la prise de poids [267]. L'ensemble des résultats rapportés dans ce travail contribuent à la validation de ce modèle. Les résultats les plus significatifs étaient :

- un développement progressif des lésions du cartilage, principalement au niveau du plateau tibial interne. Nos résultats corroborent ceux de *Huebner et al.* [267] qui ont observés un score histologique plus sévère du côté du compartiment médial en comparaison au compartiment latéral chez la même souche de cobaye. *Horcajada et al.* arrivent également aux mêmes observations que les nôtres [256].

- l'apparition d'une synovite associée aux stades sévères de la maladie. La synovite est une composante importante du processus physiopathologique de l'arthrose qui se caractérise chez l'homme comme chez le cobaye par la prolifération et l'hypertrophie des synoviocytes, l'hyperplasie des villosités et la prolifération des fibroblastes [257]. Ce processus inflammatoire était également augmenté à la semaine 35 chez le cobaye dans l'étude de *Horcajada et al.* [256].

- une augmentation de la rigidité du cartilage au cours du vieillissement de l'animal. Ce phénomène n'avait jamais été objectivé au préalable chez le cobaye.

- une diminution de l'épaisseur du cartilage plus rapide au niveau des condyles fémoraux.

- une diminution de la vitesse moyenne de marche et de la vitesse de propulsion chez les cobayes âgés de 36 semaines.

Ces différents résultats sont discutés dans les paragraphes qui suivent.

## 2. Limitation de l'étude

La limitation majeure de notre étude réside dans l'absence d'un groupe d'animaux ne développant pas ou peu d'arthrose au cours du temps. La souche dénommée Bristol aurait constitué un bon groupe de référence. *Anderson-MacKenzie et al.* ont constaté que les scores radiologiques et histologiques augmentaient progressivement chez les cobayes Dunkin-Hartley mais pas chez les cobayes Bristol, démontrant la pertinence de cette souche comme contrôle [268]. Ces observations ont été confirmées par *Quasnichka et al.* qui ont observé que les signes radiologiques d'arthrose du genou chez les cobayes Bristol étaient deux fois moins élevés que chez les cobayes Dunkin-Hartley à l'âge de 24 semaines [269]. D'autres souches comme la Strain 13 [267], la Weiser-Maple [270] ou la Bristol Strain 2 (BS2) [268, 271] auraient également pu servir de témoin. En effet, la sévérité de la dégradation du cartilage était significativement plus importante chez le Dunkin-Hartley que chez ces souches [268, 271, 272]. Malheureusement, malgré nos recherches et nos nombreux contacts avec des chercheurs travaillant sur ces souches, nous n'avons pas pu les obtenir. Les raisons évoquées étaient l'épuisement de la souche, le coût excessif (plusieurs milliers d'euros) ou encore le refus des propriétaires de ces souches de collaborer.

Une autre piste était d'imposer un régime au Dunkin-Hartley afin de limiter sa prise de poids. En effet, une étude portant sur la restriction de l'apport alimentaire chez le cobaye Dunkin-Hartley a montré qu'une réduction de l'apport alimentaire de 65 % pouvait réduire la sévérité des lésions histologiques du cartilage articulaire de 40 % [273]. Nous aurions donc pu utiliser ce mécanisme pour constituer un groupe témoin de cobayes. Cependant, le régime alimentaire aurait fortement influencé les taux sériques des AGE circulant comme démontré par *Feng et al.* [274]. En effet, l'administration d'une alimentation pauvre en AGE chez des rats était associée à une diminution significative de la concentration sérique en AGE. L'association entre arthrose et taux sériques de marqueurs biologiques n'aurait pas été possible.

### 3. Performance physique du cobaye

Grâce à l'utilisation du CatWalk, nous avons pu étudier la marche des cobayes au cours du vieillissement. Nous avons observé que la vitesse moyenne de déplacement, la vitesse de propulsion et la longueur de la foulée augmentaient entre la 4<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine et ensuite diminuaient entre les semaines 28 et 36. Il est particulièrement intéressant de noter que ces performances physiques chutent durant les 8 dernières semaines de l'observation. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette chute de performance. (1) L'arthrose cause un handicap lié à la douleur mécanique et à la raideur articulaire. Par conséquent, les cobayes se déplacent plus lentement afin d'éviter l'inconfort causé par la mise en charge des articulations. (2) Avec l'âge, les cobayes développent de la sarcopénie, responsable d'une perte de force à l'origine d'une perte de performance. En effet, une étude récente a montré que les cobayes Dunkin-Hartley présentaient une réduction du diamètre des myofibrilles des muscles squelettiques plus importante que chez la souche Strain 13 [275]. (3) L'obésité développée par les cobayes entrave la locomotion et pourrait donc expliquer cette chute de performance. Nous avons observé que la graisse abdominale entre en contact avec le sol chez les animaux les plus gros. Ce contact pourrait ralentir l'animal dans sa marche.

Ces hypothèses sont partiellement supportées par une autre étude qui a comparé la marche entre deux souches de cobayes, l'une développant de l'arthrose (Dunkin-Hartley) et l'autre pas (Strain 13) [276]. Cette étude a démontré que les cobayes développant de l'arthrose avaient des bases de support arrière plus étroites, une longueur de foulée plus courte ainsi que des vitesses de propulsions plus lentes. Ces observations sont en accord avec les nôtres.

### 4. Mach-1

Les tests mécaniques du cartilage réalisés dans ce travail ont été effectués *ex vivo* sur des surfaces entières (condyles fémoraux et plateaux tibiaux) du cartilage de l'articulation des genoux gauche chez le cobaye Dunkin-Hartley.

Ces tests présentent de nombreux avantages comparés à l'histologie. Ils sont rapides et analysent l'ensemble de la surface articulaire contrairement à l'histologie qui analyse la lésion à un endroit bien déterminé [277].

C'est pourquoi, dans notre étude, nous avons complété l'analyse histologique par l'analyse des propriétés mécaniques du cartilage à différents stades d'évolution de la maladie chez le cobaye Dunkin-Hartley. Cette approche nous a permis d'obtenir des informations complémentaires sur la qualité mécanique du cartilage. Cette analyse n'avait pas été réalisée au préalable.

Nous avons observé une diminution progressive de l'épaisseur du cartilage jusqu'à la semaine 20 puis une stabilisation aux semaines 28 et 36 tant au niveau des condyles fémoraux que du plateau tibial. A l'inverse, le module instantané augmentait de manière significative et progressive entre les semaines 4 et 20. Nous avons également démontré la présence de corrélations entre la sévérité des lésions histologiques et les propriétés mécaniques du cartilage. Une corrélation significativement négative était observée entre le score histologique global et l'épaisseur du cartilage. Cela signifie que plus le cartilage est mince et plus la sévérité des lésions du cartilage est élevée. Cette observation était attendue, étant donné que le score histologique intègre la notion d'érosion progressive du cartilage. A l'inverse, une corrélation significativement positive était observée entre le score histologique global et le module instantané. Cela signifie que plus le cartilage est altéré par le processus arthrosique, moins ses propriétés viscoélastiques sont bonnes.

Nous avons ensuite analysé les propriétés mécaniques du cartilage séparément du côté médial et latéral sur les condyles fémoraux et le plateau tibial. Il n'y avait pas de différence significative de l'épaisseur du cartilage entre le côté médial et le côté latéral que ce soit au niveau des condyles fémoraux ou des plateaux tibiaux. Ces observations ne sont pas en adéquation avec les observations des analyses histologiques montrant des lésions plus importantes du côté médial par rapport au côté latéral.

Ces divergences entre les analyses histologiques et la mesure de l'épaisseur peuvent être liées à la méthode utilisée. En effet, l'analyse de l'épaisseur du cartilage par le Mach-1 se fait sur l'ensemble de la surface articulaire alors que l'analyse histologique est effectuée à l'endroit de la lésion. Ceci souligne l'intérêt des deux types de mesure et souligne la difficulté de mettre en relation des changements structurels et rhéologiques.

Contrairement à l'épaisseur, le module instantané (mesuré sur l'ensemble de la surface cartilagineuse), traduisant la dureté du cartilage, augmentait au cours du temps. Ces observations peuvent s'expliquer par l'augmentation de l'épaisseur de la couche calcifiée du cartilage ainsi que par la duplication de la « *tidemark* » et la migration du front de minéralisation vers la surface. En effet, ce phénomène de calcification est largement observé dans le cartilage arthrosique [278].

Le Mach-1 permet également d'étudier séparément différentes régions de la surface, notamment en fonction de leur éloignement de la lésion du cartilage. Une étude récente a permis de souligner l'importance de considérer la variabilité topographique des propriétés mécaniques du cartilage, en particulier dans le cadre de l'évaluation de l'effet d'un traitement [279]. Une étude portant sur l'analyse des propriétés mécaniques du cartilage dans trois espèces animales démontre que l'épaisseur du cartilage et le module instantané pouvaient varier d'un facteur dix sur une distance correspondant à seulement 5% de la largeur totale de la surface articulaire. Il est donc utile de considérer l'ensemble de la surface articulaire lorsque l'objectif de l'étude est de comparer l'effet de plusieurs traitements.

### 5. *Biomarqueurs*

Pour la première fois, en collaboration avec l'Université de Warwick, nous avons montré que les concentrations des acides aminés glyqués et oxydés augmentaient avec l'âge des cobayes Dunkin-Hartley. Grâce à notre modèle de régression multiple, et après ajustement avec le poids, nous pouvons conclure que les variations des taux sériques de ces motifs moléculaires au cours du temps étaient dues à l'âge et pas au poids des cobayes. La majorité de ces biomarqueurs augmentaient à la semaine 36 excepté la 3-NT. Nous suggérons que ces augmentations sont le résultat de deux phénomènes combinés : l'accumulation d'acides aminés glyqués dans la matrice extracellulaire et la protéolyse de celle-ci. Ces deux phénomènes pourraient devenir plus importants à partir d'un certain âge et d'un certain niveau de gravité de la maladie ce qui expliquerait une augmentation de la libération de ces produits dans la circulation chez les animaux arthrosiques les plus âgés. Des études antérieures ont montré une augmentation des marqueurs de dégradation du cartilage COMP, KS, plus particulièrement dans les stades avancés de la maladie [280].

Contrairement aux acides aminés glyqués et oxydés, la concentration sérique de la plupart des protéines glyquées et oxydées diminuait avec l'âge des cobayes, excepté la concentration de pentosidine, FL et de dityrosine qui augmentait (cf. Figure 53). Une observation similaire a été faite chez l'homme par *Ahmed et al.* [264, 265]. Les auteurs interprétaient cette diminution comme une conséquence de l'augmentation de la perméabilité capillaire et de la persistance de l'albumine dans le liquide interstitiel [281]. L'augmentation de la perméabilité capillaire peut être une conséquence de la réaction inflammatoire observée entre la semaine 3 et 12 chez le cobaye Dunkin-Hartley [282] et de l'augmentation de PGE<sub>2</sub>, un vasodilatateur des vaisseaux sanguins [256]. L'albumine a donc un temps de séjour plus court dans le plasma et un temps de séjour plus long dans le liquide interstitiel au niveau des tissus périphériques [265].

L'augmentation des taux sériques de FL et de pentosidine peut s'expliquer par une diminution de la tolérance au glucose liée à la résistance à l'insuline et par une augmentation de l'IL-1 $\beta$  [267], qui a pour conséquence la production accrue de protéines glyquées à un stade précoce ainsi qu'une augmentation des précurseurs de métabolites dérivés de la pentosidine [283]. En effet, *Wang et al.* ont observé des niveaux élevés de pentosidine uniquement en présence de taux élevés en pentose et en stress oxydatif dans le sérum de rats développant de l'obésité. La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) qui catalyse la première réaction de la voie des pentoses phosphates est impliquée dans le mécanisme de résistance à l'insuline. Cette étude suggère que la régulation positive de la G6PD entraîne une augmentation de l'accumulation de pentose et de pentosidine, qui pourrait être associée à la résistance à l'insuline dans un état d'obésité. Le pentose pourrait être un point de connexion entre l'obésité et la résistance à l'insuline [283].

Enfin, nous avons observé une augmentation anormale du taux sérique de dityrosine. La dityrosine est formée par voie enzymatique grâce à la dual oxydase (DUOX) [194]. L'expression de DUOX augmente grâce à l'activation du facteur de transcription 2 (« *Activating transcription factor 2* », ATF2) dans la signalisation inflammatoire [284].

Dans notre étude, nous avons également observé que les taux sériques de glucosepane étaient fortement corrélés aux paramètres histologiques et aux propriétés mécaniques du cartilage. Le glucosepane est formé par la dégradation des résidus de FL et

par la protéolyse subséquente de la protéine glucosepane modifiée. Bien que le glucosepane soit présent dans les protéines alimentaires, son apport ne dépend pas du régime alimentaire, en raison de sa haute ionisation et de sa dissemblance par rapport aux acides aminés normaux, limitant ainsi son absorption intestinale. Le lien étroit entre la concentration sérique du glucosepane et d'une part, le score histologique global et d'autre part, le module instantané du cartilage est probablement dû au fait que le glucosepane sérique est exclusivement endogène et est libéré lors de la protéolyse articulaire du cartilage.

Étonnamment, le produit de nitration 3-NT se comporte de manière différente par rapport aux autres produits de glycation et d'oxydation. Sa concentration sérique diminue avec l'âge des cobayes alors que chez l'homme elle augmente avec le vieillissement [265, 285]. Par contre, chez le cobaye, il est inversement corrélé à la sévérité des lésions du cartilage mais positivement corrélé à l'épaisseur du cartilage. Ces observations laissent penser que, chez le cobaye, ce biomarqueur est un indicateur de bonne santé du cartilage. Cela étant, plusieurs études ont pourtant démontré que la 3-NT est un marqueur du dommage oxydatif et que sa formation est médiée par le peroxy-nitrite [286, 287], suggérant son implication dans la pathogenèse de l'arthrose [287]. De plus, la présence de 3-NT dans le cartilage arthrosique provient de l'activation de voies de nitration et il a été identifié comme marqueur de l'inflammation [288]. Une hypothèse pouvant expliquer ce comportement pourrait provenir des résultats contradictoires concernant le rôle du NO, une molécule impliquée dans la formation de la 3-NT. En effet, en fonction du niveau de production, le NO peut avoir un effet catabolique ou anabolique [289-291]. Le NO favorise la synthèse du collagène dans les cellules humaines de tendon *in vitro* [292]; l'exposition à de faibles niveaux de NO protège les chondrocytes en culture [293]. À l'inverse, l'exposition des ostéoblastes humains à des taux élevés en NO entraîne une diminution de la viabilité cellulaire ainsi qu'une apoptose de ces derniers [294]. De plus, *Damoulis et al.* ont observé que des niveaux élevés en NO étaient corrélés à la perte de viabilité cellulaire dans des cultures d'ostéoblastes de souris [295]. Toutes ces observations montrent qu'en fonction de la concentration en NO, ce dernier peut avoir un effet protecteur ou au contraire destructeur.

Nous avons également observé une diminution des concentrations sériques de pyrraline aux semaines 20 et 28 comparées aux semaines 4, 12 et 36. La pyrraline est un produit avancé de glycation que l'on retrouve essentiellement dans les produits laitiers et les croûtes de pain. Suivant l'apport alimentaire, le taux de pyrraline peut donc fluctuer, ce qui explique le profil atypique de variation de ce produit au cours du temps [296]. Ce produit est par conséquent un indicateur objectif de la consommation alimentaire [297]. La diminution de pyrraline suggère qu'entre les semaines 20 et 28, les cobayes consommaient moins de nourriture qu'aux autres semaines, bien qu'ils montraient une augmentation progressive du poids corporel [273]. Malheureusement, nous n'avons pas évalué les apports quotidiens des cobayes. Cependant, nous avons observé qu'ils avaient moins d'appétit en fin d'étude. Cette perte d'appétit pourrait être liée à la douleur et à une diminution de l'activité volontaire. CML, MG-H1 et 3DG-H sont également tributaires de l'alimentation [297-299]. La diminution du taux sériques de ces marqueurs entre les semaines 12 à 28 pourrait être également la conséquence d'une réduction des apports alimentaires.

En conclusion, cette étude montre que les cobayes développent progressivement des lésions du cartilage. L'analyse Mach-1 nous a permis d'observer d'une part, une augmentation de la rigidité du cartilage au cours du vieillissement de l'animal et, d'autre part, une diminution de l'épaisseur du cartilage. De plus, une diminution de la vitesse moyenne de marche et de la vitesse de propulsion chez les cobayes âgés de 36 semaines a été observée grâce à l'analyse CatWalk. Les produits de glycation et d'oxydation augmentent principalement à la semaine 36. Ces augmentations résultent d'une protéolyse du cartilage articulaire. Le glucosepane, fortement corrélé aux paramètres histologiques ainsi qu'aux propriétés mécaniques du cartilage, est un biomarqueur potentiel de détection et de progression de la maladie arthrosique.

## 5 Partie humaine

### 5.1 Introduction

L'équipe de l'Université de Warwick a récemment exploré les changements sériques du niveau des protéines glyquées et nitrées chez des sujets présentant une arthrose à un stade précoce (eOA) ou avancé (aOA), une arthrite rhumatoïde (eRA), une arthrite inflammatoire autre que l'arthrite rhumatoïde (non-RA) ou chez des sujets sains [265]. Bien que nous n'ayons pas directement contribué à cette partie de l'étude, il nous a semblé intéressant d'intégrer les résultats dans notre manuscrit afin de faciliter l'interprétation des résultats obtenus *in vitro* et chez l'animal. Ils ont été générés dans le cadre d'une collaboration entre les Universités de Warwick et de Liège visant à identifier de nouveaux marqueurs de l'arthrose. Ces résultats ont été inclus dans le papier scientifique intitulé « *Glycation marker glucosepane increases with the progression of osteoarthritis and correlates with morphological and functional changes of cartilage* » soumis récemment (cf. annexe).

### 5.2 Matériel et méthodes

#### 5.2.1 Population

Les sujets sains (n= 29), les patients atteints d'eOA (n= 28), de eRA (n= 35), d'arthrite inflammatoire autre que l'arthrite rhumatoïde (arthrite réactionnelle, pseudogoutte) (non-RA, n= 32) et les patients atteints d'arthrose sévère et avancée de longue durée, avant la chirurgie prothétique du genou (aOA, n= 38) étaient recrutés dans les Cliniques orthopédiques de l'Hôpital Universitaire de Coventry et de Warwickshire (UHCW, Coventry, UK), dans le Département de Rhumatologie de l'Hôpital Ipswich NHS Trust (UK) et du Royal Devon et Exeter NHS Foundation Trust (Exeter, UK) [264, 265]. Les critères d'inclusion de chaque groupe étudié sont repris dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Critères d'inclusion des patients de l'étude.

Groupe d'étude	Critères d'inclusion
Contrôle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence préalable de symptômes articulaires</li> <li>- Absence de maladies arthritiques ou d'autres comorbidités</li> </ul>
eOA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sujets présentant de nouvelles douleurs aux genoux</li> <li>- Radiographie normale du genou</li> <li>- Arthroscopie exploratoire avec des résultats macroscopiques classés en grade I/II selon l'échelle d'Outerbridge</li> </ul>
aOA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Symptômes sévères d'arthrose de longue date ou établis (durée de la maladie <math>\geq 2</math> ans) avec des changements radiographiques correspondants (changements de grade IV de Kellgren- Lawrence sur les radiographies) et infiltration du genou par des corticostéroïdes ou prothèse totale du genou</li> </ul>
Non-RA*	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diagnostic réalisé lorsque les diagnostics rhumatologiques alternatifs expliquent l'arthrite inflammatoire (arthrite réactionnelle, pseudogouttes)[300]</li> </ul>
eRA*	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diagnostic de polyarthrite rhumatoïde réalisé sur base des critères de l'<i>American Rheumatoid Association</i> [301]</li> </ul>

\* Patients recrutés durant les 5 mois suivant le début des symptômes de l'arthrite inflammatoire

### 5.2.2 Analyse des échantillons de sérum des patients

Les produits de glycation, d'oxydation et de nitration étaient quantifiés dans le sérum après digestions enzymatiques en utilisant une analyse de dilution isotopique stable en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le protocole complet est repris au paragraphe 4.2.11 de ce travail.

### 5.2.3 Analyses statistiques

Les résultats étaient exprimés par la médiane (quartile inférieur-supérieur) pour les distributions non-paramétriques. La comparaison entre les médianes des données non-paramétriques étaient analysées par un test U de Mann-Whitney pour les échantillons indépendants. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), version 16.0.

## 5.3 Résultats

Le taux sérique du produit d'oxydation glucosepane était augmenté de 38% chez les patients eOA, 6 fois augmenté chez les patients aOA, 2 fois augmenté chez les patients non-RA et 3 fois augmenté chez les patients eRA (Tableau 12).

**Tableau 12 : Concentrations plasmatiques du glucosepane chez les patients atteints d'arthrose et d'autres maladies arthritiques.**

Groupe d'étude	N	Age (années)	Genre (M/F)	Glucosepane (nM)
Contrôle	29	34,4 ± 8,2	14/15	13,6 (10,1 – 18,1)
eOA	28	43,3 ± 13,3*	12/16	18,7 (13,3 – 35,5)*,ooo
aOA	38	70,7 ± 8,9***	15/23	76,3 (61,2 – 97,5)***
Non-RA	32	51,7 ± 18,1**	14/16	31,2 (20,3 – 45,2)**,ooo
eRA	35	60,4 ± 15,7***	13/22	46,1 (31,1 – 77,8)***,ooo

Médiane (quartile inférieur-supérieur). Significativité : comparaison des 5 groupes –  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis). Pour les comparaisons binaires : \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  par rapport aux niveaux plasmatiques des témoins ; ooo,  $p < 0,001$  par rapport aux niveaux plasmatiques du groupe aOA (Test U de Mann-Whitney).

L'équipe de l'Université de Warwick a également développé des algorithmes en utilisant les données d'analyse clinique pour distinguer les quatre groupes de sujets et les patients suivants : contrôle sain, eOA, eRA, et non-RA. Une approche en deux étapes a été utilisée : (1) distinction entre la maladie et le contrôle sain et (2) distinction entre eOA et eRA et non-RA. Les caractéristiques de l'algorithme 1 étaient les suivantes : les taux d'hydroxyproline sérique associés à ceux des produits d'oxydation, de glycation et de nitration (glucosepane, G-H1, MG-H1, 3DG-H, CEL, CMA, MetSO, 3-NT). Cet algorithme permettait de distinguer les patients et les contrôles avec une sensibilité de 90,4% (88,7-92,1), une bonne spécificité : 83,2% (77,4-89,0) et une aire sous la courbe de 0,93 (0,92-0,94) (Tableau 13). Afin de discriminer les différents types d'arthrite, un deuxième algorithme avec les caractéristiques suivantes a été utilisé : positivité aux anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (ACCP) combinés aux concentrations sériques des produits de glycation, d'oxydation et de nitration (glucosepane, FL, 3DG-H, CML CEL, MeSO et 3-NT). Cet algorithme distingue les patients eOA des patients eRA et non-RA avec une sensibilité de 94% (88,8 – 99,3), une spécificité de 96,1% (92,6 – 99,6) et une aire sous la courbe de 0,98 (0,97 – 0,99) (Tableau 13).

Tableau 13 : Résultat de l'algorithme prédictif (moyenne avec 95% d'intervalle de confiance).

Caractéristiques de l'algorithme	Algorithme 1: Hyp sérique avec les produits GSP, G-H1, MG-H1, 3DG-H, CEL, CMA, MetSO, 3-NT, NFK et DT		Algorithme 2 : positivité des Ac anti-CCP avec les produits GSP, FL, 3DG-H, CML, CEL, MetSO et 3-NT		
	Classification	Maladie-versus-contrôle	eOA vs non-RA & eRA	eRA vs non-RA & eOA	Non-RA vs eRA & eOA
Précision (%)	88,4 (86,9 – 90,0)	95,5 (93,7 – 97,3)	78,1 (74,3 – 82,0)	78,9 (74,7 – 83,2)	
Sensibilité (%)	90,4(88,7 – 92,1)	94,0(88,8 – 99,3)	69,1(54,4 – 83,7)	67,5(46,2 – 88,8)	
Spécificité (%)	83,2 (77,4 – 89,0)	96,1 (92,6 – 99,6)	83,2 (71,8 – 94,6)	84,6 (77,1 – 92,1)	
AUROC	0,93 (0,92 – 0,94)	0,98 (0,97 – 0,99)	0,86 (0,81 – 0,90)	0,88 (0,86 – 0,90)	
<i>Positive likelihood ratio</i>	8,26 (5,77 – 10,75)	16,11 (9,56 – 22,66)	7,66 (2,94 – 12,37)	4,96 (3,31 – 6,60)	
<i>Negative likelihood ratio</i>	0,11 (0,10 – 0,13)	0,06 (0,01 – 0,11)	0,34 (0,20 – 0,48)	0,36 (0,14 – 0,57)	
Valeur prédictive positive (%)	93,6(91,7 – 95,6)	92,8(86,5 – 99,0)	76,3 (65,1 – 87,4)	71,8(62,7 – 80,8)	
Valeur prédictive négative (%)	77,3 (74,4 – 80,2)	97,5 (95,3 – 99,6)	84,4 (79,0 – 89,8)	86,2 (78,9 – 93,4)	
F-score	0,92 (0,91 – 0,93)	0,93 (0,90 – 0,96)	0,69 (0,62 – 0,75)	0,64 (0,49 – 0,79)	

## 5.4 Discussion

Actuellement, le diagnostic de l'arthrose est réalisé sur la base de signes et symptômes qui se révèlent parfois tardivement dans l'évolution de la maladie. Leur mise en évidence requiert un examen clinique précis et l'accès à des techniques d'imagerie médicale comme la radiographie standard ou la résonance magnétique. Les signes visibles à la radiographie standard, par exemple le pincement de l'interligne, sont peu sensibles au changement et nécessitent un suivi de plusieurs années des patients. La résonance magnétique reste difficile d'accès et est très coûteuse en regard de la gravité de l'arthrose. Une alternative est la mesure dans les fluides biologiques de marqueurs reflétant l'activité de la maladie à un stade moléculaire c'est-à-dire durant sa phase « silencieuse » dès qu'apparaissent les premiers changements métaboliques au sein des tissus articulaires. L'identification de nouveaux marqueurs biologiques requiert l'analyse et la comparaison par des techniques de protéomique ou de métabolomique de fluides biologiques de patients atteints de différentes pathologies. Cette approche est appelée « bottom-up » [183]. Cette méthode a été utilisée par notre unité pour mettre en évidence des fragments de la fibuline-3 permettant de distinguer avec une bonne « *area under the receiver operating characteristic curve* » (AUROC) des sujets jeunes sans pathologie articulaire et des patients arthrosiques candidats à une prothèse de genou [302]. Par contre, à ce jour, il n'existe pas de marqueur biologique permettant un diagnostic précoce de l'arthrose, c'est-à-dire avant l'apparition des signes radiologiques. Dans ce travail, nous avons utilisé une technique de dilution isotopique stable en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem afin de détecter les produits de glycation, d'oxydation et de nitration. Dans la polyarthrite rhumatoïde, la détection des anticorps anti-citrullinés permet de détecter les formes précoces de la maladie mais avec une sensibilité faible [265]. Des protéines citrullinées ont été détectées dans le sérum et le fluide synovial de patients arthrosiques à un stade précoce de la maladie [264]. Cette observation est importante, car dans notre travail, en collaboration avec l'Université de Warwick, nous avons également utilisé ce marqueur pour distinguer les formes précoces et tardives d'arthrose.

De façon remarquable, nous avons démontré que le glucosepane sérique était augmenté chez les sujets présentant une arthrose et que le taux de ce marqueur était

significativement plus élevé dans la forme avancée (aOA) que dans la forme précoce (eOA) de la maladie. Nous avons également montré qu'un algorithme incluant un test positif pour les anticorps anti-CPP associé au glucosepane et à d'autres produits de glycation, d'oxydation et de nitration permettait de discriminer avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité, l'arthrose précoce de la polyarthrite rhumatoïde précoce. Malgré une moins bonne sensibilité, cet algorithme permettait également de distinguer les sujets sans pathologie des sujets avec une arthrose précoce. Cette observation suggère que la mesure de ces produits dans le sérum sont des biomarqueurs potentiels de diagnostic de l'arthrose avant l'apparition des signes radiologiques [256, 264, 265]. Cette découverte est importante car elle ouvre la porte à un dépistage de la maladie et la mise en œuvre de mesures de prévention. L'utilisation dans la routine médicale de la spectrométrie de masse permet d'envisager cette perspective. Cependant, des études complémentaires effectuées sur des échantillons plus grands de patients et de sujets sains sont nécessaires afin de déterminer les valeurs de référence permettant un diagnostic précis. La détection des produits d'oxydation, de glycation et de nitration sera également utile au développement de traitements limitant l'oxydation et la glycation du collagène. Ces marqueurs biologiques pourront être utilisés comme marqueurs transversaux au cours des différentes phases de développement d'un médicament et comme test compagnon dans le cadre d'une prise en charge personnalisée du patient.

Cette étude clinique apporte un aspect translationnel à notre recherche. Cependant, plusieurs étapes dont la qualification clinique, l'acceptation par les autorités réglementaires ainsi que l'autorisation de mise sur le marché sont encore nécessaires pour permettre l'utilisation de ces marqueurs en médecine humaine.

En conclusion, la présente étude clinique a permis d'élaborer un algorithme de diagnostic multi-classes afin de répondre aux besoins cliniques jusqu'à ce jour non rencontrés, de diagnostiquer de manière précoce l'arthrose. La combinaison des anticorps anti-CPP avec les produits de glycation, d'oxydation et de nitration a permis une détection ainsi qu'une discrimination spécifiques et sensibles de l'eOA, l'eRA et la non-RA.

## 6 Conclusions générales et perspectives

L'arthrose est une pathologie articulaire d'origine plurifactorielle touchant plus d'un million d'individus en Belgique. Considérée comme un problème de santé publique majeur chez les seniors, elle est responsable de nombreux coûts directs générés, notamment par le nombre croissant de poses de prothèses de hanche et de genou. Le processus physiopathologique affecte toute l'articulation (le cartilage articulaire, l'os sous-chondral, la membrane synoviale, les ménisques, les ligaments, les muscles et les nerfs).

A ce jour, le diagnostic de l'arthrose repose essentiellement sur l'observation de signes cliniques et radiologiques. Ceux-ci apparaissent tardivement, alors que les lésions sont déjà présentes au niveau des articulations. Un diagnostic pré-radiographique permettrait de mieux prévenir et traiter la maladie.

Une alternative intéressante est la mesure de marqueurs biologiques dans le sang, l'urine ou le liquide synovial, qui pourraient refléter des changements métaboliques dans les tissus articulaires, et par conséquent, l'apparition de la maladie, sa progression ou encore l'efficacité d'un traitement. Dans ce contexte, les modèles animaux sont pertinents pour étudier la phase précoce de l'arthrose, également appelée « phase silencieuse » ou « moléculaire » de la maladie qui précède l'apparition des lésions structurelles visibles à la radiographie ou à l'IRM ainsi que les changements métaboliques se produisant dans les tissus articulaires.

Dans le cadre de notre travail et dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques, notre Unité de Recherche en collaboration avec l'Université de Warwick s'est intéressée aux produits de glycation, d'oxydation et de nitration *in vitro*, chez l'animal et finalement chez l'homme. Dans un premier temps, nous avons étudié *in vitro* la production de ces produits par les chondrocytes humains cultivés en multicouches.

Au terme de ce travail *in vitro*, nous pouvons énoncer les conclusions qui suivent :

1. L'IL-1 $\beta$  favorise la formation d'un grand nombre de produits de glycation, d'oxydation et de nitration.

L'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M augmentait la concentration des produits de glycation CEL, G-H1, CMA, 3DG-H et Glucosepane dans le milieu de culture conditionné par les chondrocytes humains cultivés en multicouches. Par contre, l'IL-1 $\beta$  n'avait pas d'effet sur les concentrations de FL et CML alors qu'elle augmentait significativement la production de 3-NT.

En résumé, ces expériences *in vitro* ont mis en évidence le rôle joué par l'IL-1 $\beta$  dans la production de certains AGE. Certains acides aminés sériques pourraient être des biomarqueurs appréciables de l'arthrose, tout particulièrement le glucosepane et la dityrosine.

Ce travail *in vitro* ouvre de nombreuses perspectives de recherches :

- tester les effets d'autres cytokines impliquées dans la pathogénie de l'arthrose sur la genèse des AGE ;
- comparer la production des produits de glycation, d'oxydation et de nitration par des chondrocytes arthrosiques et normaux ;
- étudier l'accumulation des AGE dans la matrice extracellulaire en utilisant un modèle de culture d'explants de cartilage ou de chondrocytes en trois dimensions (par exemple billes d'alginate ou multicouches) ;
- étudier les produits avancés de glycation, d'oxydation et de nitration par d'autres types cellulaires, comme les ostéoblastes et les synoviocytes ;
- étudier l'influence des produits avancés de glycation, d'oxydation et de nitration sur le métabolisme des chondrocytes mais également des synoviocytes ou des ostéoblastes ;
- étudier les produits de glycation, d'oxydation et de nitration sur les chondrocytes cultivés en faible tension en oxygène.

La deuxième partie de notre recherche était consacrée à l'étude des corrélations entre les produits de glycation, d'oxydation et de nitration et la sévérité des lésions histologiques (score OARSI), les propriétés mécaniques du cartilage (MACH-1) et les paramètres de marche (CatWalk) chez le cobaye Dunkin-Hartley, développant spontanément de l'arthrose.

Les résultats suivants ont été obtenus :

1. une diminution de la vitesse moyenne de marche et de la vitesse de propulsion chez les cobayes âgés de 36 semaines ;
2. un développement progressif des lésions du cartilage, principalement au niveau du plateau tibial interne ;
3. l'apparition d'une synovite associée aux stades sévères de la maladie ;
4. une diminution de l'épaisseur du cartilage et une augmentation du module instantané en fonction de l'âge des cobayes ;
5. une corrélation significativement négative entre le score histologique global et l'épaisseur du cartilage. Une corrélation significativement positive entre le score histologique global et le module instantané ;
6. une corrélation entre le contenu en protéoglycane et le module instantané du côté des condyles fémoraux et entre l'intégrité de la *tidemark* et le module instantané au niveau des plateaux tibiaux ;
7. une augmentation des niveaux sériques d'acides aminés glyqués, oxydés et nitrés avec l'âge des animaux ;
8. des corrélations significativement positives entre le glucosepane et le score histologique global et le module instantané. Des corrélations significativement négatives entre la 3-NT et le score histologique global et le module instantané.

Enfin, une corrélation significativement positive entre la dityrosine et le score histologique global.

Pour résumer, cette étude a montré que les cobayes développaient une arthrose spontanée sévère du genou. L'analyse CatWalk a permis d'observer une diminution de la vitesse moyenne de marche et de la vitesse de propulsion chez les cobayes âgés de 36 semaines. De manière additionnelle à l'histologie, l'étude des propriétés du cartilage à l'aide du Mach-1 nous a permis d'obtenir des informations complémentaires sur les propriétés mécaniques du cartilage. Finalement, l'analyse des produits avancés de glycation dans le sérum des cobayes ouvre de nouvelles pistes dans la recherche de nouveaux biomarqueurs de l'arthrose.

Cette étude *in vivo* permet d'envisager de nombreuses perspectives de recherche :

- réaliser une étude similaire en incluant une souche contrôle de cobayes ne développant pas ou peu d'arthrose ;
- rechercher des corrélations avec d'autres marqueurs de la dégradation du cartilage et de l'inflammation (PGE<sub>2</sub>, CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17) ;
- tester l'influence de composés pharmacologiques, plus particulièrement ceux à visées antioxydantes comme des polyphénols, vitamines A et C, les bêta-carotènes ou encore l'acide urique.

Enfin, l'étude clinique réalisée en collaboration avec l'Université de Warwick et les différents centres médicaux associés a permis de donner un aspect translationnel à notre recherche. Les résultats de cette étude sont les suivants :

1. Le glucosepane sérique est significativement plus élevé dans la forme avancée que dans la forme précoce de la maladie arthrosique ;
2. Un algorithme incluant un test positif pour les anticorps anti-CPP associé au glucosepane et à d'autres produits de glycation, d'oxydation et de nitration permet

de discriminer avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité, l'arthrose précoce de la polyarthrite rhumatoïde précoce.

Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de cet algorithme dans la pratique clinique. Bien évidemment, des études confirmatoires portant sur des échantillons de plus grande taille doivent être réalisées. De plus, diverses étapes dont la qualification clinique mais également l'acceptation par les autorités habilitées et l'autorisation de mise sur le marché sont nécessaires afin de permettre l'utilisation de ces marqueurs en médecine humaine.

L'ensemble de ces résultats contribuent à une meilleure compréhension de l'implication des produits de glycation, d'oxydation et de nitration dans la pathogénie de l'arthrose. De nouvelles pistes de réflexion ainsi que des biomarqueurs potentiels permettant de détecter l'apparition de la maladie arthrosique ont été dégagées et identifiées à l'issue de ce travail de recherche. Néanmoins, des études complémentaires mériteraient d'être réalisées afin de compléter la portée de nos présentes observations.

## 7 Références bibliographiques

1. Willett, T.L., et al., *Enhanced levels of non-enzymatic glycation and pentosidine crosslinking in spontaneous osteoarthritis progression*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012. **20**(7): p. 736-44.
2. Morin, Y., (sous la dir. de) *Larousse Médical*. In: Larousse Ed. Larousse Médical. Paris 1996.
3. Oprenyesz, F., *Mise au point d'un biomatériau à base de chitosan pour le traitement de l'arthrose*. 2015, Université de Liège.
4. Marieb, E., *Anatomie et physiologie humaine*. 1999.
5. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(6): p. 1697-707.
6. Vignon, E., [*Structure and metabolism of articular cartilage*]. *Pathol Biol (Paris)*, 1971. **19**(15): p. 771-85.
7. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. *Br Med Bull*, 2008. **87**: p. 77-95.
8. Maroudas, A., *Transport of solutes through cartilage: permeability to large molecules*. *J Anat*, 1976. **122**(Pt 2): p. 335-47.
9. Laadhar, L., et al., [*Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: risk factors and inflammatory mechanisms*]. *Rev Med Interne*, 2007. **28**(8): p. 531-6.
10. Chevalier, X., [*Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage*]. *Presse Med*, 1998. **27**(2): p. 75-80.
11. Chevalier, X. and P. Richette, *Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement*. EMC - Rhumatologie-Orthopédie, 2005. **2**(1): p. 41-58.
12. Sanchez, C., *Mise au point d'un modèle de co-culture chondrocytes/ostéoblastes sous-chondraux humains*. 2005, Université de Liège.
13. Jay, G.D., D.A. Harris, and C.J. Cha, *Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3)Gal-GalNAc oligosaccharides*. *Glycoconj J*, 2001. **18**(10): p. 807-15.
14. Teshima, R., et al., *Immunohistochemical collagen analysis of the most superficial layer in adult articular cartilage*. *J Orthop Sci*, 2004. **9**(3): p. 270-3.
15. Vignon, É., *Structure et métabolisme du cartilage articulaire*. *Revue du Rhumatisme*, 2000. **67**: p. 112-118.
16. Heinen, E., *Histologie humaine - tomes 1-2. Note de cours: Université de Liège*. 2006.
17. Corvol, M.T., *The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis*. *Joint Bone Spine*, 2000. **67**(6): p. 557-60.
18. Mobasher, A., et al., *Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis*. *Histol Histopathol*, 2002. **17**(4): p. 1239-67.
19. Sanchez, C., et al., *Chondrocyte secretome: a source of novel insights and exploratory biomarkers of osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017.
20. Thonar E.J.M.A, M.K., Manicourt D.H., Kuettner K.E., *Structure and function of normal human adult articular cartilage. Osteoarthritis, clinical and experimental aspects, édité par Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. & Henrotin Y. . Springer 1999, Berlin, p. 1-19.*

21. Urban, J.P., *Present perspectives on cartilage and chondrocyte mechanobiology*. Biorheology, 2000. **37**(1-2): p. 185-90.
22. Heinegard, D. and T. Saxne, *The role of the cartilage matrix in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(1): p. 50-6.
23. Kiani, C., et al., *Structure and function of aggrecan*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 19-32.
24. Hardingham, T.E. and A.J. Fosang, *The structure of aggrecan and its turnover in cartilage*. J Rheumatol Suppl, 1995. **43**: p. 86-90.
25. Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. Arthritis Res, 2002. **4**(1): p. 30-5.
26. Olsen, B.R., *Collagen IX*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(4): p. 555-8.
27. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. Instr Course Lect, 1998. **47**: p. 487-504.
28. Goldring, M.B., *The role of the chondrocyte in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(9): p. 1916-26.
29. Roughley, P.J., *Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage*. Arthritis Res, 2001. **3**(6): p. 342-7.
30. Sobol, E., et al., *Laser-induced regeneration of cartilage*. J Biomed Opt, 2011. **16**(8): p. 080902.
31. Henrotin Y, Pesesse L, and S. C., *L'os sous chondral et l'angiogenèse: deux nouvelles cibles thérapeutiques de l'arthrose*. Réflexions rhumatologiques. 2012; **16**: 19-21.
32. Henrotin, Y., et al., *Osteoarthritis biomarkers derived from cartilage extracellular matrix: Current status and future perspectives*. Ann Phys Rehabil Med, 2016. **59**(3): p. 145-8.
33. Imhof, H., et al., *Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit*. Invest Radiol, 2000. **35**(10): p. 581-8.
34. Duncan, H., et al., *The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study*. J Bone Joint Surg Am, 1987. **69**(8): p. 1212-20.
35. Oprenyesz, F., *Mise au point d'un biomatériau à base de chitosan pour le traitement de l'arthrose*. 2015, Université de Liège.
36. Iwanaga, T., et al., *Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint*. Arch Histol Cytol, 2000. **63**(1): p. 17-31.
37. Peeters-Joris, C. and G. Vaes, *Degradation of cartilage proteoglycan and collagen by synovial cells. Stimulation by macrophages under activation by phagocytosis, lymphocyte factors, bacterial products or other inflammatory stimuli*. Biochim Biophys Acta, 1984. **804**(4): p. 474-86.
38. Roy, S. and J. Bhawan, *Bacterial phagocytosis by synovial cells*. Lancet, 1971. **2**(7731): p. 980.
39. Okada, Y., I. Nakanishi, and K. Kajikawa, *Secretory granules of B-cells in the synovial membrane. An ultrastructural and cytochemical study*. Cell Tissue Res, 1981. **216**(1): p. 131-41.
40. Khan, F. and S.R. Ahmad, *Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application*. Macromol Biosci, 2013. **13**(4): p. 395-421.
41. Smith, M.D., *The normal synovium*. Open Rheumatol J, 2011. **5**: p. 100-6.
42. Ropes, M.W., E.C. Rossmeisl, and W. Bauer, *THE ORIGIN AND NATURE OF NORMAL HUMAN SYNOVIAL FLUID*. J Clin Invest, 1940. **19**(6): p. 795-9.
43. Bonnevie, E.D., et al., *Elastoviscous Transitions of Articular Cartilage Reveal a Mechanism of Synergy between Lubricin and Hyaluronic Acid*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0143415.
44. Jay, G.D., D.E. Britt, and C.J. Cha, *Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts*. J Rheumatol, 2000. **27**(3): p. 594-600.
45. Blewis, M.E., et al., *Interactive cytokine regulation of synoviocyte lubricant secretion*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(4): p. 1329-37.

46. Comblain, F., *Etudes in vitro et clinique d'actifs nutritionnels pour la prise en charge de l'arthrose chez le chien*. 2016, Université de Liège.
47. Decker, B., et al., *Comparative distribution of proteins and glycoproteins of serum and synovial fluid*. *Arthritis Rheum*, 1959. **2**(2): p. 162-77.
48. Lee, H.G. and M.K. Cowman, *An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution*. *Anal Biochem*, 1994. **219**(2): p. 278-87.
49. Goldring, M.B., *Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines*. *Curr Rheumatol Rep*, 2000. **2**(6): p. 459-65.
50. de Sousa, E.B., et al., *Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives*. *Stem Cell Res Ther*, 2014. **5**(5): p. 112.
51. Jones, E.A., et al., *Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(6): p. 1731-40.
52. Cooper, C., et al., *Mechanical and constitutional risk factors for symptomatic knee osteoarthritis: differences between medial tibiofemoral and patellofemoral disease*. *J Rheumatol*, 1994. **21**(2): p. 307-13.
53. Kraus, V.B., et al., *OARSI Clinical Trials Recommendations: Soluble biomarker assessments in clinical trials in osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. **23**(5): p. 686-97.
54. Poole, A.R., *An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis*. *Front Biosci*, 1999. **4**: p. D662-70.
55. van den Berg, W.B., *The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. *Z Rheumatol*, 1999. **58**(3): p. 136-41.
56. Kemmler, W., et al., *Prevalence of sarcopenia in Germany and the corresponding effect of osteoarthritis in females 70 years and older living in the community: results of the FORMoSA study*. *Clin Interv Aging*, 2015. **10**: p. 1565-73.
57. Varady, N.H. and A.J. Grodzinsky, *Osteoarthritis year in review 2015: mechanics*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016. **24**(1): p. 27-35.
58. Berenbaum, F., *Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. **21**(1): p. 16-21.
59. Sanchez-Heran, A., et al., *Postural Stability in Osteoarthritis of the Knee and Hip: Analysis of Association With Pain Catastrophizing and Fear-Avoidance Beliefs*. *Pm r*, 2016. **8**(7): p. 618-28.
60. Henrotin, Y., *Les marqueurs biologiques de l'arthrose , Rhumatos, Février 2017, Vol 14, N°123*. 2017.
61. Bijlsma, J.W., F. Berenbaum, and F.P. Lafeber, *Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice*. *Lancet*, 2011. **377**(9783): p. 2115-26.
62. Bhatia, D., T. Bejarano, and M. Novo, *Current interventions in the management of knee osteoarthritis*. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013. **5**(1): p. 30-8.
63. Guillemin, F., et al., *Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011. **19**(11): p. 1314-22.
64. J, V.d.H., *Institut Scientifique de Santé Publique: Affections Chroniques. Enquêtes Santé*. 2008.
65. Heyden, J.V.d., *Institut Scientifique de la santé publique: Affections chroniques. Enquête Santé*. 2008.
66. Michael, J.W., K.U. Schluter-Brust, and P. Eysel, *The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee*. *Dtsch Arztebl Int*, 2010. **107**(9): p. 152-62.
67. Srikanth, V.K., et al., *A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(9): p. 769-81.

68. Braga, L., et al., *Differences in radiographic features of knee osteoarthritis in African-Americans and Caucasians: the Johnston county osteoarthritis project*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. **17**(12): p. 1554-61.
69. Carman, W.J., et al., *Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study*. Am J Epidemiol, 1994. **139**(2): p. 119-29.
70. Oliveria, S.A., et al., *Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee*. Epidemiology, 1999. **10**(2): p. 161-6.
71. Conde, J., et al., *Adipokines: novel players in rheumatic diseases*. Discov Med, 2013. **15**(81): p. 73-83.
72. Thijssen, E., A. van Caam, and P.M. van der Kraan, *Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2015. **54**(4): p. 588-600.
73. Sellam, J. and F. Berenbaum, *Is osteoarthritis a metabolic disease?* Joint Bone Spine, 2013. **80**(6): p. 568-73.
74. Zhuo, Q., et al., *Metabolic syndrome meets osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(12): p. 729-37.
75. Day, C., *Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(1): p. 32-8.
76. Yoshimura, N., et al., *Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow-up of the ROAD study*. Osteoarthritis Cartilage, 2012. **20**(11): p. 1217-26.
77. Dahaghin, S., et al., *Do metabolic factors add to the effect of overweight on hand osteoarthritis? The Rotterdam Study*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(7): p. 916-20.
78. Henrotin, Y., *Approche expérimentale de la pathogénie et du traitement de l'arthrose*. 2003, Liège: Université de Liège.
79. Mankin, H.J., et al., *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. J Bone Joint Surg Am, 1971. **53**(3): p. 523-37.
80. Meachim, G. and I.A. Fergie, *Morphological patterns of articular cartilage fibrillation*. J Pathol, 1975. **115**(4): p. 231-40.
81. Hashimoto, S., et al., *Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(9): p. 1632-8.
82. Charlier, E., et al., *Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(12).
83. Sharif, M., et al., *Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 507-15.
84. Heraud, F., A. Heraud, and M.F. Harmand, *Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. Ann Rheum Dis, 2000. **59**(12): p. 959-65.
85. Kim, H.A., et al., *Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis*. J Rheumatol, 2000. **27**(2): p. 455-62.
86. Blanco, F.J., et al., *Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(2): p. 284-9.
87. Shapiro, I.M., et al., *Boning up on autophagy: the role of autophagy in skeletal biology*. Autophagy, 2014. **10**(1): p. 7-19.

88. Almonte-Becerril, M., et al., *Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model*. *Apoptosis*, 2010. **15**(5): p. 631-8.
89. Malemud, C.J., *Changes in proteoglycans in osteoarthritis: biochemistry, ultrastructure and biosynthetic processing*. *J Rheumatol Suppl*, 1991. **27**: p. 60-2.
90. Boivin, G. and R. Lagier, *An ultrastructural study of articular chondrocalcinosis in cases of knee osteoarthritis*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1983. **400**(1): p. 13-29.
91. Oegema, T.R., Jr., et al., *The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis*. *Microsc Res Tech*, 1997. **37**(4): p. 324-32.
92. Bonde, H.V., M.L. Talman, and H. Kofoed, *The area of the tidemark in osteoarthritis--a three-dimensional stereological study in 21 patients*. *Apmis*, 2005. **113**(5): p. 349-52.
93. Pritzker, K.P., et al., *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. **14**(1): p. 13-29.
94. Uygur F, et al., *Subchondral bone and its role in osteoarthritis*. *Open Journal of Orthopedics*, 2015. **5**: p. 355-360.
95. Sanchez, C., et al., *Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(4): p. 1193-203.
96. Grynepas, M.D., et al., *Subchondral bone in osteoarthritis*. *Calcif Tissue Int*, 1991. **49**(1): p. 20-6.
97. Amini, M., et al., *Individual and combined effects of OA-related subchondral bone alterations on proximal tibial surface stiffness: a parametric finite element modeling study*. *Med Eng Phys*, 2015. **37**(8): p. 783-91.
98. Sanchez, C., et al., *Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(2): p. 442-55.
99. van der Kraan, P.M. and W.B. van den Berg, *Osteophytes: relevance and biology*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(3): p. 237-44.
100. Wang, Y., A.J. Teichtahl, and F.M. Cicuttini, *Osteoarthritis year in review 2015: imaging*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016. **24**(1): p. 49-57.
101. Link, T.M. and X. Li, *Bone marrow changes in osteoarthritis*. *Semin Musculoskelet Radiol*, 2011. **15**(3): p. 238-46.
102. Hunter, D.J., et al., *Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(5): p. 1529-35.
103. Pesesse, L., *Contribution à l'étude de la néo-vascularisation du cartilage arthrosique. Identification de la bone sialoprotein comme facteur clé dans l'arthrose*. 2014, Université de Liège.
104. Benito, M.J., et al., *Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(9): p. 1263-7.
105. Haraoui, B., et al., *Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of antirheumatic drugs*. *Arthritis Rheum*, 1991. **34**(2): p. 153-63.
106. Oehler, S., et al., *Subtyping of osteoarthritic synoviopathy*. *Clin Exp Rheumatol*, 2002. **20**(5): p. 633-40.
107. Loeuille, D., 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**(11): p. 3492-501.
108. Revell, P.A., et al., *The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies*. *Ann Rheum Dis*, 1988. **47**(4): p. 300-7.

109. Myers, S.L., et al., *Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee*. J Rheumatol, 1990. **17**(12): p. 1662-9.
110. Lambert, C., et al., *Characterization of synovial angiogenesis in osteoarthritis patients and its modulation by chondroitin sulfate*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(2): p. R58.
111. Tchetverikov, I., et al., *MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(5): p. 694-8.
112. Soltes, L., et al., *Contribution of oxidative-reductive reactions to high-molecular-weight hyaluronan catabolism*. Chem Biodivers, 2005. **2**(9): p. 1242-5.
113. Stankovska, M., et al., *The degradative action of peroxynitrite on high-molecular-weight hyaluronan*. Neuro Endocrinol Lett, 2006. **27 Suppl 2**: p. 31-4.
114. Chow, G., C.B. Knudson, and W. Knudson, *Human hyaluronidase-2 is localized intracellularly in articular chondrocytes and other cultured cell lines*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(12): p. 1312-4.
115. Noble, P.W., *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair*. Matrix Biol, 2002. **21**(1): p. 25-9.
116. West, D.C., et al., *Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1324-6.
117. Hamerman, D., *The biology of osteoarthritis*. N Engl J Med, 1989. **320**(20): p. 1322-30.
118. Aigner, T., et al., *Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(5): p. 578-84.
119. Lorenz, H. and W. Richter, *Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage*. Prog Histochem Cytochem, 2006. **40**(3): p. 135-63.
120. Lorenzo, P., M.T. Bayliss, and D. Heinegard, *Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis*. Matrix Biol, 2004. **23**(6): p. 381-91.
121. Tchetina, E.V., G. Squires, and A.R. Poole, *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**(5): p. 876-86.
122. Pfander, D., B. Swoboda, and T. Kirsch, *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**(5): p. 1777-83.
123. Pullig, O., et al., *Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone*. Calcif Tissue Int, 2000. **67**(3): p. 230-40.
124. Terkeltaub, R., 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**(12): p. 2152-64.
125. Kirsch, T., B. Swoboda, and H. Nah, *Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(4): p. 294-302.
126. Karpouzas, G.A. and R.A. Terkeltaub, *New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification*. Curr Rheumatol Rep, 1999. **1**(2): p. 121-7.
127. Saadia Janani, K.N., Wafae Rachidi, Ouafaa Mkinsi, *Osteoarthritis pathophysiology*. J Pharm Clin 2013 ; 32 (4) : 227-31, 2013.
128. Felson, D.T. and T. Neogi, *Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone?* Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 341-4.

129. Dequeker, J., et al., *Bone density and local growth factors in generalized osteoarthritis*. Microsc Res Tech, 1997. **37**(4): p. 358-71.
130. Fazzalari, N.L., et al., *Comparative study of iliac crest and subchondral femoral bone in osteoarthritic patients*. Bone, 1992. **13**(4): p. 331-5.
131. Lories, R.J. and F.P. Luyten, *The bone-cartilage unit in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(1): p. 43-9.
132. Sowers, M., *Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors*. Curr Opin Rheumatol, 2001. **13**(5): p. 447-51.
133. Sanchez, C., et al., *Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(11): p. 979-87.
134. Nalbant, S., et al., *Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**(1): p. 50-4.
135. Sokolove, J. and C.M. Lepus, *Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013. **5**(2): p. 77-94.
136. Zreiqat, H., et al., *S100A8 and S100A9 in experimental osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(1): p. R16.
137. Rosenberg, J.H., et al., *Damage-associated molecular patterns in the pathogenesis of osteoarthritis: potentially novel therapeutic targets*. Mol Cell Biochem, 2017.
138. Tetlow, L.C., D.J. Adlam, and D.E. Woolley, *Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(3): p. 585-94.
139. Walter, H., et al., *Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation*. Pathol Res Pract, 1998. **194**(2): p. 73-81.
140. Yoshihara, Y., et al., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2000. **59**(6): p. 455-61.
141. Kevorkian, L., et al., *Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(1): p. 131-41.
142. Tanaka, A., et al., *Expression of matrix metalloproteinase-2 in osteoarthritic fibrocartilage from human mandibular condyle*. J Oral Pathol Med, 2000. **29**(7): p. 314-20.
143. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
144. Martel-Pelletier, J., et al., *Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Lab Invest, 1994. **70**(6): p. 807-15.
145. Fosang, A.J. and F.M. Rogerson, *Identifying the human aggrecanase*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(9): p. 1109-16.
146. Ilic, M.Z., et al., *Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage*. Arch Biochem Biophys, 1992. **294**(1): p. 115-22.
147. Sandy, J.D., et al., *The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain*. J Clin Invest, 1992. **89**(5): p. 1512-6.

148. Swingler, T.E., et al., *Degradome expression profiling in human articular cartilage*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(3): p. R96.
149. Flannery, C.R., et al., *Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **251**(3): p. 824-9.
150. Lotz, M., et al., *Cytokine regulation of chondrocyte functions*. *J Rheumatol Suppl*, 1995. **43**: p. 104-8.
151. Chevalier, X., *Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis*. *Biomed Pharmacother*, 1997. **51**(2): p. 58-62.
152. Blanco Garcia, F.J., *Catabolic events in osteoarthritic cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. **7**(3): p. 308-9.
153. Goggs, R., et al., *Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis*. *Vet J*, 2003. **166**(2): p. 140-58.
154. Pelletier, J.P., J. Martel-Pelletier, and S.B. Abramson, *Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(6): p. 1237-47.
155. Pelletier, J.P., et al., *The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation*. *Osteoarthritis Cartilage*, 1996. **4**(1): p. 77-84.
156. Gearing, A.J., et al., *Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases*. *Nature*, 1994. **370**(6490): p. 555-7.
157. Poree, B., et al., *Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(8): p. 4850-65.
158. Sun, J.M., et al., *Serum interleukin-15 levels are associated with severity of pain in patients with knee osteoarthritis*. *Dis Markers*, 2013. **35**(3): p. 203-6.
159. Scanzello, C.R., et al., *Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. **17**(8): p. 1040-8.
160. Henrotin, Y., et al., *Active oxygen species, articular inflammation and cartilage damage*. *Exs*, 1992. **62**: p. 308-22.
161. Henrotin, Y., B. Kurz, and T. Aigner, *Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?* *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(8): p. 643-54.
162. Henrotin, Y.E., P. Bruckner, and J.P. Pujol, *The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(10): p. 747-55.
163. Cho, H., et al., *Study of osteoarthritis treatment with anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase-2 inhibitor and steroids*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 595273.
164. Vos, L.M., et al., *Inflammation is more distinct in temporomandibular joint osteoarthritis compared to the knee joint*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2014. **72**(1): p. 35-40.
165. Smith, J.O., et al., *Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis*. *J Orthop Sci*, 2003. **8**(6): p. 849-57.
166. Bara, J.J., et al., *Articular cartilage glycosaminoglycans inhibit the adhesion of endothelial cells*. *Connect Tissue Res*, 2012. **53**(3): p. 220-8.
167. Hiraki, Y. and C. Shukunami, *Chondromodulin-I as a novel cartilage-specific growth-modulating factor*. *Pediatr Nephrol*, 2000. **14**(7): p. 602-5.

168. Enomoto, H., et al., *Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(1): p. 171-81.
169. Bellahcene, A., et al., *Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis*. *Circ Res*, 2000. **86**(8): p. 885-91.
170. Law, A.Y. and C.K. Wong, *Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs via VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **374**(1-2): p. 73-81.
171. Pesesse, L., et al., *Bone sialoprotein as a potential key factor implicated in the pathophysiology of osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014. **22**(4): p. 547-56.
172. Pfander, D., et al., *Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage*. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59**(6): p. 448-54.
173. Walsh, D.A. and C.I. Pearson, *Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(3): p. 147-53.
174. Nelson, A.E., et al., *A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The chronic osteoarthritis management initiative of the U.S. bone and joint initiative*. *Semin Arthritis Rheum*, 2014. **43**(6): p. 701-12.
175. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(9): p. 981-1000.
176. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. **16**(2): p. 137-62.
177. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. **18**(4): p. 476-99.
178. McAlindon, T.E., et al., *OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014. **22**(3): p. 363-88.
179. Clegg, T.E., D. Caborn, and C. Mauffrey, *Viscosupplementation with hyaluronic acid in the treatment for cartilage lesions: a review of current evidence and future directions*. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2013. **23**(2): p. 119-24.
180. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. **69**(3): p. 89-95.
181. Y, H., *Quid des marqueurs biologiques de l'arthrose. Outil d'évaluation de la réponse métabolique à un traitement par viscosupplémentation*. , in *Congrès de la FFR*. 2016. p. 39-41.
182. Kraus, V.B., et al., *Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011. **19**(5): p. 515-42.
183. Henrotin, Y., et al., *Soluble biomarkers development in osteoarthritis: from discovery to personalized medicine*. *Biomarkers*, 2015. **20**(8): p. 540-6.
184. Kraus, V.B., *Patient Evaluation and OA Study Design: OARSI/Biomarker Qualification*. *Hss j*, 2012. **8**(1): p. 64-5.
185. Bauer, D.C., et al., *Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. **14**(8): p. 723-7.
186. Deberg, M., et al., *One-year follow-up of Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in osteoarthritis patients after hip or knee replacement*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(2): p. 168-74.

187. Deberg, M., et al., *New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(3): p. 258-65.
188. Gharbi, M., M. Deberg, and Y. Henrotin, *Application for proteomic techniques in studying osteoarthritis: a review*. *Front Physiol*, 2011. **2**: p. 90.
189. Garnero, P., et al., *Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage*. *Ann Rheum Dis*, 2001. **60**(6): p. 619-26.
190. Wu, J., et al., *Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(11): p. 3675-84.
191. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *Glycation research in amino acids: a place to call home*. *Amino Acids*, 2012. **42**(4): p. 1087-96.
192. Gillery, P., *[Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus]*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2006. **64**(4): p. 309-14.
193. Sharon, N., *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. Recommendations 1985*. *Eur J Biochem*, 1986. **159**(1): p. 1-6.
194. Edens, W.A., et al., *Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox*. *J Cell Biol*, 2001. **154**(4): p. 879-91.
195. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *Assay of 3-nitrotyrosine in tissues and body fluids by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. *Methods Enzymol*, 2008. **440**: p. 337-59.
196. Hartog, J.W., et al., *Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications*. *Eur J Heart Fail*, 2007. **9**(12): p. 1146-55.
197. Day, J.F., S.R. Thorpe, and J.W. Baynes, *Nonenzymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(3): p. 595-7.
198. Cohen, M.P., *Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin*. *Arch Biochem Biophys*, 2003. **419**(1): p. 25-30.
199. Degenhardt, T.P., S.R. Thorpe, and J.W. Baynes, *Chemical modification of proteins by methylglyoxal*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1998. **44**(7): p. 1139-45.
200. Niwa, T., *3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999. **731**(1): p. 23-36.
201. Yang, S., J.E. Litchfield, and J.W. Baynes, *AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats*. *Arch Biochem Biophys*, 2003. **412**(1): p. 42-6.
202. Baynes, J.W. and S.R. Thorpe, *Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm*. *Diabetes*, 1999. **48**(1): p. 1-9.
203. Bordas-Fondrede, M., et al., *[Glycosylated plasma proteins in chronic renal failure]*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1990. **48**(10): p. 717-21.
204. Sell, D.R. and V.M. Monnier, *End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(2): p. 380-4.
205. Hammes, H.P., et al., *Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy*. *Diabetologia*, 1999. **42**(6): p. 728-36.

206. Hammes, H.P., et al., *Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycoxidation product Nepsilon-(carboxymethyl) lysine independently of glycohaemoglobin concentrations*. Diabetologia, 1999. **42**(5): p. 603-7.
207. Wells-Knecht, K.J., et al., *New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11 Suppl 5**: p. 41-7.
208. Sell, D.R. and V.M. Monnier, *Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process*. J Biol Chem, 1989. **264**(36): p. 21597-602.
209. Hayase, F., et al., *Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction in vivo*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 3758-64.
210. Lyons, T.J., *Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis*. Am J Cardiol, 1993. **71**(6): p. 26b-31b.
211. Yu, P.H. and D.M. Zuo, *Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications*. Diabetologia, 1997. **40**(11): p. 1243-50.
212. Ahmed, N., et al., *Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin*. Biochem J, 2002. **364**(Pt 1): p. 1-14.
213. Thorpe, S.R. and J.W. Baynes, *Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 275-81.
214. Verzijl, N., et al., *Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(1): p. 114-23.
215. D, B.-R., *Produits de glycation avancés. Production et signification physiopathologique*. Cah Nutr Diét, 2003. **38**: p. 122-9.
216. Stitt, A.W., *The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy*. Exp Mol Pathol, 2003. **75**(1): p. 95-108.
217. Berg, T.J., et al., *Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. Metabolism, 1997. **46**(6): p. 661-5.
218. McCance, D.R., et al., *Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2470-8.
219. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 129-46.
220. Thornalley, P.J., *Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1998. **44**(7): p. 1013-23.
221. Verzijl, N., et al., *Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen*. Biochem J, 2000. **350 Pt 2**: p. 381-7.
222. Bank, R.A., et al., *Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage*. Biochem J, 1998. **330 ( Pt 1)**: p. 345-51.
223. Gibson, G.J., et al., *Degradation of the cartilage collagen matrix associated with changes in chondrocytes in osteoarthritis. Assessment by loss of background fluorescence and immunodetection of matrix components*. J Orthop Res, 2001. **19**(1): p. 33-42.

224. Schwab, W., et al., *Immunohistochemical demonstration of -(carboxymethyl)lysine protein adducts in normal and osteoarthritic cartilage*. *Histochem Cell Biol*, 2002. **117**(6): p. 541-6.
225. Takahashi, M., et al., *Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders*. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(5): p. 724-8.
226. Vytasek, R., L. Sedova, and V. Vilim, *Increased concentration of two different advanced glycation end-products detected by enzyme immunoassays with new monoclonal antibodies in sera of patients with rheumatoid arthritis*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010. **11**: p. 83.
227. DeGroot, J., et al., *Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(5): p. 1003-9.
228. DeGroot, J., et al., *Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes*. *Exp Cell Res*, 2001. **266**(2): p. 303-10.
229. Drinda, S., et al., *Identification of the advanced glycation end products N(epsilon)-carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61**(6): p. 488-92.
230. Eaton, C.B., et al., *Sex differences in the association of skin advanced glycation endproducts with knee osteoarthritis progression*. *Arthritis Res Ther*, 2017. **19**(1): p. 36.
231. Huang, W., et al., *Autophagy Protects Advanced Glycation End Product-Induced Apoptosis and Expression of MMP-3 and MMP-13 in Rat Chondrocytes*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 6341919.
232. Yang, Q., et al., *Advanced glycation end products-induced chondrocyte apoptosis through mitochondrial dysfunction in cultured rabbit chondrocyte*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2015. **29**(1): p. 54-61.
233. Nah, S.S., et al., *Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(9): p. 1928-32.
234. Zhao, J., et al., *Memantine inhibits degradation of the articular cartilage extracellular matrix induced by advanced glycation end products (AGEs)*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **91**: p. 1193-1198.
235. Moskowitz, R.W., et al., *Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit*. *Arthritis Rheum*, 1973. **16**(3): p. 397-405.
236. Comblain, F., et al., *Identification of Targets of a New Nutritional Mixture for Osteoarthritis Management Composed by Curcuminoids Extract, Hydrolyzed Collagen and Green Tea Extract*. *PLoS One*, 2016. **11**(6): p. e0156902.
237. Legrand, C., *Étude de la libération des marqueurs dérivés de la fibuline-3 par les chondrocytes sur modèle d'arthrose in vitro*. 2011, Université de Liège.
238. Comblain, F., et al., *Curcuminoids extract, hydrolyzed collagen and green tea extract synergically inhibit inflammatory and catabolic mediator's synthesis by normal bovine and osteoarthritic human chondrocytes in monolayer*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0121654.
239. Labarca, C. and K. Paigen, *A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure*. *Anal Biochem*, 1980. **102**(2): p. 344-52.
240. Rabbani, N., et al., *Assay of methylglyoxal-derived protein and nucleotide AGEs*. *Biochem Soc Trans*, 2014. **42**(2): p. 511-7.
241. Grebe, S.K. and R.J. Singh, *LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here?* *Clin Biochem Rev*, 2011. **32**(1): p. 5-31.
242. Kuettner, K.E., et al., *Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology*. *J Cell Biol*, 1982. **93**(3): p. 743-50.
243. Naranda, J., et al., *Isolation and characterization of human articular chondrocytes from surgical waste after total knee arthroplasty (TKA)*. *PeerJ*, 2017. **5**: p. e3079.

244. Malemud, C.J., *Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date*. *Drugs Aging*, 2010. **27**(2): p. 95-115.
245. Verzijl, N., et al., *Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(50): p. 39027-31.
246. Alikhani, M., et al., *Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(2): p. C850-6.
247. Guimaraes, E.L., et al., *Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells*. *J Hepatol*, 2010. **52**(3): p. 389-97.
248. Aida, Y., et al., *The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes*. *Life Sci*, 2005. **77**(25): p. 3210-21.
249. Mei, L., et al., *Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model*. *PLoS One*, 2017. **12**(4): p. e0176107.
250. Wang, J., G. Wang, and G.W. Sun, *Role of PPARalpha in down-regulating AGE-induced TGF-beta and MMP-9 expressions in chondrocytes*. *Genet Mol Res*, 2016. **15**(2).
251. Hou, F.F., et al., *Aminoguanidine inhibits advanced glycation end products formation on beta2-microglobulin*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. **9**(2): p. 277-83.
252. Hou, F.F., et al., *beta(2)-Microglobulin modified with advanced glycation end products delays monocyte apoptosis*. *Kidney Int*, 2001. **59**(3): p. 990-1002.
253. Mutiu I Kazeem, M.A.A., Musa T Yakubu, Anofi OT Ashafa, *Antiglycation and Hypolipidemic Effects of Polyphenols from Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats* *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2015. **14** (1): p. 55-61
254. Reddy, S., et al., *N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins*. *Biochemistry*, 1995. **34**(34): p. 10872-8.
255. Aswad, H., A. Jalabert, and S. Rome, *Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro*. *BMC Biotechnol*, 2016. **16**: p. 32.
256. Horcajada, M.N., et al., *Oleuropein or rutin consumption decreases the spontaneous development of osteoarthritis in the Hartley guinea pig*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. **23**(1): p. 94-102.
257. Kraus, V.B., et al., *The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. **18 Suppl 3**: p. S35-52.
258. Chen, Y.J., et al., *Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system*. *J Neuroeng Rehabil*, 2014. **11**: p. 62.
259. Ferreira-Gomes, J., et al., *Analgesic effects of lidocaine, morphine and diclofenac on movement-induced nociception, as assessed by the Knee-Bend and CatWalk tests in a rat model of osteoarthritis*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012. **101**(4): p. 617-24.
260. Sotcheadt Sim, I.H., Martin Garon, Eric Quenneville, Michael D. Buschmann, in *Relevance of the Spatial Distribution Pattern of Mechanical Properties of Articular Cartilage in Animal Studies*. 2015: 12th ICRS Worl Congress, 2015.
261. Noldus, *Noldus, Information technology*. 2016. p. 1-15.
262. Jurvelin, J.S., et al., *Comparison of optical, needle probe and ultrasonic techniques for the measurement of articular cartilage thickness*. *J Biomech*, 1995. **28**(2): p. 231-5.

263. Hayes, W.C., et al., *A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage*. J Biomech, 1972. **5**(5): p. 541-51.
264. Ahmed, U., et al., *Biomarkers of early stage osteoarthritis, rheumatoid arthritis and musculoskeletal health*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9259.
265. Ahmed, U., et al., *Protein oxidation, nitration and glycation biomarkers for early-stage diagnosis of osteoarthritis of the knee and typing and progression of arthritic disease*. Arthritis Res Ther, 2016. **18**(1): p. 250.
266. Thornalley, P.J. and N. Rabbani, *Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry--a user's perspective*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(2): p. 818-29.
267. Huebner, J.L., et al., *A comparative analysis of bone and cartilage metabolism in two strains of guinea-pig with varying degrees of naturally occurring osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2002. **10**(10): p. 758-767.
268. Anderson-MacKenzie, J.M., et al., *Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(1): p. 224-36.
269. Quasnicka, H.L., J.M. Anderson-MacKenzie, and A.J. Bailey, *Subchondral bone and ligament changes precede cartilage degradation in guinea pig osteoarthritis*. Biorheology, 2006. **43**(3-4): p. 389-97.
270. Muraoka, T., et al., *Role of subchondral bone in osteoarthritis development: a comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(10): p. 3366-74.
271. Knott, L., et al., *Regulation of osteoarthritis by omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids in a naturally occurring model of disease*. Osteoarthritis Cartilage, 2011. **19**(9): p. 1150-7.
272. Zamli, Z., et al., *Increased chondrocyte apoptosis is associated with progression of osteoarthritis in spontaneous Guinea pig models of the disease*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 17729-43.
273. Bendele, A.M. and J.F. Hulman, *Effects of body weight restriction on the development and progression of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(9): p. 1180-4.
274. Feng, J.X., et al., *Restricted intake of dietary advanced glycation end products retards renal progression in the remnant kidney model*. Kidney Int, 2007. **71**(9): p. 901-11.
275. Robert V Musci, C.A.W., Justin R Reid, Jaime L Laurin, Frederick F Peelor, Adam R Konopka, Kelly S Santangelo, Benjamin F Miller and Karyn L Hamilton, *The Dunkin-Hartley Guinea Pig as a Novel Model for Sarcopenia*. The FASEB Journal, 2017. **vol. 31 no. 1 Supplement 1022.6**
276. Santangelo, K.S., et al., *Quantitative Gait Analysis Detects Significant Differences in Movement between Osteoarthritic and Nonosteoarthritic Guinea Pig Strains before and after Treatment with Flunixin Meglumine*. Arthritis, 2014. **2014**: p. 503519.
277. Sim, S., et al., *Non-destructive electromechanical assessment (Arthro-BST) of human articular cartilage correlates with histological scores and biomechanical properties*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(11): p. 1926-35.
278. Hubert, J., et al., *Hyaline cartilage calcification of the first metatarsophalangeal joint is associated with osteoarthritis but independent of age and BMI*. BMC Musculoskelet Disord, 2016. **17**(1): p. 474.
279. Sim S, C.A., Lavallee AP, Tessier J, Garon M, Quenneville E and Buschmann MD, *Development of a Sequence of Mechanical Tests for Articular Cartilage at a Single Location*. Orthopaedic Research Society Annual Meeting in Orlando, 2016. 2016.

280. Huebner, J.L. and V.B. Kraus, *Assessment of the utility of biomarkers of osteoarthritis in the guinea pig*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. **14**(9): p. 923-30.
281. Masania, J., et al., *Dicarbonyl stress in clinical obesity*. *Glycoconj J*, 2016. **33**(4): p. 581-9.
282. Huebner, J.L., D.R. Seifer, and V.B. Kraus, *A longitudinal analysis of serum cytokines in the Hartley guinea pig model of osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(3): p. 354-6.
283. Wang, F., et al., *Activated glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with insulin resistance by upregulating pentose and pentosidine in diet-induced obesity of rats*. *Horm Metab Res*, 2012. **44**(13): p. 938-42.
284. Ha, E.M., et al., *Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(9): p. 949-57.
285. Misko, T.P., et al., *Characterization of nitrotyrosine as a biomarker for arthritis and joint injury*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. **21**(1): p. 151-6.
286. Ahsan, H., *3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmune conditions*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(10): p. 1392-9.
287. Loeser, R.F., et al., *Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(9): p. 2349-57.
288. Khan, F., A.A. Siddiqui, and R. Ali, *Measurement and significance of 3-nitrotyrosine in systemic lupus erythematosus*. *Scand J Immunol*, 2006. **64**(5): p. 507-14.
289. Abramson, S.B., *Osteoarthritis and nitric oxide*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. **16 Suppl 2**: p. S15-20.
290. Abramson, S.B., *Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2008. **10 Suppl 2**: p. S2.
291. Dijkstra, G., et al., *Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease*. *J Pathol*, 1998. **186**(4): p. 416-21.
292. Xia, W., et al., *Nitric oxide enhances collagen synthesis in cultured human tendon cells*. *J Orthop Res*, 2006. **24**(2): p. 159-72.
293. Tai, Y.T., et al., *Pretreatment with low nitric oxide protects osteoblasts from high nitric oxide-induced apoptotic insults through regulation of c-Jun N-terminal kinase/c-Jun-mediated Bcl-2 gene expression and protein translocation*. *J Orthop Res*, 2007. **25**(5): p. 625-35.
294. Chen, R.M., et al., *Molecular mechanism of nitric oxide-induced osteoblast apoptosis*. *J Orthop Res*, 2005. **23**(2): p. 462-8.
295. Damoulis, P.D. and P.V. Hauschka, *Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts*. *J Bone Miner Res*, 1997. **12**(3): p. 412-22.
296. Foerster, A. and T. Henle, *Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrrolidine*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 6): p. 1383-5.
297. Xue, M., et al., *Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation*. *Diabetes*, 2016. **65**(8): p. 2282-94.
298. Ahmed, N., et al., *Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. *Mol Nutr Food Res*, 2005. **49**(7): p. 691-9.
299. Liardon R, d.W.-G.D., Philipossian G, Finot PA, *Identification of Nε-carboxymethyllysine: a new Maillard reaction product, in rat urine*. *J Agric Food Chem*. 1987; **35**:427-431. 1987.

300. Raza, K., et al., *Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(4): p. R784-95.
301. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1988. **31**(3): p. 315-24.
302. Henrotin, Y., et al., *Fibulin 3 peptides Fib3-1 and Fib3-2 are potential biomarkers of osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(7): p. 2260-7.

## **8 Annexes**