



UNIVERSITÉ DE LIÈGE | FACULTÉ DE MÉDECINE

*Département de Médecine Physique*

*Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage*



*Mise au point d'un modèle de co-culture  
chondrocytes / ostéoblastes  
sous chondraux humains*

**Christelle Sanchez**

*Licenciée en Sciences Biomédicales*

*Aspirante du Fonds National de la Recherche Scientifique*

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

**2005**

*Promoteur : Professeur Yves Henrotin*

*Au moment de déposer ce mémoire, c'est un grand plaisir de pouvoir remercier les nombreuses personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*En premier, à Monsieur le Professeur Yves Henrotin, mon promoteur, sans qui ce travail n'aurait été possible. Il m'a ouvert les portes de son laboratoire et s'est toujours montré débordant de motivation.*

*Toute ma reconnaissance va à Alain Labasse, qui m'a enseigné entre autres les principes de la culture cellulaire avec beaucoup de compétence, pour la patience, gentillesse et le dévouement dont il a fait preuve tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*A l'entièreté du personnel de l'Unité de Recherche sur l'Os et le Cartilage, pour son aide, sa présence, son soutien, ses encouragements et en particulier aux Docteurs Michelle Deberg et Marianne Mathy-Hartert pour leur minutieuse relecture de ce manuscrit.*

*Au service du laboratoire de radio-immunologie (Monsieur le Professeur Geenen), pour m'avoir accueillie dans leurs infrastructures, ainsi qu'au laboratoire d'histologie (Madame le Professeur Defresne) pour m'avoir enseigné les techniques d'histologie et d'immunohistochimie.*

*Au personnel de la morgue du CHU, et plus particulièrement à Monsieur P. Simonis, ainsi qu'au service du Professeur Delcour du centre hospitalier du Bois de l'Abbaye pour les prélèvements d'os et de cartilage.*

*Au laboratoire Expanscience, et plus particulièrement aux Docteurs N. Piccardi et P. Msika, pour avoir soutenu financièrement une grande partie de ce travail et pour avoir partagé leur expérience dans le domaine de l'étude pré-clinique des médicaments arthrosiques.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur Defresne, Présidente du Jury, et aux membres du Comité de lecture de ce mémoire, pour leurs conseils judicieux au cours de la réalisation de ce travail.*

*Je souhaite manifester ma gratitude aux Amis de l'Université de Liège et au Fonds National de la Recherche Scientifique pour la confiance qu'ils m'ont accordée ces quatre dernières années.*

*Ce travail n'aurait pu voir le jour si je n'avais été continuellement soutenu et encouragé par mes proches. Je remercie Stéphane pour sa patience et sa compréhension vis-à-vis des exigences du métier de chercheur. Mes parents m'ont toujours montré la voie à suivre, je les remercie de tout cœur pour leur présence. Je tiens également à remercier particulièrement Vincent pour la correction orthographique de ce travail.*

*Sans oublier tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.*

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Hypothèses de travail et objectifs de la recherche .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>L'ossification endochondrale .....</b>	<b>3</b>
2.1.	Structure du cartilage de croissance.....	3
2.2.	Les étapes de l'ossification endochondrale.....	4
2.3.	Régulation de l'ossification endochondrale.....	4
<b>3.</b>	<b>Le cartilage articulaire .....</b>	<b>7</b>
3.1.	Architecture générale .....	7
3.2.	Les cellules .....	9
3.3.	La matrice extracellulaire .....	9
<b>4.</b>	<b>L'os normal.....</b>	<b>12</b>
4.1.	Les cellules de l'os .....	12
4.1.1.	La lignée ostéoblastique.....	12
4.1.2.	La lignée ostéoclastique.....	13
4.2.	La matrice extracellulaire osseuse.....	14
4.2.1.	La phase protéique.....	14
4.2.2.	La phase minérale.....	15
4.3.	Le remodelage osseux .....	16
4.4.	Particularités de l'os sous-chondral .....	18
<b>5.</b>	<b>Physiopathologie de l'arthrose .....</b>	<b>19</b>
5.1.	Les facteurs biochimiques de l'arthrose .....	20
5.1.1.	Les enzymes.....	20
5.1.2.	Les inhibiteurs de métalloprotéinases.....	22
5.1.3.	Les cytokines .....	23
5.1.4.	Les formes activées de l'oxygène et les prostanoides .....	28
5.2.	Les mécanismes pathogéniques de l'arthrose .....	30
5.2.1.	La boucle cartilagino-cartilagineuse.....	30
5.2.2.	La boucle synovio-cartilagineuse .....	33
5.2.3.	La boucle ostéo-cartilagineuse .....	34
<b>6.</b>	<b>Approches thérapeutiques de l'arthrose .....</b>	<b>39</b>

<b>II. MISE AU POINT D'UN MODELE DE CULTURE DE CHONDROCYTES EN BILLES D'ALGINATE.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>43</b>
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>46</b>
2.1. Description des cultures de chondrocytes articulaires humains en billes d'alginate ....	46
2.1.1. Prélèvement des échantillons de cartilage .....	46
2.1.2. Isolement des chondrocytes .....	46
2.1.3. Mise en culture .....	47
2.1.4. Traitements des cellules.....	48
2.1.5. Arrêt de la culture.....	48
2.2. Description des techniques d'analyse histologiques et immunohistochimiques .....	49
2.2.1. Fixation des billes d'alginate et inclusion en paraffine .....	49
2.2.2. Coloration bleu / jaune alcian.....	50
2.2.3. Immunohistochimie.....	50
2.3. Description des techniques d'analyse biochimiques.....	51
2.3.1. Dosage de l'ADN.....	51
2.3.2. Dosage de la LDH.....	51
2.3.3. Incorporation de la thymidine tritiée.....	52
2.3.4. Dosage EASIA de l'agrécan, du TGF- $\beta$ 1, de la MMP-3 et du TIMP-1 .....	52
2.3.5. Dosage de l'activité de type stromélysine .....	54
2.4. Calculs et analyses statistiques .....	54
<b>3. Résultats.....</b>	<b>57</b>
3.1. Caractérisation du modèle de culture en billes d'alginate de chondrocytes articulaires humains.....	57
3.1.1. Etude histologique des billes d'alginate.....	57
3.1.2. Mesure de la synthèse d'ADN.....	58
3.1.3. Etude de la viabilité cellulaire.....	59
3.1.4. Etude de la production d'agrécan .....	60
3.1.5. Etude de la production de MMP-3 et de TIMP-1 .....	61
3.1.6. Etude de la production de TGF- $\beta$ 1.....	62
3.2. Effets de l'IL-1 $\beta$ sur le métabolisme des chondrocytes cultivés en billes d'alginate.....	63
3.2.1. Influence de l'IL-1 $\beta$ sur la quantité d'ADN et la viabilité cellulaire .....	63
3.2.2. Influence de l'IL-1 $\beta$ sur la production d'agrécan .....	64
3.2.3. Influence de l'IL-1 $\beta$ sur la production de MMP-3 et de TIMP-1.....	65
3.2.4. Influence de l'IL-1 $\beta$ sur la production de TGF- $\beta$ 1.....	68
3.3. Effets de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des chondrocytes cultivés en billes d'alginate.....	69
3.3.1. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la quantité d'ADN et la viabilité cellulaire.....	69
3.3.2. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production d'agrécan .....	70
3.3.3. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de MMP-3 et de TIMP-1.....	72
3.3.4. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de TGF- $\beta$ 1 .....	75

3.4.	<i>Effets des IAS sur le métabolisme des chondrocytes cultivés en billes d'alginate</i> .....	77
3.4.1.	<i>Influence des IAS sur le contenu en ADN et la viabilité cellulaire</i> .....	77
3.4.2.	<i>Influence des IAS sur la production d'agrécan</i> .....	78
3.4.3.	<i>Influence des IAS sur la production de MMP-3 et de TIMP-1</i> .....	80
3.4.4.	<i>Influence des IAS sur la production de TGF-<math>\beta</math>1</i> .....	83
<b>4.</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>84</b>
<b>III.</b>	<b>MISE AU POINT D'UN MODELE DE CULTURE D'OSTEOBLASTES SOUS-CHONDRAUX HUMAINS</b> .....	<b>91</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>91</b>
<b>2.</b>	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>92</b>
2.1.	<i>Description des cultures d'ostéoblastes sous-chondraux humains</i> .....	92
2.1.1.	<i>Isolement des ostéoblastes de l'os sous-chondral</i> .....	92
2.1.2.	<i>Culture des ostéoblastes</i> .....	93
2.1.3.	<i>Arrêt de la culture</i> .....	94
2.2.	<i>Description des techniques d'analyse cytologiques</i> .....	94
2.2.1.	<i>Marquage de la PAL</i> .....	94
2.2.2.	<i>Incorporation du Red Oil</i> .....	94
2.2.3.	<i>Coloration à l'Alizarin Red</i> .....	95
2.3.	<i>Description des techniques d'analyse biochimiques</i> .....	95
2.3.1.	<i>Dosage de l'ADN</i> .....	95
2.3.2.	<i>Dosage de la PAL</i> .....	95
2.3.3.	<i>Dosage de la LDH</i> .....	96
2.3.4.	<i>Dosage ELISA de l'OC</i> .....	96
2.3.5.	<i>Dosage EASIA de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6, du TGF-<math>\beta</math>1, de la MMP-3 et du TIMP-1</i> .	96
2.3.6.	<i>Dosage radio-immunologique de la PTHrP</i> .....	97
2.4.	<i>Calculs et analyses statistiques</i> .....	97
<b>3.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>98</b>
3.1.	<i>Caractéristiques cytologiques et biochimiques des ostéoblastes sous-chondraux</i> .....	98
3.1.1.	<i>Morphologie cellulaire et présence de PAL membranaire</i> .....	98
3.1.2.	<i>Minéralisation de la matrice</i> .....	98
3.1.3.	<i>Etude de la prolifération cellulaire</i> .....	99
3.1.4.	<i>Etude de l'activité de type PAL</i> .....	100
3.1.5.	<i>Etude de la production d'OC</i> .....	101
3.2.	<i>Comparaison du phénotype des ostéoblastes des zones SC et NSC de l'os sous-chondral arthrosique</i> .....	102
3.3.	<i>Etude des effets de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des ostéoblastes sous-chondraux</i> .....	103
3.3.1.	<i>Influence de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6 et de l'OSM sur l'activité PAL</i> .....	103
3.3.2.	<i>Influence de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6 et de l'OSM sur la production d'OC</i> .....	104

3.3.3.	<i>Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production d'IL-1<math>\beta</math>.....</i>	104
3.3.4.	<i>Influence de l'IL-1<math>\beta</math> et de l'OSM sur la production d'IL-6.....</i>	105
3.3.5.	<i>Influence de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de TGF-<math>\beta</math>1 .....</i>	105
3.3.6.	<i>Influence de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de MMP-3 et de TIMP-1.....</i>	106
3.3.7.	<i>Influence de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de PTHrP.....</i>	108
3.4.	<i>Etude des effets des IAS sur le métabolisme des ostéoblastes sous-chondraux .....</i>	109
<b>4.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>110</b>
<b>IV.</b>	<b>MISE AU POINT D'UN MODELE DE CO- CULTURE</b>	
	<b>CHONDROCYTES / OSTEOBLASTES SOUS- CHONDRAUX HUMAINS..</b>	<b>117</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>117</b>
<b>2.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>119</b>
2.1.	<i>Description du modèle de co-culture.....</i>	119
2.2.	<i>Description des techniques d'analyse biochimiques.....</i>	121
2.2.1.	<i>Dosage de l'ADN.....</i>	121
2.2.2.	<i>Dosage de la PAL .....</i>	121
2.2.3.	<i>Dosage de la LDH .....</i>	121
2.2.4.	<i>Dosage ELISA de l'OC.....</i>	121
2.2.5.	<i>Dosage EASIA de l'agrécan .....</i>	121
2.2.6.	<i>Etude par RT-PCR quantitative en temps réel de l'expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, PTHrP, PTH-R, OSF-1, CBFA1, PAL, COL1 et COL10 par les chondrocytes. ....</i>	121
2.3.	<i>Calculs et analyses statistiques .....</i>	124
<b>3.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>126</b>
3.1.	<i>Influence des ostéoblastes sous-chondraux sur le métabolisme des chondrocytes en co-culture.....</i>	126
3.1.1.	<i>Etude du contenu en ADN et de la viabilité cellulaire .....</i>	126
3.1.2.	<i>Etude de la synthèse d'agrécan .....</i>	127
3.1.3.	<i>Etude de l'expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL par les chondrocytes. ....</i>	128
A.	<i>Expression des gènes des protéines matricielles (AGG et COL2).....</i>	128
B.	<i>Expression des gènes des enzymes de la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-3 et MMP-13) et de leur inhibiteur (TIMP-1) .....</i>	129
C.	<i>Expression des gènes de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL) .....</i>	130
3.2.	<i>Influence d'un anticopr anti-IL-6 sur les effets des ostéoblastes SC sur le métabolisme des chondrocytes .....</i>	132
3.3.	<i>Effets de la pré-incubation des ostéoblastes avec de l'IL-1<math>\beta</math>, de l'IL-6 ou de l'OSM sur le métabolisme des chondrocytes .....</i>	133
3.3.1.	<i>Etude du contenu en ADN et de la viabilité cellulaire .....</i>	133
3.3.2.	<i>Etude de la synthèse d'agrécan .....</i>	133

3.3.3.	<i>Expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL par les chondrocytes.....</i>	134
A.	<i>Expression des gènes des protéines matricielles (AGG et COL2).....</i>	134
B.	<i>Expression des gènes des enzymes de la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-3 et MMP-13) et de leur inhibiteur (TIMP-1).....</i>	134
C.	<i>Expression des gènes de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL).....</i>	137
3.4.	<i>Influence de la pré-incubation des ostéoblastes avec un mélange d'IAS sur le métabolisme des chondrocytes .....</i>	140
3.4.1.	<i>Etude du contenu en ADN et de la viabilité cellulaire.....</i>	140
3.4.2.	<i>Etude de la synthèse d'agrécan.....</i>	140
3.4.3.	<i>Expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL par les chondrocytes.....</i>	141
A.	<i>Expression des gènes des protéines matricielles (AGG et COL2).....</i>	141
B.	<i>Expression des gènes des enzymes de la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-3 et MMP-13) et de leur inhibiteur (TIMP-1).....</i>	141
C.	<i>Expression des gènes de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL).....</i>	141
<b>4.</b>	<b><i>Discussion .....</i></b>	<b>146</b>
<b>V.</b>	<b><i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</i></b>	<b>153</b>
<b>VI.</b>	<b><i>BIBLIOGRAPHIE.....</i></b>	<b>163</b>
<b>VII.</b>	<b><i>ANNEXE: PUBLICATIONS.....</i></b>	<b>187</b>
<b>1.</b>	<b><i>Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Longterm effects of interleukin-1 beta and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. C Sanchez, M Mateus, M-P Defresne, J-M Crielaard, J-Y Reginster &amp; Y Henrotin, Journal of Rheumatology 29 (4) : 772- 782, 2002</i></b>	
<b>2.</b>	<b><i>Effects of rhein on metabolism of human articular chondrocytes. C Sanchez, M Mathy-Hartert, M Deberg, H Ficheux, J- Y Reginster &amp; Y Henrotin, Biochemical Pharmacology 65 (3) : 377- 388, 2003</i></b>	
<b>3.</b>	<b><i>Avocado/soybean unsaponifiables increased aggrecan synthesis and reduce catabolic and pro-inflammatory mediators production by human osteoarthritic chondrocytes. Y Henrotin, C Sanchez, M Deberg, N Piccardi, G Gouillou, P Msika &amp; J- Y Reginster, Journal of Rheumatology 30 (8) :1825- 1834, 2003</i></b>	
<b>4.</b>	<b><i>Differential regulation of chondrocyte metabolism by interleukin-6 and oncostatin M. C Sanchez, M Deberg, S Burton, P Devel, J- Y Reginster &amp; Y Henrotin, Osteoarthritis and Cartilage 12 (10) :801- 810, 2004</i></b>	
<b>5.</b>	<b><i>Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1<math>\beta</math> and oncostatin M pre-treated non sclerotic osteoblasts. C Sanchez, M Deberg, N Piccardi, P Msika, J- Y Reginster &amp; Y Henrotin, Osteoarthritis and Cartilage 13 (9) : in press, 2005</i></b>	
<b>6.</b>	<b><i>Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. C Sanchez, MA Deberg, N Piccardi, P Msika, J- Y Reginster &amp; Y Henrotin, Osteoarthritis and Cartilage 13 : in press, 2005</i></b>	

## **LISTE DES TABLES ET ILLUSTRATIONS**

### **I. INTRODUCTION GENERALE**

*Figure 1 : Représentation schématique des zones du cartilage de croissance.*

*Figure 2 : Schéma des mécanismes moléculaires de l'ossification endochondrale.*

*Figure 3 : Structure du cartilage articulaire.*

*Figure 4 : Représentation schématique de la matrice extracellulaire du cartilage.*

*Figure 5 : Structure d'une molécule d'agrécan.*

*Figure 6 : Représentation schématique des compartiments de la matrice extracellulaire du cartilage.*

*Figure 7 : Représentation schématique de la localisation des différents types cellulaires dans l'os normal.*

*Figure 8 : L'ostéoclastogénèse.*

*Figure 9 : Résorption et formation de la matrice osseuse.*

*Figure 10 : Structure de l'os sous-chondral.*

*Figure 11 : Cascade protéolytique d'activation des métalloprotéinases.*

*Tableau 1 : Métalloprotéinases matricielles impliquées dans l'arthrose et leurs substrats*

*Tableau 2 : Principales cytokines impliquées dans la régulation du métabolisme du cartilage*

*Tableau 3 : Principales actions de l'IL-1 sur le métabolisme des chondrocytes*

*Figure 12 : Représentation schématique de la phase réactionnelle.*

*Figure 13 : La boucle cartilagino-cartilagineuse.*

*Figure 14 : Modifications de l'os sous-chondral dans l'arthrose.*

*Figure 15 : Les types de microfractures ostéocondrale.*

*Figure 16 : Représentation schématique des trois boucles physiopathologiques de l'arthrose.*

*Tableau 4 : Composition des IAS.*

### **II. MISE AU POINT D'UN MODELE DE CULTURE DE CHONDROCYTES EN BILLES D'ALGINATE**

*Figure 17 : Micrographie électronique d'un chondrocyte cultivé en billes d'alginate durant 13 jours.*

*Figure 18 : Schéma représentant les différentes étapes de la culture des chondrocytes en billes d'alginate.*

*Tableau 5 : Caractéristiques des différents dosages EASIA utilisés.*

*Figure 19 : A : Observation microscopique d'une bille d'alginate dans son surnageant de culture.*

*B : Visualisation des protéoglycanes hautement sulfatés (bleu) ou non (jaune) par la technique de coloration au bleu/jaune alcian.*

*C : Mise en évidence du collagène de type II par Immunohistochimie.*

- Figure 20 :** Courbe d'évolution de la quantité d'ADN en fonction de la durée de la culture.
- Figure 21 :** Incorporation de thymidine tritiée pendant les 24 dernières heures de la culture.
- Figure 22 :** Evolution de la mortalité cellulaire estimée par le dosage de la LDH.
- Figure 23 :** Distribution de l'agrécan dans les différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 12 jours de culture.
- Figure 24 :** Quantité d'agrécan mesurée dans les compartiments FRM et CM de la culture en billes d'alginate en fonction de la durée de la culture.
- Figure 25 :** Quantités cumulées de MMP-3 (A) et de TIMP-1 (B) libérées dans le milieu de culture.
- Figure 26 :** Evolution du rapport MMP-3/TIMP-1 en fonction de la durée de la culture.
- Figure 27 :** A : Quantités cumulées de TGF- $\beta$ 1 libérées dans le milieu de culture.  
B: Distribution du TGF- $\beta$ 1 dans les différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 12 jours de culture.
- Tableau 6 :** Quantités d'ADN contenues dans les billes d'alginate au terme de 12 jours de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$ .
- Figure 28 :** Effet de la concentration en IL-1 $\beta$  sur la production d'agrécan durant les 12 jours de culture.
- Figure 29 :** Effet de l'IL-1 $\beta$   $10^{10}$  M sur la distribution d'agrécan dans les compartiments de bille d'alginate après 12 jours de culture.
- Figure 30 :** Effet de la concentration en l'IL-1 $\beta$  sur la production de MMP-3 durant les 3 premiers jours de culture.
- Figure 31 :** Quantités de MMP-3 libérées dans le surnageant durant chaque période de 72h de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$   $10^{10}$  M.
- Figure 32 :** Effet de la concentration en l'IL-1 $\beta$  sur la production de TIMP-1 durant les 12 jours de culture.
- Figure 33 :** Quantités de TIMP-1 libérées dans le surnageant durant chaque période de 72h de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$   $10^{10}$  M.
- Figure 34 :** Rapport molaire MMP-3/TIMP-1 calculé à l'aide des valeurs cumulées de TIMP-1 et de MMP-3, en présence ou non d'IL-1 $\beta$   $10^{10}$  M.
- Figure 35 :** Effet de la concentration en IL-1 $\beta$  sur la production de TGF- $\beta$ 1 au terme de 12 jours de culture.
- Figure 36 :** Quantités de TGF- $\beta$ 1 libérées dans le surnageant durant chaque période de 72h de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$   $10^{10}$  M.
- Tableau 7 :** Quantités d'ADN contenues dans les billes d'alginate au terme de 12 jours de culture, avec ou sans IL-1 $\beta$ , IL-6 ou OSM.
- Tableau 8 :** Effets de l'IL-6/IL-6sR et de l'OSM sur la production totale d'agrécan par les chondrocytes et sur sa distribution dans les fractions FRM, CM et S après 12 jours de culture.
- Figure 37 :** Effet de l'IL-6 (500 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) et de l'OSM (10 ng/ml) sur la distribution des molécules d'agrécan dans les différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 12 jours de culture.
- Figure 38 :** Effets de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la quantité totale d'agrécan accumulée dans les billes d'alginate après 12 jours de culture en présence d'IL-1 $\beta$   $10^{10}$  M.

**Figure 39 :** Effet de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production basale de MMP-3 par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate.

**Figure 40 :** Effet de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production basale de TIMP-1 par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate.

**Figure 41 :** Effet de concentrations croissantes d'IL-6 (A) et d'OSM (B) sur la production de MMP-3 par les chondrocytes en présence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M.

**Figure 42 :** Effets de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production totale de TIMP-1 par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate en présence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M.

**Figure 43 :** Effets de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production de TGF- $\beta$ 1 en l'absence (A) ou en présence de 10<sup>-10</sup> M d'IL-1 $\beta$  (B) par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate.

**Tableau 9:** Quantités d'ADN contenues dans les billes d'alginate au terme de 12 jours de culture, en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M et/ou des IAS.

**Figure 44 :** A : Cinétique de la production d'agrécane en présence ou non de 10  $\mu$ g/ml d'IAS.

B : Effet de concentrations croissantes d'IAS sur la production totale d'agrécane après 12 jours de culture.

**Figure 45 :** Effet des IAS (10  $\mu$ g/ml) sur la distribution de l'agrécane dans les différents compartiments de la culture.

**Figure 46 :** Effet des IAS (10  $\mu$ g/ml) sur la production totale d'agrécane après une incubation de 72h avec 10<sup>-10</sup> M d'IL-1 $\beta$ .

**Figure 47 :** Effets des IAS sur la production de MMP-3.

**Figure 48 :** Effet des IAS (10  $\mu$ g/ml) sur la production totale de TIMP-1 au terme de 12 jours de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M.

**Figure 49 :** Evolution du ratio molaire MMP-3/TIMP-1 en fonction de la concentration en IAS en présence ou non d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M.

**Figure 50 :** Effet de concentrations croissantes d'IAS sur la production totale de TGF- $\beta$ 1 après 12 jours de culture, en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M.

### **III. MISE AU POINT D'UN MODELE DE CULTURE D'OSTEOBLASTES SOUS-CHONDRAUX HUMAINS**

**Tableau 10 :** Caractéristiques analytiques des différents dosages EASIA utilisés.

**Figure 51 :** Marquage cytotologique de la PAL membranaire au naphthol AS-MX phosphate et Fast Red.

**Figure 52 :** Marquage cytotologique des ostéoblastes à l'Alizarin Red

**Tableau 11 :** Quantités d'ADN contenues dans les cultures au terme de 16 jours de culture, en présence ou non de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub>.

**Figure 53 :** Evolution de l'activité PAL exprimée par les ostéoblastes en fonction de la durée de la culture.

**Figure 54 :** Effet de la concentration en 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> sur l'activité PAL, au terme de 16 jours de culture.

**Figure 55 :** Effet de la concentration en 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> sur la cinétique de production de l'OC.

**Tableau 12 :** Production basale de PAL, d'OC, d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1, de MMP-3, de TIMP-1 et de PTHrP par les ostéoblastes NSC ou SC de l'os sous-chondral après 72 h de culture dans un milieu DMEM enrichi par 1% d'ITS+.

**Figure 56 :** Activité PAL mesurée dans les extraits cellulaires après 72 h de culture en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 57 :** Production d'OC par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 58 :** Production d'IL-1 $\beta$  par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 59 :** Production d'IL-6 par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 60 :** Production de TGF- $\beta$ 1 par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 61 :** Production de MMP-3 par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 62 :** Production de TIMP-1 par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 63 :** Rapport molaire MMP-3 / TIMP-1 observé dans les cultures d'ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Figure 64 :** Production de PTHrP par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml).

**Tableau 13 :** Effets du mélange d'IAS (10  $\mu$ g/ml) sur les productions de PAL, d'OC, d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1, de MMP-3, de TIMP-1 et de PTHrP par les ostéoblastes NSC ou SC de l'os sous-chondral après 72 h de culture.

**Tableau 14 :** Résumé des modifications du phénotype des ostéoblastes sous-chondraux de l'articulation arthrosique.

**Figure 65 :** Représentation schématique des mécanismes hypothétiques impliqués dans la sclérose de l'os sous-chondral.

**Tableau 15 :** Influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des ostéoblastes NSC et comparaison avec les différences phénotypiques des ostéoblastes SC.

#### **IV. MISE AU POINT D'UN MODELE DE CO-CULTURE CHONDROCYTES / OSTEOBLASTES SOUS- CHONDRAUX HUMAINS**

**Figure 66 :** Représentation schématique du modèle de co-culture.

**Tableau 16 :** Séquences des amorces utilisées.

**Tableau 17 :** Contenu en ADN en  $\mu$ g par puits après 4 jours de culture.

**Tableau 18 :** Concentration en agrécane des différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes NSC ou SC, ou de fibroblastes de peau.

- Figure 67 :** Expression du gène AGG (A) et COL2 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes NSC ou SC.
- Figure 68 :** Expression du gène MMP-3 (A) et MMP-13 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes NSC ou SC.
- Tableau 19 :** Effet de la co-culture sur l'expression de COL1, COL10, SOX9, CBFA1, PTHrP, PTH-R, OSF-1 et PAL par le chondrocyte après 4 jours de culture.
- Figure 69 :** Expression des gènes AGG, MMP-3, MMP-13, SOX9 et TIMP-1 par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes SC.
- Figure 70 :** Production totale d'agrécan par les chondrocytes en billes d'alginate après 4 jours de culture.
- Figure 71 :** Expression du gène AGG (A) et COL2 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 72 :** Expression du gène MMP-3 (A) et MMP-13 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 73 :** Expression du gène SOX9 (A) et OSF-1 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 74 :** Expression du gène PTHrP (A) et PTH-R (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 75 :** Production totale d'agrécan par les chondrocytes en billes d'alginate après 4 jours de culture.
- Figure 76 :** Expression du gène AGG (A) et COL2 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 77 :** Expression du gène MMP-3 (A) et MMP-13 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 78 :** Expression du gène SOX9 (A) et OSF-1(B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 79 :** Expression du gène PTHrP (A) et PTH-R (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture.
- Figure 80 :** Représentation schématique de l'implication de l'os sous-chondral sur les changements observés au sein du cartilage arthrosiques.

## **V. DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

- Figure 81 :** Représentation schématique des mécanismes d'action des IAS sur la physiopathologie de l'arthrose.

**Author :** Sanchez Christelle (2005)

**Institution :** Bone and Cartilage Metabolism Research Unit, Liege University, Belgium.

**Title :** Human chondrocytes/subchondral osteoblasts co-culture model development.

**Key words :** Osteoarthritis, chondrocytes, osteoblasts, co-culture, ASU.

## Abstract

**Objectives:** This work was designed to investigate the influence of osteoarthritic (OA) subchondral osteoblasts on the metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. We have developed an original co-culture model and compared the effects of osteoblasts isolated from sclerotic (SC) or non sclerotic (NSC) OA subchondral bone plate on the production of aggrecan (AGG) and the expression of numerous genes by chondrocytes. The influence of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, oncostatin M (OSM) and avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on chondrocytes, osteoblasts and chondrocytes/osteoblasts relationship was also investigated.

**Methods:** Enzymatically isolated chondrocytes were cultured in alginate beads, alone or in co-culture with OA subchondral osteoblasts. Before co-culture, osteoblasts were cultured for 72 hours with or without 1.7 ng/ml IL-1 $\beta$ , 100 ng/ml IL-6 with its soluble receptor (IL-6sR; 50 ng/ml), 10 ng/ml OSM or 10  $\mu$ g/ml ASU. The content of DNA was measured according to a fluorimetric method. AGG production was assayed by enzyme amplified sensitivity immunoassays and a specific radioimmunoassay was used to quantify PTHrP production. AGG, type II collagen (COL2), SOX9, matrix metalloproteinase (MMP)-3, MMP-13, osteoblast stimulating factor (OSF)-1, parathyroid hormone related protein (PTHrP) and PTH-R mRNA level in chondrocytes was quantified by the real time polymerase chain reaction.

**Results:** SC, but not NSC, osteoblasts significantly decreased (-28 %,  $p < 0.001$ ) aggrecan production and aggrecan gene expression and significantly increased MMP-3 and MMP-13 gene expression by human OA chondrocytes in alginate beads (1.65 and 2 times, respectively,  $p < 0.001$ ). In co-culture with SC or NSC subchondral osteoblasts, chondrocytes expressed significantly less sox-9 and COL2 mRNA compared to chondrocytes cultured alone. The decrease of SOX9 and COL2 gene expression was significantly more pronounced in the presence of SC than in the presence of NSC subchondral osteoblasts (SC vs NSC  $p < 0.001$ ). Addition of an IL-6 neutralizing antibody prevented all these SC osteoblasts effects on chondrocyte metabolism. When they were pre-incubated with IL-1 $\beta$ , IL-6 or OSM, NSC osteoblasts inhibited aggrecan synthesis and increased MMP-3 and -13 gene expressions by chondrocytes in alginate beads in a same order of magnitude than SC osteoblasts. Pre-treatment of SC osteoblasts with ASU fully prevented the inhibitory effects of SC osteoblasts on AGG production ( $p < 0.01$ ), and increased by 2-fold the COL2 expression by chondrocytes ( $p < 0.001$ ). The treatment of SC osteoblasts with ASU did not modify the expression of MMPs by chondrocytes.

**Conclusion:** These results demonstrate that SC subchondral osteoblasts could contribute to cartilage degradation by stimulating chondrocytes to produce more MMP and by inhibiting AGG synthesis. IL-6 is a key mediator involved in these osteoblasts effects. Furthermore, IL-1 $\beta$ , IL-6 and OSM may stimulate NSC osteoblasts to induce chondrocyte metabolic dysregulation similar to those observed in OA cartilage, suggesting that these cytokines contribute to the phenotype shift of subchondral osteoblasts in OA. ASU prevent osteoblasts-induced matrix molecules inhibition, suggesting a new mechanism of action for this drug.

## **LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES**

ADAM :	<i>A disintegrin and a metalloproteinase</i>	RIA :	<i>Radioimmunoassay</i>
AND :	Acide désoxyribonucléique	S :	Milieu de culture
AGG :	Agrécane	SC :	Sclérosé
AINS :	Anti-inflammatoire non stéroïdien	SEM :	Ecart-type réduit
APMA :	p-Aminophenylmercuric acétate	TBS :	<i>Tris Buffer Saline</i>
ARN :	Acide ribonucléique	TGF- $\beta$ :	<i>Transforming growth factor -<math>\beta</math></i>
BMP :	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	TIMP :	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
CBFA :	<i>Core binding factor A</i>	TNF $\alpha$ :	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
CM :	<i>Cell-associated matrix</i>	UG :	Ultrosor G
COX :	Cyclo-oxygénase	uPA :	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>		
EASIA :	<i>Enzyme Amplified Sensitivity ImmunoAssay</i>		
EDTA :	Ethylène diamine tétra acétate		
FBS :	<i>Foetal bovine serum</i>		
FRM :	<i>Further removed matrix</i>		
GAPDH :	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase	<u>Unités de mesure:</u>	
GAG :	Glycosaminoglycane	Ci :	curie
GPL :	Glycoprotéine de liaison	g :	gramme
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydroxygène	mg :	milligramme (10 <sup>-3</sup> g)
HA :	Acide hyaluronique	$\mu$ g :	microgramme (10 <sup>-6</sup> g)
HEPES :	N-{2-hydroxyéthyl}piperazine-N'-(2-éthanesulfonic acid}	ng :	nanogramme (10 <sup>-9</sup> g)
HGF :	<i>Hepatocyte growth factor</i>	pg :	picogramme (10 <sup>-12</sup> g)
IGF-1 :	<i>Insulin-like growth factor -1</i>	L :	litre
IAS :	Insaponifiables d'avocat et de soja	ml :	millilitre (10 <sup>-3</sup> L)
IL :	Interleukine	$\mu$ l :	microlitre (10 <sup>-6</sup> L)
IL-1Ra :	Antagoniste du récepteur à l'IL-1	M :	molaire
IL-6sR :	Récepteur soluble à l'IL-6	nmol :	nanomole
iNOS :	Forme inductible de la NO synthase		
ITS :	Insuline, transferrine, sélénium		
LDH :	Lactate déshydrogénase		
MMP :	Métalloprotéinase matricielle		
NO :	Oxyde nitrique		
NSC :	Non sclérosé		
OC :	Ostéocalcine		
OSF-1 :	<i>Osteoblast stimulating factor-1</i>		
OSM :	Oncostatine M		
PAL :	Phosphatase alcaline		
PBS :	<i>Phosphate Buffer Saline</i>		
PG :	Prostaglandine		
PTH :	Parathormone		
PTH-R :	Récepteur à la PTH		
PTHrP :	Protéine apparentée à la PTH		

## 1. Hypothèses de travail et objectifs de la recherche

**L'**arthrose est une maladie dont la prévalence est élevée et le retentissement socio-économique important. En termes de coût, on situe habituellement l'arthrose au deuxième rang des maladies chroniques, après les affections cardiovasculaires. La prévalence de l'arthrose augmente avec l'âge, elle atteint près de 30 % des sujets entre 45 et 64 ans et plus de 70 % après 65 ans<sup>1</sup>. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes pathogéniques qui sous-tendent cette maladie, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'expérimenter de nouveaux médicaments.

D'un point de vue anatomo-pathologique, l'arthrose est une maladie caractérisée par la perte progressive du cartilage articulaire. Ce tissu s'amincit, s'érode et se minéralise. Cependant, le cartilage n'est pas le seul tissu de l'articulation à présenter des modifications structurelles et fonctionnelles. Par exemple, l'os sous-chondral se sclérose<sup>2</sup>. Cette modification structurelle modifie profondément sa capacité à amortir les contraintes mécaniques. Il est donc logique de penser que le durcissement de l'os sous-chondral provoque une augmentation des contraintes mécaniques exercées sur le cartilage.

Actuellement, il existe une controverse sur le rôle joué par l'os sous-chondral dans la pathogénie des lésions cartilagineuses. Selon certains auteurs, la sclérose de l'os sous-chondral est la conséquence de la perte de cartilage<sup>3, 4</sup>. Pour d'autres auteurs, la sclérose sous-chondral précède les lésions cartilagineuses, et initie l'apparition de celles-ci<sup>5-9</sup>. La contribution de l'os sous-chondral au développement des lésions cartilagineuses n'est pas seulement mécanique, mais également biochimique. En effet, des travaux récents ont montré que le phénotype des ostéoblastes de l'os sous-chondral était modifié en regard des lésions du cartilage. En comparaison avec des ostéoblastes normaux, les ostéoblastes arthrosiques produisent plus d'ostéocalcine (OC), de phosphatase alcaline (PAL), d'*insulin-like growth factor* (IGF-1), de *transforming growth factor-beta1* (TGF-β1), d'*hepatocyte growth factor* (HGF), d'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), d'interleukine-6 (IL-6) et de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>10-13</sup>. Par ailleurs, des microfractures (appelées « microfractures ostéochondrales ») traversent la jonction os-cartilage. Elles sont plus fréquentes dans les articulations arthrosiques<sup>14</sup>. Il existe donc une communication entre l'os et le cartilage, qui s'intensifie dans les conditions pathologiques.

Nous émettons l'hypothèse que des médiateurs solubles sécrétés par les ostéoblastes de l'os sous-chondral influenceraient le métabolisme des chondrocytes sus-jacents et contribueraient ainsi à la dégradation du cartilage. Notre hypothèse repose sur les 4 observations suivantes :

- × Les ostéoblastes arthrosiques ont un phénotype altéré<sup>10-13</sup>.
- × Des molécules produites par les ostéoblastes (HGF, OC) sont présentes dans la matrice cartilagineuse ou dans le fluide synovial. Leur concentration est accrue dans le cartilage arthrosique<sup>15, 16</sup>.
- × Dans l'articulation arthrosique, des microfractures ostéochondrales établissent une communication entre l'os sous-chondral et le cartilage<sup>14</sup>.
- × Une étude de Westacott a montré que des ostéoblastes arthrosiques induisaient en co-culture la dégradation d'explants de cartilage<sup>17</sup>.

Les objectifs de notre travail étaient les suivants :

- 1) Caractériser le phénotype des ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral.
- 2) Etudier l'influence du phénotype des ostéoblastes des zones sclérosées sur le métabolisme des chondrocytes.
- 3) Rechercher les effets de certaines cytokines [l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'oncostatine M (OSM)] et d'un mélange d'insaponifiables d'avocat et de soja (IAS) sur l'axe physiopathologique ostéo-chondral.

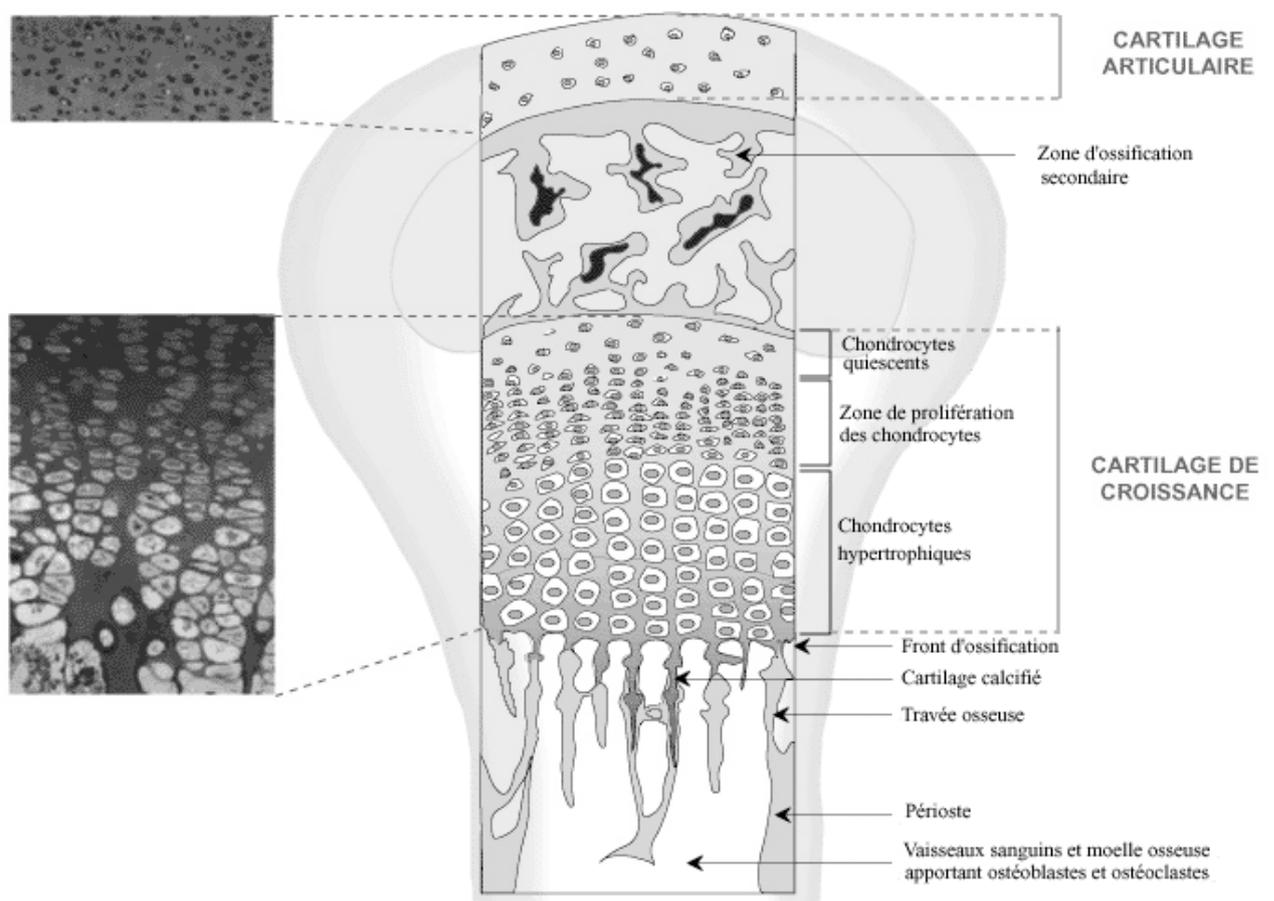
Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons mis au point un modèle original de co-culture dans lequel des chondrocytes arthrosiques en billes d'alginate étaient cultivés en présence d'ostéoblastes provenant soit des régions sclérosées (SC), soit des régions non sclérosées (NSC) de l'os sous-chondral. La formation de la matrice extracellulaire cartilagineuse a été appréciée par la mesure de la quantité de molécules d'agrécane (protéoglycane spécifique du cartilage) accumulée dans la bille d'alginate et dans le milieu de culture. Au niveau du chondrocyte, nous avons également estimé la production des ARN messagers (ARNm) codant pour l'agrécane, le collagène de type I, II et X, les facteurs transcriptionnels sox9 et cbfa1, les métalloprotéinases matricielles MMP-3 et MMP-13, l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-1 (TIMP-1), la protéine apparentée à la parathormone (PTHrP) et son récepteur (PTH-R), l'*osteoblast stimulating factor-1* (OSF-1) et la PAL. Quant au phénotype des ostéoblastes, il a été caractérisé par la production de PAL, d'OC, d'IL-1 $\beta$  et IL-6, du TGF- $\beta$ 1, de PTHrP, de MMP-3 et de TIMP-1.

## 2. L'ossification endochondrale

**L**a plupart des os du squelette adulte sont dérivés d'ébauches provisoires de cartilage (cartilage de croissance) qui sont le siège d'une croissance longitudinale rapide. La formation de l'os à partir du cartilage, appelée aussi ossification endochondrale, implique la résorption du cartilage et son remplacement par du tissu osseux.

### 2.1. STRUCTURE DU CARTILAGE DE CROISSANCE

Au microscope optique, plusieurs zones peuvent être visualisées au sein du cartilage de croissance<sup>18</sup> (figure 1).



1. La zone la plus éloignée du front d'ossification renferme des chondrocytes quiescents.
2. Dans la zone intermédiaire, les chondrocytes prolifèrent et se disposent en colonnes verticales (groupes isogéniques axiaux du *cartilage sérié*). Les

chondrocytes quiescents et prolifératifs expriment des protéines anti-angiogéniques (par exemple, la chondromoduline-1 et la troponine-1), qui empêchent la vascularisation de cette zone<sup>20</sup>.

3. Enfin, dans la zone adjacente au front d'ossification, le volume des chondrocytes augmente considérablement. Cette couche prend le nom de *couche hypertrophique*. Les chondrocytes hypertrophiques synthétisent du collagène de type X et de la PAL. La transition entre le tissu cartilagineux et osseux est abrupte au niveau du front d'ossification.

## 2.2. LES ETAPES DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE

La zone de prolifération cellulaire s'épaissit et s'allonge. Les chondrocytes situés dans cette zone prolifèrent et synthétisent une matrice extracellulaire riche en collagène de type IIA et en agrécane. Au terme de quelques cycles cellulaires, les chondrocytes ne se divisent plus. Ils sont appelés « chondrocytes pré-hypertrophiques »<sup>21</sup>.

Le volume des chondrocytes pré-hypertrophiques augmente progressivement, jusqu'à atteindre 5 fois leur volume initial. Ils sont alors dénommés « chondrocytes hypertrophiques ». A ce stade, des bourgeons conjonctivo-vasculaires issus de l'os sous-chondral, contenant des cellules mésenchymateuses pluripotentes et des ostéoclastes, pénètrent dans le cartilage hypertrophié. Les ostéoclastes résorbent le cartilage et les cellules souches se différencient en ostéoblastes<sup>18</sup>. Les ostéoblastes procèdent à l'ossification du cartilage non résorbé. Quant aux chondrocytes hypertrophiés, ils meurent par apoptose<sup>18</sup>.

## 2.3. REGULATION DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE

### × Régulation de la prolifération des chondrocytes

L'entrée des chondrocytes dans la phase proliférative est contrôlée négativement par le *fibroblast growth factor* (FGF)<sup>22</sup>. Le FGF est produit par les chondrocytes du cartilage de croissance, principalement dans la zone de prolifération, ainsi que par les cellules du périchondre<sup>23</sup>. L'OSF-1, synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques<sup>24</sup>, pourrait également jouer ce rôle. *In vitro*, cette protéine inhibe la prolifération des chondrocytes et augmente la synthèse de protéoglycanes<sup>25</sup>.

L'*indian hedgehog* (Ihh) est une protéine exprimée par les chondrocytes pré-hypertrophiques. Cette protéine :

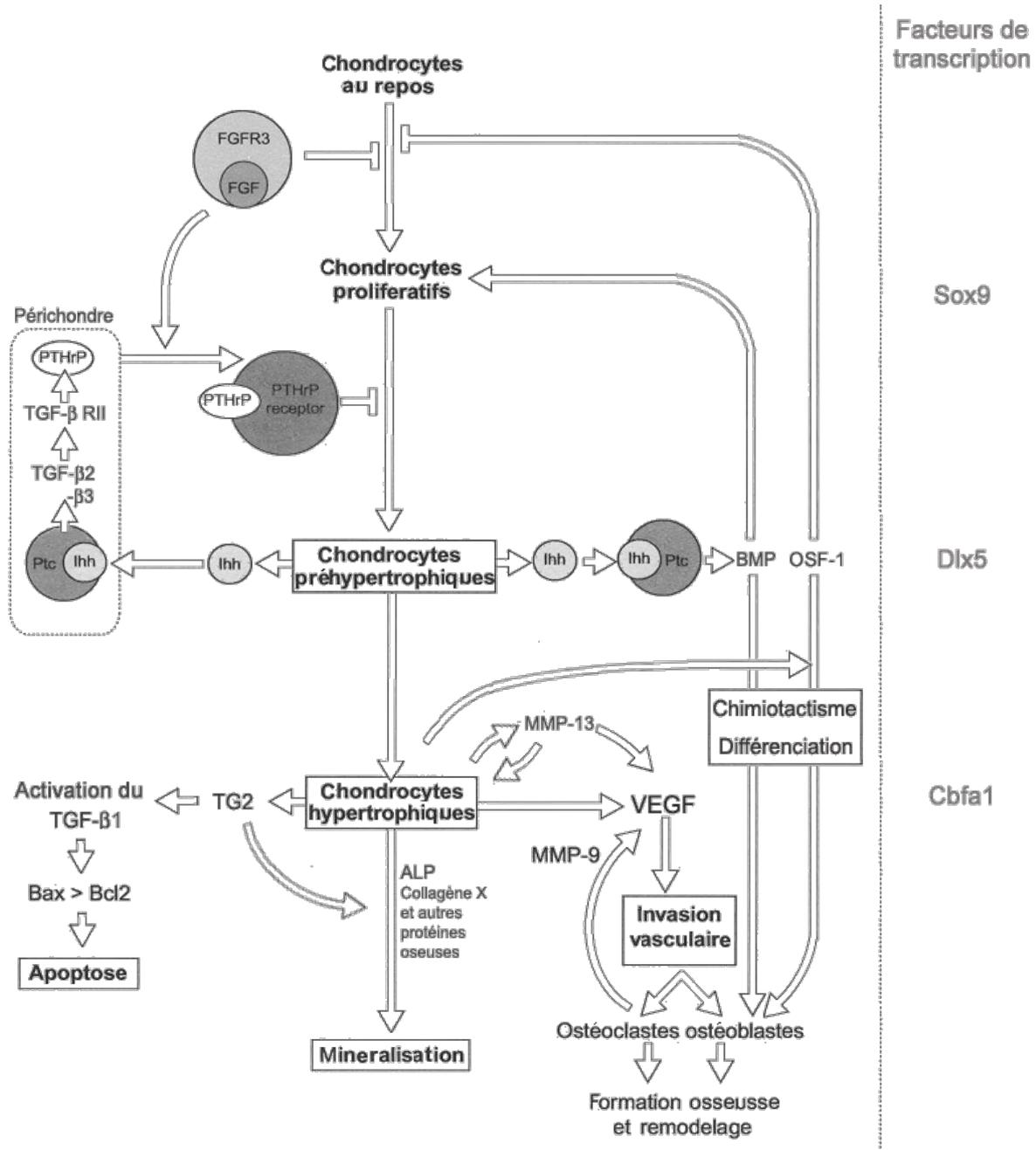
- stimule la prolifération des chondrocytes<sup>26</sup> ;
- stimule la sécrétion de PTHrP<sup>27</sup> (phénomène médié par les TGF- $\beta$ 2 et - $\beta$ 3<sup>28</sup>) et des BMP<sup>29</sup>. Ces facteurs empêchent la différenciation des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes pré-hypertrophiques et favorisent l'expression du facteur de transcription sox9<sup>30</sup>.

#### × Régulation de la différenciation hypertrophique

Les chondrocytes pré-hypertrophiques augmentent graduellement en volume et se transforment en chondrocytes hypertrophiques sphériques. A ce stade, ils n'expriment plus Ihh<sup>27</sup>. Plusieurs événements caractérisent cette étape (figure 2):

- L'augmentation de l'activité de la transglutaminase-2 (TG2) chez les chondrocytes hypertrophiques<sup>31</sup>. La TG2 une enzyme dépendante du calcium aussi appelée la transglutaminase tissulaire. Elle catalyse une réaction de transamidation consistant en la formation de liens covalents entre des résidus de glutamine disponibles et des amines primaires. Cette transamidation de la matrice extracellulaire prépare la matrice à la minéralisation. La TG2 est également capable de libérer le TGF- $\beta$ 1 latent présent dans la matrice extracellulaire et de l'activer<sup>32</sup>.
- L'expression du facteur de transcription cbfa-1 par les chondrocytes. Ce facteur induit la synthèse de composants extracellulaires spécifiques (par exemple, l'ostéopontine, le collagène de type X et l'OC), de PAL et de MMP-13<sup>21</sup>.
- L'augmentation de l'expression des annexines II, V, VI et VIII<sup>33</sup>, de ank<sup>34</sup> et des nucléosides triphosphates pyrophosphohydrolases (NTPPPH)<sup>35</sup> par les chondrocytes. Ces protéines se concentrent dans les vésicules matricielles des chondrocytes hypertrophiques, où elles participent à la formation des cristaux d'hydroxyapatite en augmentant les concentrations locales en calcium et en phosphate.
- Les chondrocytes hypertrophiques secrètent des facteurs angiogéniques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et l'OSF-1<sup>24, 36</sup>. L'OSF-1, outre ses propriétés angiogéniques, possède un pouvoir chimiotactique sur les pré-ostéoblastes et induit leur maturation<sup>37</sup>.
- Enfin, l'expression du facteur anti-apoptotique bcl-2 est diminuée. Il s'installe un déséquilibre entre le niveau d'expression de ce facteur avec celui du facteur pro-

apoptotique bas. Ce déséquilibre initie l'apoptose, ultime étape de la différenciation hypertrophique. Cette action est en partie médiée par le TGF- $\beta$ 1.



**Figure 2** : Schéma des mécanismes moléculaires de l'ossification endochondrale (modifié de White<sup>38</sup>). ALP : phosphatase alcaline, BMP : Bone morphogenetic protein, FGF : fibroblast growth factor, Ihh : indian hedgehog, MMP : matrix metalloproteinase, OSF-1 : osteoblast stimulating factor-1, PTHrP : parathyroid related protein, TGF : transforming growth factor, VEGF : vascular endothelial growth factor, Ptc : patched

### 3. Le cartilage articulaire

**L**e cartilage articulaire normal est un tissu conjonctif hautement spécialisé qui possède plusieurs particularités structurelles et fonctionnelles. Il est dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de structures nerveuses. Un seul type cellulaire y est présent, le chondrocyte. Cette cellule assure non seulement la synthèse mais aussi le renouvellement de la matrice extracellulaire du cartilage<sup>39</sup>.

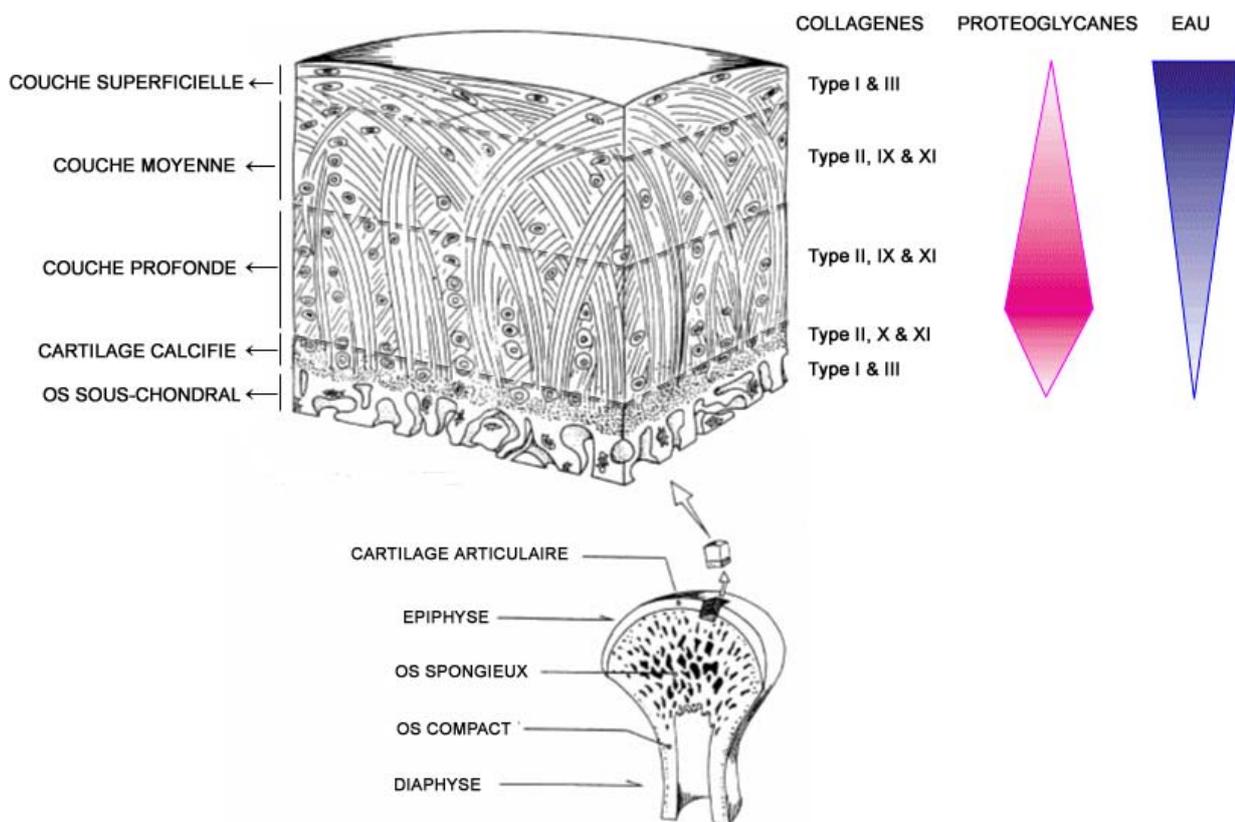
Au sein de l'articulation, le cartilage est en contact par sa couche la plus profonde avec l'os sous-chondral et par sa couche la plus superficielle avec le fluide synovial.

#### 3.1. ARCHITECTURE GENERALE

L'organisation du cartilage n'est pas homogène. Quatre zones peuvent être distinguées sur la base de critères morphologiques et biochimiques<sup>40</sup> (figure 3) :

- La couche superficielle (C1) est en contact avec le liquide synovial. Elle sert de surface de glissement et correspond à 5-10% de la hauteur totale du cartilage. Les cellules y sont aplaties. A ce niveau, les chondrocytes synthétisent de la lubricine. Cette molécule, qui est également produite par les synoviocytes, joue un rôle mécanique important en diminuant le coefficient de friction des surfaces articulaires<sup>41</sup>. La matrice extracellulaire de cette couche est formée de fines fibrilles de collagènes de type I et III, disposées en faisceaux parallèles à la surface articulaire<sup>42</sup>. Le contenu en protéoglycanes de cette couche est moins important que dans les zones moyenne et profonde<sup>43</sup>. Cette couche riche en eau est très déformable<sup>39</sup>.
- La deuxième couche ou zone dite moyenne ou de transition (C2) est formée essentiellement de fibrilles de collagènes qui s'entrecroisent obliquement pour former un réseau. La hauteur de cette zone représente environ 40 à 45 % de la hauteur totale du cartilage<sup>39</sup>.
- La troisième couche est dite zone profonde (C3). Les fibrilles de collagènes sont plus épaisses, orientées perpendiculairement à la surface. Les chondrocytes y sont disposés en colonnes<sup>39</sup>. Cette zone, qui représente 40 à 45 % de la hauteur totale du cartilage, est la plus riche du cartilage en protéoglycanes. Elle est aussi la plus compressible<sup>40</sup>.

- Enfin, la zone dite intermédiaire ou calcifiée (C4) sert de zone d'ancrage du cartilage à la plaque osseuse sous-chondrale<sup>40</sup>. Elle représente 5 à 10 % de la hauteur totale. Cette zone est séparée de la précédente par une zone basophile appelée « *tidemark* ». Dans cette zone, les chondrocytes présentent des similitudes avec les chondrocytes hypertrophiques du cartilage de croissance. Notamment, ils synthétisent du collagène de type X.



**Figure 3 :** Structure du cartilage articulaire. 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. Modifié de Heinen<sup>44</sup>.

### **3.2. LES CELLULES**

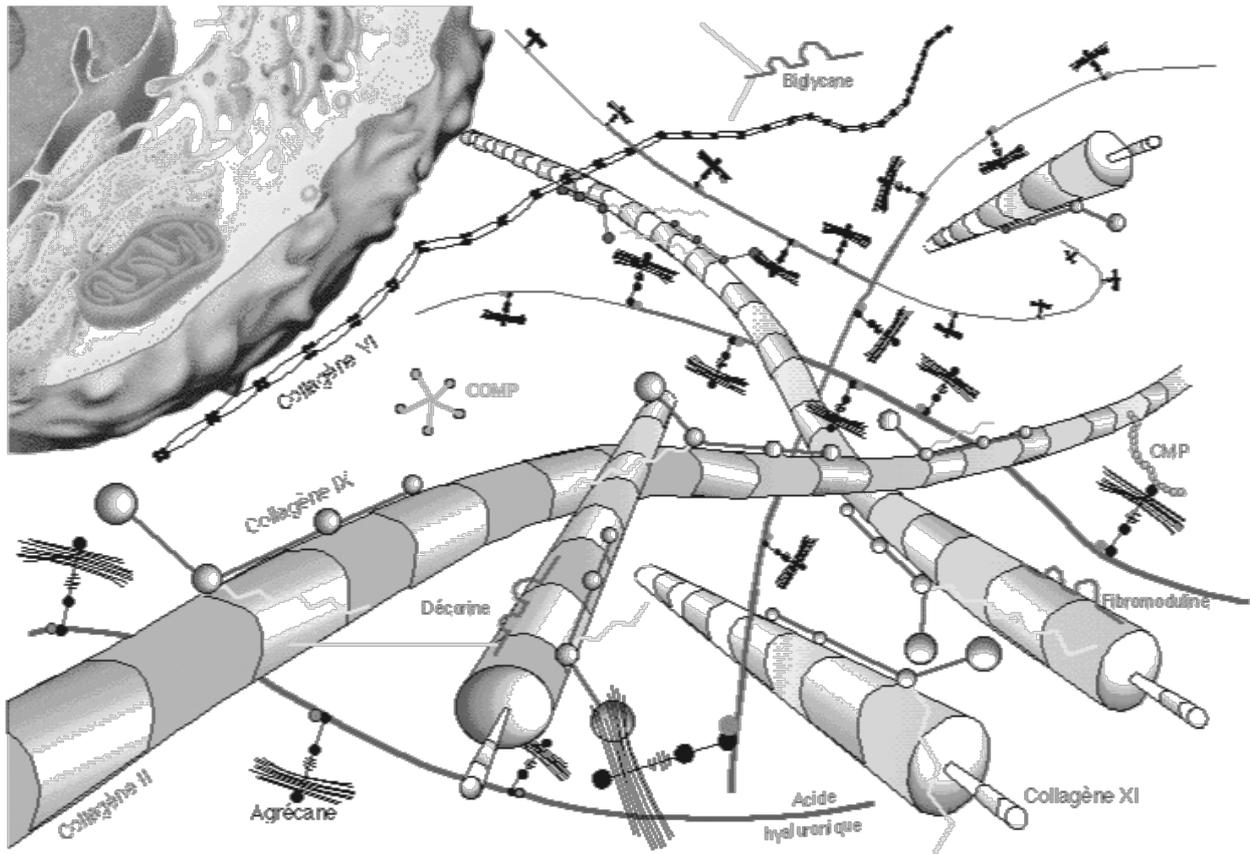
Le chondrocyte est le seul type cellulaire présent dans le cartilage articulaire. Les chondrocytes occupent 5 à 10 % du volume tissulaire<sup>39</sup>. Cette proportion varie d'une articulation à l'autre<sup>39</sup>. Dans une même articulation, elle varie d'un individu à l'autre<sup>40</sup> et en fonction des contraintes mécaniques exercées sur l'articulation. La densité cellulaire varie également d'une couche à l'autre au sein du cartilage : elle est plus importante dans la couche C1 que dans la couche C4. Le nombre de chondrocyte diminue progressivement avec l'âge, et ce dès 20 ans<sup>39</sup>. On considère que les chondrocytes ne se divisent plus après l'adolescence<sup>40</sup>, bien qu'ils restent métaboliquement très actifs. La morphologie et l'orientation de la cellule varient également en fonction de sa position dans le cartilage : dans la couche C1, les chondrocytes sont discoïdes et leur grand axe est parallèle à la surface articulaire. Dans la profondeur du tissu, ils s'arrondissent<sup>39</sup>.

En raison du caractère avasculaire du cartilage, le chondrocyte utilise essentiellement le glucose comme substrat énergétique et privilégie la voie de la glycolyse anaérobie. Il consomme de grandes quantités de glucose (provenant du liquide synovial) pour assurer la synthèse de glucosamine, un des constituants majeurs des protéoglycanes<sup>39</sup>. Pour favoriser les échanges avec le milieu, la membrane cytoplasmique des chondrocytes est hérissée de nombreuses villosités<sup>44</sup>.

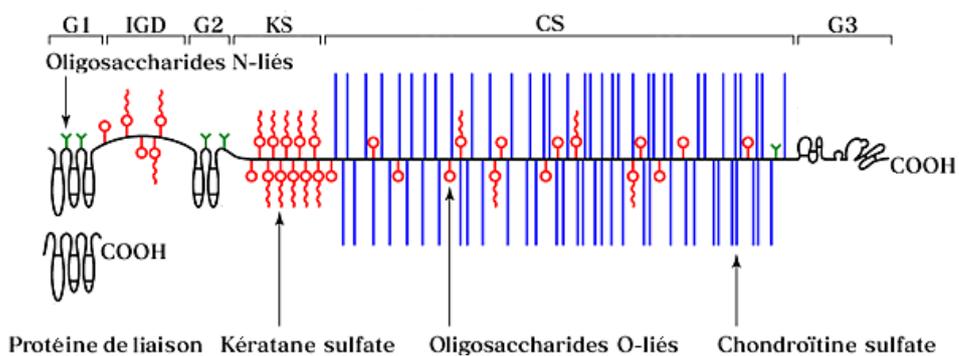
Chaque chondrocyte peut être considéré comme une unité métabolique fonctionnelle du cartilage, isolé des cellules voisines et responsable de l'élaboration et de l'homéostasie des constituants de la matrice extracellulaire qui l'entoure<sup>40</sup>.

### **3.3. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE**

La matrice extracellulaire du cartilage est principalement composée d'eau (65-70% du poids frais), de molécules d'agrécan (10% du poids frais, 90% des protéoglycanes du cartilage) et de collagène de type II (10-20% du poids frais, 90% des molécules de collagène du cartilage)<sup>40</sup>. Les autres molécules sont minoritaires. Il s'agit principalement des collagènes de type I, III, VI, IX, X, XI, XII et XIV, de l'acide hyaluronique et des petits protéoglycanes riches en leucine<sup>45-47</sup> (figures 4 et 5).

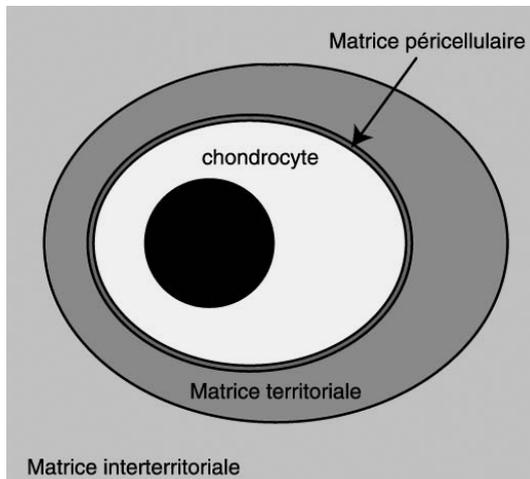


**Figure 4 :** Représentation schématique de la matrice extracellulaire du cartilage (d'après Mallein-Gerin<sup>19</sup>). Dans l'environnement extracellulaire, les molécules de collagène de type II s'organisent en hétérofibrilles avec les collagènes de type IX et XI et forment un réseau dont les mailles emprisonnent les molécules d'agrécan. Les agrécans sont sécrétées dans la matrice extracellulaire, où elles forment des complexes de haut poids moléculaire avec l'acide hyaluronique et la protéine de liaison.



**Figure 5 :** Structure d'une molécule d'agrécan (d'après Hardingham<sup>48</sup>). Elle est formée d'une protéine axiale sur laquelle s'attachent des chaînes de glycosaminoglycane (GAG). Ces GAG, qui représentent environ 90% de la masse totale de la macromolécule, sont le kératane sulfate (KS) et la chondroïtine sulfate (CS). G = domaine globulaire, IGD = domaine inter-globulaire. Le domaine G1 est également appelé HABR (hyaluronic acid binding region).

La matrice extracellulaire du cartilage adulte présente une organisation et une composition différente en fonction de la distance qui l'éloigne du chondrocyte. Ainsi, on peut distinguer trois types de matrice, dénommés matrice péri-cellulaire, matrice territoriale et matrice interterritoriale (figure 6)<sup>49</sup>.



*Figure 6 : Représentation schématique des compartiments de la matrice extracellulaire du cartilage (d'après Kuettner<sup>49</sup>).*

- *La matrice péri-cellulaire ou matrice lacunaire*

Il s'agit de la matrice directement adjacente à la membrane du chondrocyte. Elle est caractérisée par un pH acide (pH 6), par un contenu élevé en complexes de haut poids moléculaire d'agrécane, et par une faible teneur en collagène<sup>40</sup>.

Le métabolisme du chondrocyte est en permanence influencé par les propriétés physico-chimiques de l'espace péri-cellulaire (par exemple le pH péri-cellulaire)<sup>39</sup>.

- *La matrice territoriale ou capsulaire*

Elle est riche en fibrilles de collagène, principalement de type VI et II, qui forment une capsule autour d'un chondrocyte ou d'un groupe de chondrocytes<sup>40</sup>. On y trouve également des concentrations importantes d'agrécane et de décorine. Les chondrocytes établissent des contacts avec la matrice territoriale, notamment par de nombreuses extensions cytoplasmiques riches en microfilaments<sup>40</sup>.

- *La matrice interterritoriale*

Il s'agit du plus grand compartiment de la matrice extracellulaire et du plus éloigné de la membrane cellulaire du chondrocyte. Elle est riche en collagènes fibrillaires (de type II, XI et IX) et en agrécane<sup>40</sup>.

## 4. L'OS normal

**L**e tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire calcifiée qui lui permet d'assurer trois fonctions principales : une fonction mécanique, une fonction de protection des organes vitaux, et une fonction métabolique liée à sa capacité à stocker des minéraux, en particulier le calcium et le phosphate.

### 4.1. LES CELLULES DE L'OS

Les cellules osseuses appartiennent à deux lignées cellulaires : la lignée des ostéoblastes et la lignée des ostéoclastes<sup>50</sup> (figure 7).

#### 4.1.1. La lignée ostéoblastique

- ⇒ Les **pré-ostéoblastes** sont issus de la division de cellules mésenchymateuses localisées dans la moelle hématopoïétique de l'os trabéculaire. Ces pré-ostéoblastes sont des cellules allongées situées au contact des ostéoblastes matures.
- ⇒ Les **ostéoblastes** matures ont pour fonction de synthétiser la matrice pré-osseuse, dite substance ostéoïde et d'assurer sa minéralisation. Ils forment des tapis de cellules jointives. Le noyau des ostéoblastes est situé au pôle le plus éloigné du tissu osseux en formation. Le pôle opposé est fortement basophile, témoignant d'une activité de synthèse importante. Les ostéoblastes produisent de nombreuses protéines matricielles, cytokines et hormones. L'OC est un marqueur de la différenciation des ostéoblastes. Elle est produite uniquement durant la phase de minéralisation de l'os. Au terme de leur phase de maturation, trois destins sont possibles pour les ostéoblastes<sup>50</sup> :
  - × Dix à 20 % des ostéoblastes sont piégés dans la matrice minéralisée et deviennent des **ostéocytes**. L'ostéocyte est situé dans une logette ovale appelée ostéoplaste. Il est relié aux ostéocytes voisins ainsi qu'aux cellules bordantes par un réseau de canalicules contenant de fins prolongements cytoplasmiques. L'ostéocyte est sensible aux stimuli mécaniques.
  - × D'autres ostéoblastes s'aplatissent et réduisent très fortement leur activité métabolique. Ils deviennent des **cellules bordantes**, qui recouvrent les surfaces osseuses. Ces cellules bordantes sont quiescentes. Cependant, elles

sont capables, après stimulation, de se multiplier et de se redifférencier en ostéoblastes actifs.

- × Certains meurent par apoptose.

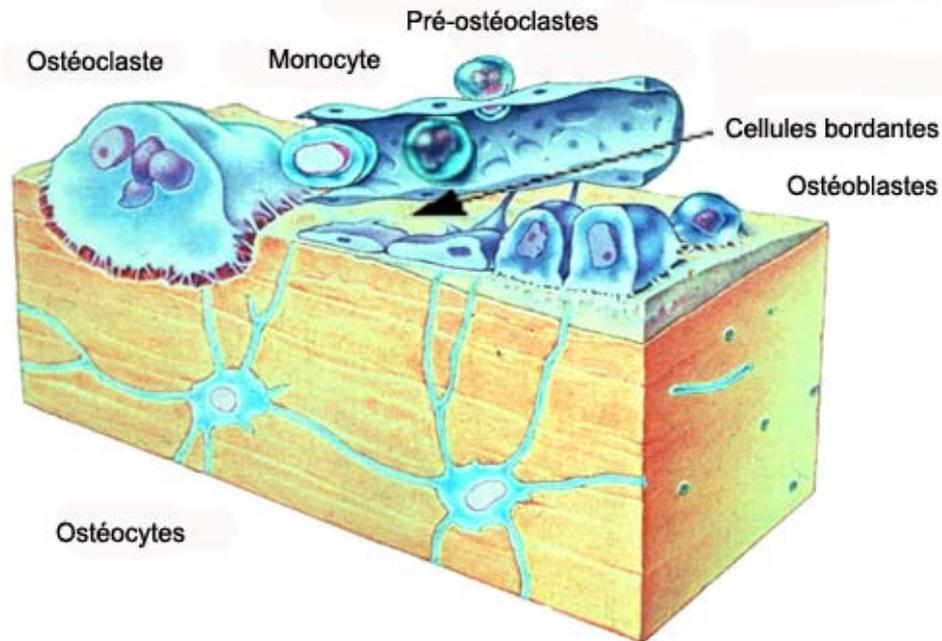
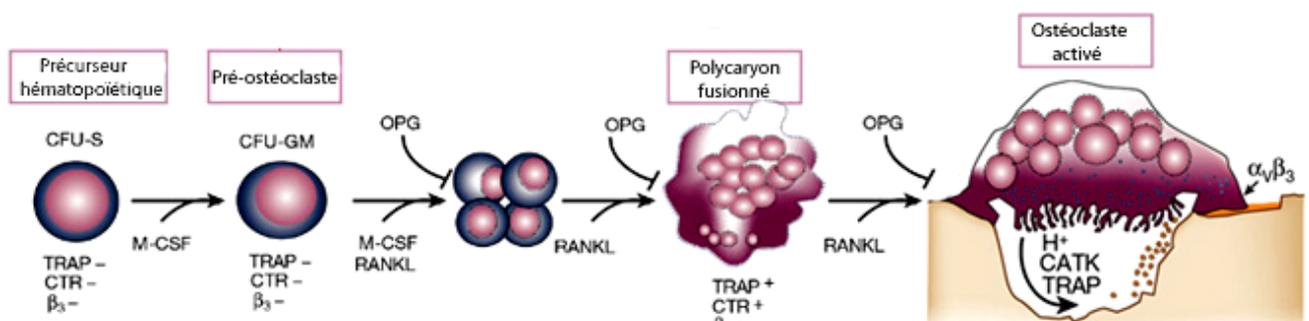


Figure 7 : Représentation schématique de la localisation des différents types cellulaires dans l'os normal.

#### 4.1.2. La lignée ostéoclastique

L'ostéoclaste est un polycaryon résultant de la fusion de 10 à 20 cellules individuelles. La maturation se produit dans l'os à partir de cellules mononucléées sanguines de la lignée des macrophages<sup>50</sup> (figure 8).



hématopoïétique en ostéoclaste mature (d'après Boyle<sup>21</sup>). CATK : cathepsine K, CFU-S : colony forming unit-spleen, CFU-GM : colony forming unit-granulocyte-macrophage, CTR : récepteur à la calcitonine, M-CSF : mononuclear phagocyte colony-stimulating factor, OPG : ostéoprotégérine, RANKL : receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase.

M-CSF (*mononuclear phagocyte colony-stimulating factor*) et RANKL (*receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*) jouent un rôle essentiel dans le processus d'ostéoclastogénèse. RANKL stimule l'activité des ostéoclastes en induisant la sécrétion de protons (H<sup>+</sup>) et d'enzymes protéolytiques dans la lacune formée entre la membrane basale de l'ostéoclaste et la surface osseuse (lacune de Howship)<sup>50</sup>. Cette lacune est fermée grâce à une multitude de jonctions cellule-matrice extracellulaire appelées podosomes. Chaque podosome est constitué par l'enchaînement de molécules de la matrice extracellulaire (ostéopontine, sialoprotéines, thrombospondine, vitronectine et collagène de type I), de molécules intracytoplasmiques (taline, vinculine,...) et de filaments d'actine du cytosquelette. L'acidification de ce compartiment par la sécrétion de protons provoque l'activation de la *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) et de la cathepsine K (CATK), qui sont les deux principales enzymes responsables de la dégradation de la matrice osseuse. L'ostéoprotégérine (OPG) peut se lier à RANKL et ainsi le neutraliser. Elle régule négativement l'ostéoclastogénèse et l'activation des ostéoclastes matures.

#### 4.2. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE OSSEUSE

La matrice extracellulaire osseuse est constituée d'eau (10 %), d'une phase protéique (25 %) et d'une phase minérale (65 %)<sup>52</sup>.

##### 4.2.1. La phase protéique

###### × *Les fibres de collagène*

Le collagène prédominant est le collagène de type I (99 % des molécules de collagène de la matrice osseuse et 90 % de sa phase protéique). Les collagènes de type V, VIII et XII sont associés aux fibres de collagène de type I<sup>47</sup>. Dans les tissus osseux lamellaires, elles ont un trajet hélicoïdal et sont parallèles les unes aux autres.

###### × *Les protéines carboxylées*

- L'OC est une protéine spécifique du tissu osseux. Elle a une grande affinité pour l'hydroxyapatite et le calcium. Elle est produite tardivement dans le processus de maturation ostéoblastique, juste avant la minéralisation de la matrice<sup>53</sup>.

- La gla-protéine matricielle est présente dans la matrice osseuse mais n'est pas spécifique de l'os<sup>47</sup>. On la trouve aussi dans le cartilage et dans la paroi des vaisseaux. Son rôle est de prévenir la calcification<sup>54</sup>.

× *L'ostéonectine*

Par sa capacité de liaison à la fois au calcium et aux molécules de collagène, cette protéine participe à la fixation des cristaux d'hydroxyapatite sur les fibres de collagène de la matrice ostéoïde<sup>55</sup>.

× *Les sialoprotéines*

Il s'agit de l'ostéopontine et de la *bone sialoprotein* (BSP). Leurs fonctions sont encore mal connues. L'ostéopontine permet la fixation du calcium et l'adhésion des ostéoclastes sur la travée osseuse<sup>56</sup>.

× *L'ostéoadhérine, la thrombospondine et la fibronectine*

Ces trois protéines jouent un rôle dans l'adhésion du calcium et des ostéoclastes sur la travée osseuse<sup>47</sup>.

× *Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes*

Il s'agit de l'acide hyaluronique, de la chondroïtine sulfate et de l'héparane sulfate.

La décorine et le biglycane sont les deux seuls protéoglycanes présents dans l'os<sup>57</sup>. Ils jouent un rôle dans l'organisation secondaire et tertiaire des molécules de collagène de type I.

#### 4.2.2. **La phase minérale**

Elle est composée de sels de calcium (phosphate tricalcique, bicarbonate de calcium, fluorure de calcium, citrate de calcium), ainsi que de sels de magnésium et de strontium<sup>50</sup>.

Dans la matrice osseuse, l'essentiel des sels minéraux se présente sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite répondant à la formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Ces cristaux sont situés entre les fibres de collagènes et à l'intérieur de celles-ci. Dix pour cent des atomes de calcium entrant dans la composition des cristaux d'hydroxyapatite sont situés à leur surface (expliquant la rapidité des échanges calciques dans le tissu osseux).

#### 4.3. LE REMODELAGE OSSEUX

Le remodelage de l'os est sous la dépendance des contraintes mécaniques<sup>58</sup>. La formation et la résorption osseuses sont indépendantes (figure 9) :

× *Phase d'activation*

La surface osseuse est normalement recouverte de cellules bordantes qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la matrice extracellulaire. Sous l'action de facteurs stimulant la résorption osseuse (PTH,  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine  $\text{D}_3$ ,  $\text{PGE}_2$ ), les cellules bordantes se rétractent, créant une voie de passage pour les ostéoclastes<sup>59</sup>.

× *Phase de résorption*

La résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes se déroule en deux étapes successives<sup>60</sup>. Dans un premier temps, la phase minérale est dissoute par acidification de la lacune d'Howship. Ensuite la matrice organique est dégradée par l'action d'enzymes protéolytiques (les hydrolases acides dont la phosphatase acide, les cathepsines et les métalloprotéinases). La phase de résorption dure environ 30 jours<sup>50</sup>.

× *Phase d'inversion*

Au terme de la phase de résorption, les ostéoclastes meurent par apoptose et sont remplacés par des macrophages dont le rôle est de nettoyer le fond de la lacune. A ce niveau, la surface osseuse est appelée ligne cémentante<sup>59</sup>.

× *Phase de formation du tissu osseux*

Elle se déroule en deux temps, au cours desquels les ostéoblastes jouent un rôle majeur :

⇒ Production et dépôt de la matrice ostéoïde

Quand la résorption de la matrice est terminée, les pré-ostéoblastes présents à la surface de la matrice érodée se divisent et se différencient en ostéoblastes. Ces ostéoblastes synthétisent une nouvelle matrice non minéralisée qui comble la lacune. Cette matrice est appelée substance ostéoïde<sup>50</sup>.

Plusieurs hormones, notamment les oestrogènes, les androgènes et la vitamine  $\text{D}_3$ , stimulent la production de substance ostéoïde. De nombreux facteurs de croissance, sécrétés par les ostéoblastes, stockés dans la matrice osseuse puis libérés sous forme

active lors de la résorption, agissent dans le même sens<sup>50</sup>. Il s'agit du FGF-2, des TGF- $\beta$ , des IGF et des BMP. Les BMP (-2 à -13) jouent un rôle essentiel dans l'ostéogenèse. Ces facteurs agissent à la fois sur le recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. A l'inverse, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  inhibent la production de la matrice osseuse par les ostéoblastes<sup>50</sup>.

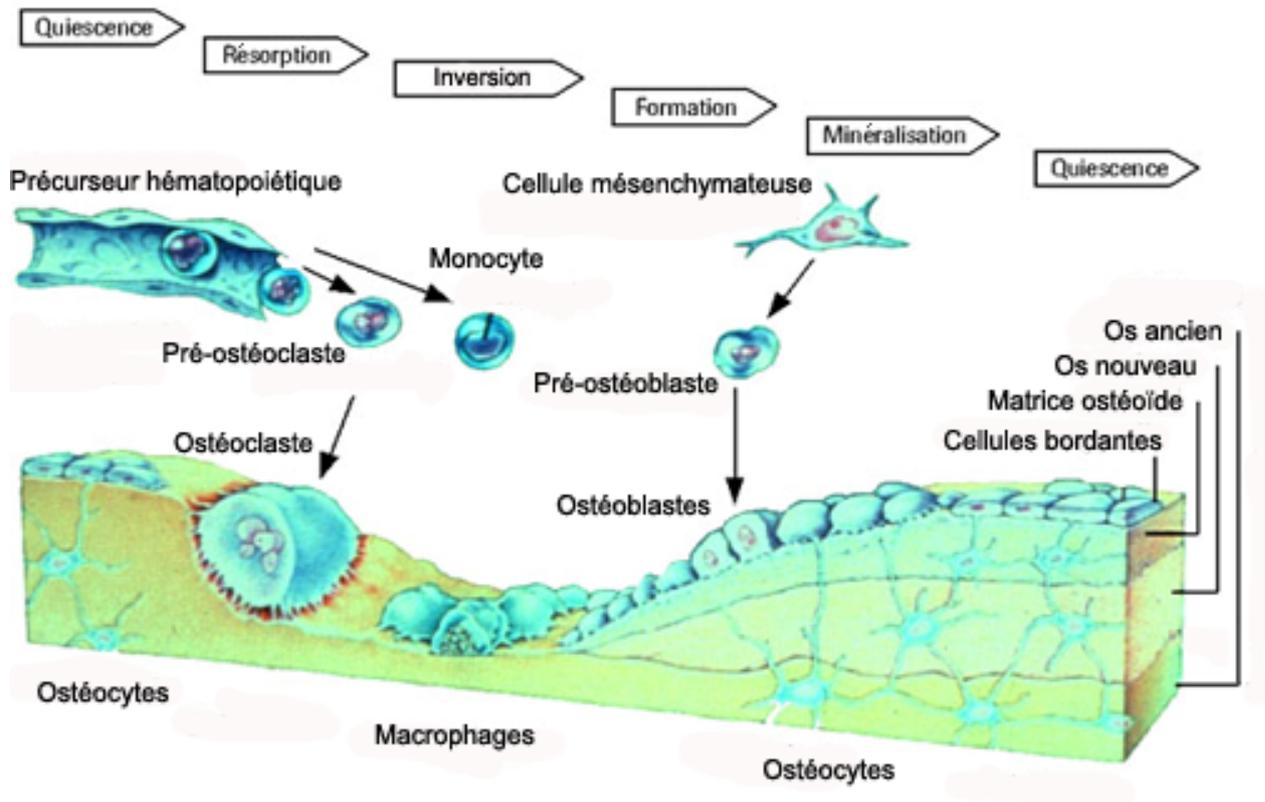


Figure 9 : Résorption et formation de la matrice osseuse.

#### ⇒ Minéralisation de la matrice

Après un délai de 10 à 15 jours, la substance ostéoïde se minéralise par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du réseau de collagène de type I<sup>50</sup>. La PAL, présente à la surface des ostéoblastes, hydrolyse des esters phosphoriques. Les ostéoblastes produisent des vésicules matricielles, réservoirs de PAL et d'ions qui, une fois déversés dans le milieu extracellulaire, initient la minéralisation de la substance ostéoïde<sup>50</sup>.

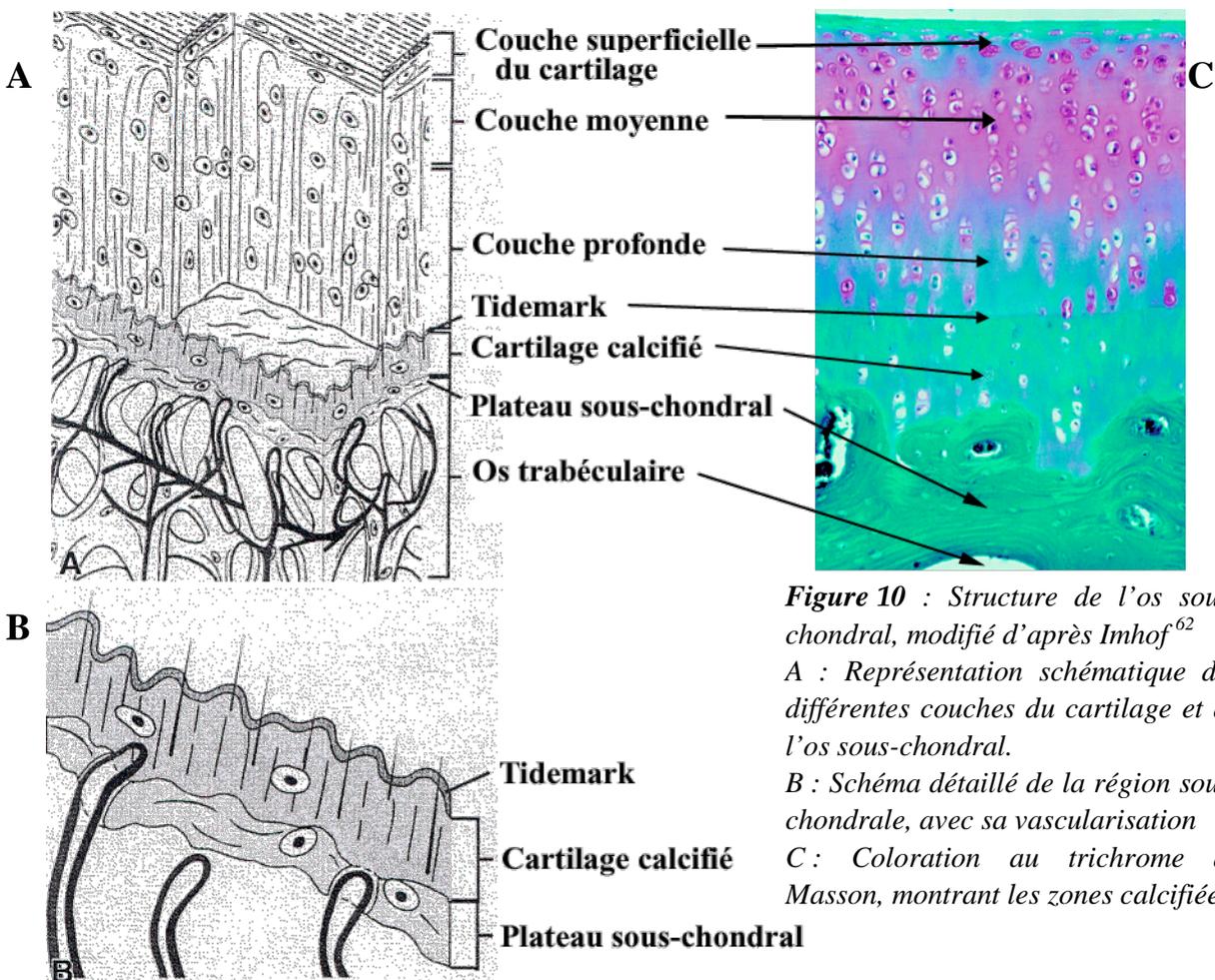
#### × *Phase quiescente*

Une fois la minéralisation achevée, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes et tapissent la surface osseuse néosynthétisée. Ils demeurent quiescents jusqu'à la prochaine phase de remodelage<sup>50</sup>.

#### 4.4. PARTICULARITES DE L'OS SOUS-CHONDRAL

L'os sous-chondral est la partie osseuse sur laquelle repose le cartilage articulaire. Il est formé de deux parties, le plateau sous-chondral et l'os trabéculaire (figure 10). Le plateau sous-chondral est la couche osseuse située entre le cartilage calcifié et l'os trabéculaire<sup>61</sup>. Il est formé d'os compact très vascularisé. Le cartilage articulaire est « imbriqué » dans l'os sous-jacent, à la manière des pièces d'un puzzle<sup>62</sup> (figure 10). Cette configuration permet de transformer les forces obliques de cisaillement exercées au niveau des surfaces articulaires en forces de compression.

Les fonctions principales de l'os sous-chondral sont de fournir un support au cartilage sus-jacent et d'absorber 30 % des contraintes mécaniques exercées sur l'articulation. A titre de comparaison, le cartilage n'amortit que 5 % de ces contraintes<sup>63-65</sup>. L'os sous-chondral assure également une partie des apports nutritifs du cartilage. Les vaisseaux terminaux présents au niveau sous-chondral ont un contact direct avec la couche profonde du cartilage<sup>66, 67</sup>. La perfusion de ces vaisseaux assure 50 % de l'apport en glucose et en oxygène de la couche profonde du cartilage<sup>62</sup>.



**Figure 10 :** Structure de l'os sous-chondral, modifié d'après Imhof<sup>62</sup>  
 A : Représentation schématique des différentes couches du cartilage et de l'os sous-chondral.  
 B : Schéma détaillé de la région sous-chondrale, avec sa vascularisation  
 C : Coloration au trichrome de Masson, montrant les zones calcifiées.

## 5. Physiopathologie de l'arthrose

**L**a définition de l'arthrose fait encore l'objet de nombreuses discussions. Plutôt que de parler d'arthrose au singulier, de nombreux auteurs préfèrent parler d'arthroses, voire de syndromes arthrosiques, dans la mesure où l'arthrose peut être idiopathique (primitive) ou secondaire à de nombreux facteurs (traumatiques, métaboliques, endocriniens, congénitaux, neurologiques).

Le terme arthrose désigne donc un ensemble de maladies, d'étiologies variées mais dont la séméiologie est commune. Une définition, visant à englober les principales facettes de cette affection, a été proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : « *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 provoqué par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques ou traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral associée à la formation d'ostéophytes et de géodes. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale* »<sup>68</sup>.

La vitesse et la sévérité de la dégradation du cartilage sont des paramètres très variables de l'arthrose. A titre d'exemple, des études radiologiques montrent que dans la gonarthrose, le pincement de l'interligne est en moyenne voisin de 0,25 mm par an, mais peut atteindre 1 à 2 mm par an dans les formes destructives rapides<sup>69</sup>. De plus, la destruction du cartilage n'est pas toujours linéaire, mais peut être entrecoupée de phases de restitution de l'interligne articulaire<sup>70</sup>.

D'un point de vue clinique, l'arthrose peut être considérée comme évoluant progressivement d'une forme asymptomatique dite « pré-clinique » vers une forme symptomatique et morbide appelée aussi « forme clinique ».

Le symptôme majeur de l'arthrose est la douleur. Cette douleur est mécanique. Elle apparaît dès la mise en fonction (déroutillage articulaire) ou après un certain délai de

fonctionnement de l'articulation. Mais les symptômes de l'arthrose ne se limitent pas à une douleur, et le clinicien averti peut reconnaître d'autres signes cliniques :

- × Une hypertrophie non liquidienne de l'articulation, bien visible aux mains, pieds et genoux.
- × Un épanchement articulaire, qui peut se voir dans certaines arthroses (par exemple : la gonarthrose), et surtout pendant les poussées inflammatoires.
- × Une douleur vive à la palpation de l'interligne et des épiphyses osseuses adjacentes.
- × Une raideur articulaire toujours présente, mais plus ou moins discrète et rarement importante, sauf à la hanche.
- × Des craquements, des blocages ou des dérobolements articulaires.

## 5.1. LES FACTEURS BIOCHIMIQUES DE L'ARTHROSE

Les principaux acteurs de la dégradation du cartilage sont les enzymes, les cytokines et les formes activées de l'oxygène.

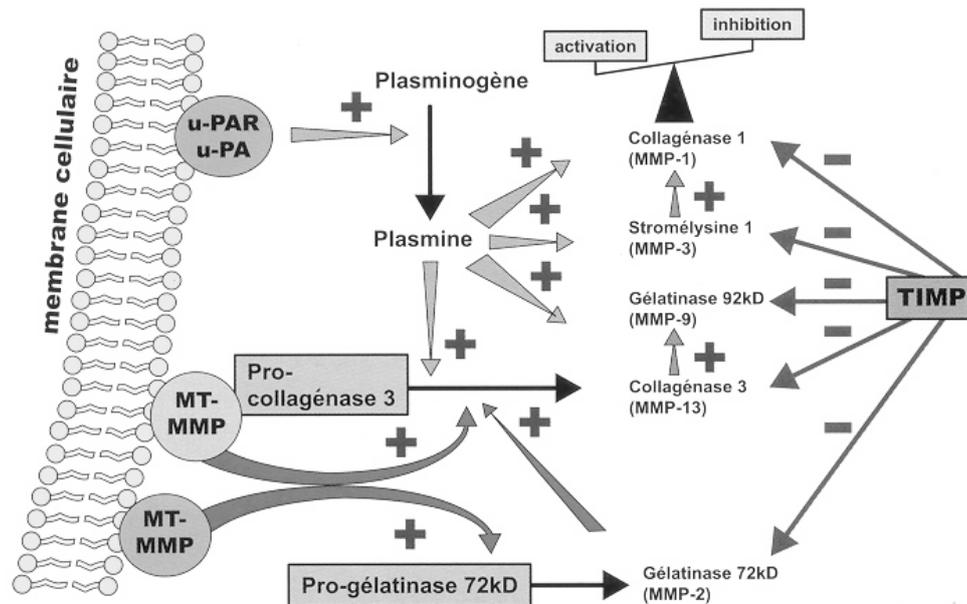
### 5.1.1. Les enzymes

Les enzymes impliquées dans la résorption du cartilage sont essentiellement les métalloprotéinases matricielles (MMP) et les agrécanases [*a disintegrin and a metalloproteinase with a thrombospondin motif* (ADAMTS-4 et -5)], les cathepsines (B, D, L et G), l'activateur du plasminogène, l'élastase et les hyaluronidases (HYAL1 à 3).

Les MMP peuvent être réparties en 4 groupes : les collagénases, les stromélysines, les gélatinases et les MMP membranaires (MT-MMP). Le tableau 1 reprend la classification de ces enzymes ainsi que leurs substrats.

Les MMP ont été localisées en quantités anormalement élevées dans le cartilage et le fluide synovial des patients arthrosiques<sup>71-78</sup>.

Ces enzymes sont sécrétées sous une forme inactive par le chondrocyte. Leur activation extracellulaire est complexe et fait intervenir en cascade des sérine protéinases, des MMP et des formes activées de l'oxygène. Ainsi, la MMP-3 et la plasmine peuvent activer la pro-MMP-1 et amplifier ainsi la protéolyse (figure 11)<sup>79</sup>. De plus, il s'agit d'un groupe d'enzymes dont l'activité est dépendante de la présence au niveau du site catalytique de deux ions zinc et d'ions calcium dans le milieu<sup>80</sup>.



**Figure 11 :** Cascade protéolytique d'activation des métalloprotéinases. MT-MMP : métalloprotéinases de type membranaire, TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases. u-PA : activateur du plasminogène de type urokinase. Selon Henrotin et al<sup>81</sup>.

**Tableau 1**

### Métalloprotéinases matricielles impliquées dans l'arthrose et leurs substrats

<b>MMP</b>	<b>Enzyme</b>	<b>Activateurs connus</b>	<b>Substrats connus</b>
MMP-1	Collagénase-1	MMP-3, MMP-10 Plasmine, kallikréine, chymase	Collagènes I, II, III, VII, VIII, X et XI, gélatine, agrécane, versican, protéine de liaison, proTNF $\alpha$ , proMMP-1, -2, et -9, IGFBP-2 et -3, MCP-1, -3 et -4, IL- $\beta$
MMP-8	Collagénase-2	MMP-3, -10 Plasmine	Collagènes I, II, III, V, VII, VIII et X, gélatine, agrécane, fibronectine, ADAMTS-1, MCP-1
MMP-13	Collagénase-3	MMP-2, -3, -10, -14, -15, plasmine	Collagènes I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV et XVIII, gélatine, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 2, agrécane, proMMP-9, MCP-3
MMP-2	Gélatinase A	MMP-1, -7, -9, -13, -14, -15, 16, -24 Plasmine, chymase	Collagènes I, III, IV, V, VII, X, XI et XIV, gélatine, fibronectine, agrécane, décorine, protéine de liaison, proTNF $\alpha$ , proMMP-9, proMMP-13, IGFBP-3 et -5, ADAMTS-1, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ latent
MMP-9	Gélatinase B	MMP-2, -3, -10, -13 Plasmine, élastase	Collagènes IV, V, VII, X, XI et XIV, gélatine, agrécane, décorine, protéine de liaison, fibronectine, proTNF $\alpha$ , IGFBP-3, IL-1 $\beta$ , IL-2R $\alpha$ , proMMP-2, TGF- $\beta$ latent
MMP-3	Stromélysine-1	Plasmine, kallikréine, chymase, élastase, cathepsine G	Collagènes III, IV, V, VII, IX, X et XI, gélatine, agrécane, décorine, protéine de liaison, fibronectine, proTNF $\alpha$ , proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9, proMMP-13, IGFBP-3, IL-1 $\beta$ , uPA
MMP-11	Stromélysine-3	Furine	$\alpha_1$ -protéinase inhibiteur, IGFBP-1
MMP-7	Matrilysine-1	MMP-3 et -10 Plasmine	Collagènes I, IV et X, gélatine, agrécane, protéine de liaison, fibronectine, décorine, pro $\alpha$ 1NFproMMP -1, proMMP-2, -9
MMP-14	MT1-MMP	Plasmine, furine	Collagènes I, II et III, gélatine, fibronectine, agrécane, MCP-3, CD44, proMMP-2, proMMP-13, proTNF $\alpha$

*ADAMTS : a disintegrin and a metalloproteinase with a thrombospondin motif, IGFBP : insulin-like growth factor binding protein, IL : interleukine, MCP : monocyte chemoattractant protein, MMP : matrix metalloproteinase, TGF : transforming growth factor, TNF : tumor necrosis factor, uPA : urokinase plasminogen activator.*

### 5.1.2. Les inhibiteurs des métalloprotéinases

Les métalloprotéinases sont inhibées par des chélateurs de métaux et de façon stœchiométrique par des protéines spécifiques, appelées « *tissue inhibitors of metalloproteinases* » (TIMP)<sup>82</sup>. A ce jour quatre TIMP ont été identifiés chez l'homme. Il s'agit des TIMP-1, -2, -3 et -4. Ils sont tous présents au sein de l'articulation et synthétisés notamment par les chondrocytes et les ostéoblastes<sup>83-87</sup>.

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 inhibiteur et par conséquent à une augmentation de l'activité enzymatique de type métalloprotéinase au sein des tissus pathologiques<sup>88</sup>.

Les différents TIMP se distinguent par des propriétés particulières :

- × Le TIMP-1 est le plus abondant, et il possède une très haute affinité pour la plupart des MMP, excepté les MT-MMP. Il est également capable d'inhiber ADAM-10<sup>89</sup>.
- × Le TIMP-2 interagit également avec la plupart des MMP, y compris les MT-MMP<sup>90</sup>.
- × Le TIMP-3 possède deux particularités importantes. Contrairement aux autres TIMP, il a la capacité de se fixer sur les GAG sulfatés de la matrice extracellulaire<sup>91</sup>. D'autre part, outre le fait d'inhiber la majorité des MMP<sup>92</sup>, TIMP-3 est un inhibiteur des agrécanases (ADAMTS-1, -4, et -5), ainsi que des ADAM-10, -12 et -17<sup>93</sup>. Son affinité pour les agrécanases est plus importante que pour les MMP-1, -2 et -3<sup>94</sup>.
- × Le TIMP-4 inhibe également la plupart des MMP. Dans un modèle d'arthrite chez le rat, l'injection de TIMP-4 *in vivo* bloque complètement le développement de l'arthrite. Cette inhibition est associée à une diminution de l'activité des MMP mais également à une diminution des taux sériques du TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ <sup>95</sup>.

Le cartilage contient également d'autres inhibiteurs enzymatiques. Il s'agit de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1), de l' $\alpha$ 2-antiplasmine, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et de l' $\alpha$ 1-antitrypsine<sup>96</sup>.

### 5.1.3. Les cytokines

Le terme cytokine regroupe un ensemble de protéines et de glycoprotéines de faible poids moléculaire impliquées dans la communication entre les cellules. Elles exercent leur activité régulatrice de façon autocrine, paracrine, juxtacrine ou endocrine. Actuellement, plus de 150 cytokines ont été recensées. Certains auteurs ont tenté de les répertorier selon leur origine cellulaire (par exemple lymphokines ou monokines) ou selon leur activité biologique. Nous avons choisi de les classer dans trois catégories : les cytokines cataboliques, anaboliques ou régulatrices selon l'activité biologique principale qu'elles exercent sur le cartilage (tableau 2). Cette classification est régulièrement utilisée dans les articles de synthèse traitant ce sujet<sup>97, 98</sup>. Les cytokines régulatrices sont appelées ainsi, car leur fonction principale consiste à moduler l'activité biologique d'autres cytokines. Au sein de l'articulation, les cytokines sont produites par les chondrocytes, les cellules de la membrane synoviale et de l'os sous-chondral.

**Tableau 2 : Principales cytokines impliquées dans la régulation du métabolisme du cartilage**

#### 1. Les cytokines cataboliques

L'interleukine-1 (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ )  
 Le *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ )  
 L'interleukine-8 (IL-8)  
 L'interleukine-17 (IL-17)  
 L'interleukine-18 (IL-18)  
 Le *Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$*  (MIP-1 $\beta$ )  
 Le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF)

#### 2. Les cytokines régulatrices

L'interleukine-6 (IL-6)  
 L'interleukine-4 (IL-4)  
 L'interleukine-10 (IL-10)  
 L'interleukine-13 (IL-13)  
 L'interféron- $\gamma$  (INF $\gamma$ )  
 L'oncostatine M (OSM)

#### 3. Les cytokines anaboliques

Les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP-2, -4, -7, -7, -9, -13)  
 Les *Fibroblast Growth Factor* (FGF-2, -4, -8)  
 Le *Growth Differentiation Factor* (GDF-5)  
 L'*Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1)  
 Le *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF)  
 Les *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3)

Dans ce paragraphe, seulement trois cytokines feront l'objet d'un développement détaillé, car elles ont été testées sur nos modèles expérimentaux. Il s'agit de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM.

### × L'IL-1 $\beta$

L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire qui existe sous la forme de deux polypeptides ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de 17,5 kDa, exprimés par des gènes différents mais reconnaissant les mêmes récepteurs membranaires. L'IL-1 $\alpha$  est principalement (95 %) associée à la membrane cellulaire tandis que l'IL-1 $\beta$  est libérée dans le milieu extracellulaire<sup>99</sup>. L'IL-1 $\beta$  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<sup>99</sup>. Chez les mammifères, une seule protéase, la caspase-1, est capable de convertir la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  active<sup>99</sup>. D'autre part, plusieurs facteurs modulent l'activité biologique de l'IL-1 $\beta$ . Il s'agit :

- des cytokines qui inhibent sa synthèse (principalement l'IL-4 et l'IL-10)<sup>99</sup> ;
- des formes solubles des trois récepteurs (sIL-1RI, sIL-1RII et sIL-1RAcP)<sup>99</sup>, qui antagonisent les effets de l'IL-1 ;
- un antagoniste de ces récepteurs, l'IL-1Ra, qui existe sous forme soluble (sIL-1Ra) ou intracellulaire (icIL-1Ra I et II)<sup>100</sup>.

#### ⇒ Les actions de l'IL-1 $\beta$ sur le cartilage

L'implication de l'IL-1 $\beta$  dans les pathologies ostéoarticulaires a été démontrée par de nombreuses études<sup>101-106</sup>. Aussi, une quantité élevée d'ARNm de l'IL-1 $\beta$  a été détectée dans les couches superficielles du cartilage arthrosique<sup>107</sup>. De plus, le nombre d'IL-1RI est plus élevé à la surface des chondrocytes arthrosiques que sur les chondrocytes sains<sup>108</sup>. Les chondrocytes arthrosiques sont donc plus sensibles à l'action de l'IL-1 $\beta$ .

*In vitro*, l'IL-1 $\beta$  stimule la synthèse par les chondrocytes de la majorité des MMP, des cystéines et des sérines protéinases et réduit la production de TIMP-1 et de PAI<sup>104-106, 109, 110</sup>. Il en résulte une augmentation de la protéolyse matricielle.

De plus, elle inhibe la synthèse des principales protéines matricielles<sup>103, 111</sup> et s'oppose aux effets stimulants de certaines cytokines anaboliques (par exemple l'IGF-

1), réduisant ainsi la capacité de réparation du cartilage. Elle provoque également la libération massive par les chondrocytes de chimiokines (par exemple l'IL-8), d'IL-6, de formes activées de l'oxygène et de prostanoides (par exemple la PGE<sub>2</sub>) (tableau 3)<sup>112-114</sup>.

**Tableau 3 : Principales actions de l'IL-1 $\beta$  sur le métabolisme des chondrocytes**

- 
- ↗ la synthèse des MMP<sup>102</sup>.
  - ↗ l'activité de ADAMTS-4, de la cathepsine B et de l'activateur du plasminogène de type urokinase et tissulaire (u-PA et t-PA)<sup>96, 102</sup>.
  - ↘ la synthèse des TIMP et de PAI-1<sup>96</sup>.
  - ⇒ Par conséquent, elle induit un déséquilibre entre les enzymes destructrices de la matrice et leurs inhibiteurs.
  - ↘ la synthèse des collagènes de type II, IX et XI<sup>103</sup>.
  - ↘ la synthèse de l'agrécan, de la décorine et du biglycan<sup>115</sup>.
  - ↘ la production de cytokines anaboliques (par exemple le TGF- $\beta$ 1)<sup>116</sup>.
  - ↗ la production d'anion superoxyde<sup>112</sup>.
  - ↗ la synthèse du \*NO par induction de l'expression de iNOS<sup>117</sup>.
  - ↗ la synthèse de la PGE<sub>2</sub>, l'expression de la phospholipase A<sub>2</sub> et de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2)<sup>114, 118</sup>.
  - ↗ la production de cytokines régulatrices et cataboliques (par exemple l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8)<sup>119</sup>.
  - ↗ de la production de l'IL-1Ra<sup>100</sup>.
- 

*ADAMTS : a disintegrin and a metalloproteinase with a thrombospondin motif, IL-1Ra : interleukin-1 receptor antagonist, MMP : matrix metalloproteinase, \*NO : oxide nitrique, iNOS : inducible nitric oxide synthase, PAI : plasminogen activator inhibitor, PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>, TGF : transforming growth factor, TIMP-1 : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinase .*

#### ⇒ *Les actions de l'IL-1 $\beta$ sur l'os*

L'IL-1 $\beta$  induit la résorption osseuse par une succession d'événements impliquant les ostéoblastes et les ostéoclastes<sup>120</sup>. L'IL-1 $\beta$  stimule la production d'IL-6 et de PGE<sub>2</sub> par les ostéoblastes, deux facteurs responsables de l'activation des ostéoclastes<sup>121</sup>. L'IL-1 $\beta$  augmente la production d'uPA<sup>122</sup> et de PTHrP<sup>123</sup> par les ostéoblastes en culture. Par contre, elle diminue la production de TGF- $\beta$ 1, d'OC et de PAL par les ostéoblastes<sup>122, 123</sup>. Enfin, l'IL-1 $\beta$  stimule la prolifération des précurseurs ostéoblastiques<sup>120</sup>.

## × L'IL-6

L'IL-6 est produite par une grande variété de cellules dont les lymphocytes, les monocytes/macrophages, les synoviocytes, les chondrocytes et les ostéoblastes<sup>99</sup>. Il s'agit d'un peptide de 25 ou 30 kDa suivant qu'elle soit O-glycosylée ou N- et O-glycosylée<sup>99</sup>. Les chondrocytes expriment les deux sous unités ( $\alpha$  et gp130) du récepteur pour l'IL-6<sup>124</sup>. La synthèse de l'IL-6 est induite par de nombreuses cytokines dont l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$ , mais également l'IL-6<sup>99</sup>.

Le rôle de l'IL-6 dans les pathologies inflammatoires reste ambigu. L'IL-6 exerce un rôle pro-inflammatoire en favorisant la maturation des lymphocytes T, B et des monocytes et en prolongeant la vie des neutrophiles<sup>125-127</sup>. D'autre part, l'IL-6 est le principal inducteur de la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes<sup>128</sup>. Ces protéines sont pour la plupart des anti-protéases dont le rôle est de limiter la dégradation tissulaire lors de la réaction inflammatoire<sup>129</sup>. Lorsqu'elle est administrée *in vivo*, l'IL-6 augmente les taux plasmatiques d'IL-1Ra et du récepteur soluble pour le TNF $\alpha$ <sup>130</sup>. L'activité biologique de l'IL-6 est modulée par la forme soluble de son récepteur  $\alpha$  (IL-6sR). IL-6sR augmente l'activité biologique de l'IL-6 en se complexant d'une part avec l'IL-6 et d'autre part avec le récepteur membranaire gp130<sup>131</sup>. L'IL-6sR, produite en grande quantité par les hépatocytes, est présente dans le sérum et dans le liquide synovial, mais n'est pas synthétisée par les cellules de l'articulation<sup>132</sup>. *In vitro*, les effets de l'IL-6 sont augmentés après l'ajout d'IL-6sR<sup>131, 133</sup>.

### ⇒ Action de l'IL-6 sur le cartilage

Les effets de l'IL-6 sur le cartilage sont ambigus :

D'une part, ce facteur augmente la production du TGF- $\beta$ 1<sup>116</sup>, de TIMP-1<sup>134</sup> ainsi que de l' $\alpha$ 1-antitrypsine<sup>129</sup> et diminue celle de l'anion superoxide<sup>135</sup> et de l'IL-8<sup>119</sup> par les chondrocytes humains, suggérant un rôle protecteur de cette cytokine. Des souris *knock-out* pour le gène IL-6 développent une arthrose spontanée plus sévère que les souris sauvages<sup>136</sup>.

D'autre part, l'IL-6 diminue l'expression du collagène de type II, de l'agrécane et de la protéine de liaison par les chondrocytes bovins *in vitro*, en parallèle avec une diminution du facteur de transcription sox9<sup>137</sup>. De plus, Nietfeld et ses collaborateurs

(2000) ont montré, sur des cultures d'explants de cartilage humain, que l'action inhibitrice de l'IL-1 sur la production des protéoglycanes est supprimée par la présence d'anticorps neutralisant l'activité de l'IL-6<sup>138</sup>. Récemment, il a été démontré que l'IL-6, ajoutée conjointement avec de l'IL-1 $\alpha$  au milieu de culture, induit *in vitro* la dégradation de la trame de collagène du cartilage ainsi que des protéoglycanes, alors que l'administration séparée de ces agents ne s'accompagne d'aucun effet<sup>139-141</sup>. Ce catabolisme est corrélé avec l'augmentation de l'expression de ADAMTS-5<sup>141</sup>. Ces observations suggèrent que la présence de l'IL-6 est nécessaire à l'expression de l'activité biologique de l'IL-1.

#### ⇒ Action de l'IL-6 sur l'os

L'IL-6 est également impliquée dans le remodelage osseux.

Elle induit la maturation et la prolifération des précurseurs ostéoclastiques, ce qui se traduit par une augmentation de la résorption osseuse<sup>142</sup>. L'effet de l'IL-6 sur l'activation ostéoclastique inclut de nombreux médiateurs secondaires comme l'IL-1, la PGE<sub>2</sub> et RANKL<sup>143-145</sup>. Cependant, la détection de récepteurs à l'IL-6 à la surface des cellules ostéoclastiques, encore mononucléées, laisse supposer que l'IL-6 pourrait également influencer directement la formation des ostéoclastes ou la fonction de l'ostéoclaste mature<sup>146</sup>. De plus, elle augmente l'expression de MMP-2 et MMP-13 par les ostéoblastes<sup>147, 148</sup>.

D'un autre côté, l'IL-6 induit la synthèse d'IGF-1 et d'IGFBP5 par les ostéoblastes<sup>149</sup>. L'IL-6 augmente l'expression de PAL et d'OC par ces cellules<sup>150</sup>. Elle potentialise également la différenciation ostéoblastique induite par la BMP-7<sup>151</sup>.

#### × L'oncostatine M (OSM)

L'OSM est une cytokine multifactorielle de 28 kDa appartenant à la famille de l'IL-6. Elle doit son nom à sa capacité d'inhiber la prolifération de certaines lignées de cellules tumorales. Elle est présente dans le fluide synovial des patients arthrosiques ainsi que dans celui des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde<sup>152, 153</sup>. Au sein de l'articulation, elle est produite essentiellement par les lymphocytes T activés, les monocytes, les macrophages<sup>154</sup> et les synoviocytes<sup>155</sup>. L'OSM, comme toutes les cytokines de la famille de l'IL-6, se lie à la sous-unité gp130.

Aussi, *in vivo* et *in vitro*, l'OSM induit de manière importante la production l'IL-6<sup>156</sup>.

⇒ *Actions de l'OSM sur le cartilage*

*In vitro*, l'OSM augmente la synthèse de TIMP-1 et 3 par les chondrocytes<sup>157</sup>, mais également celle de MMP-1, -3 et -13, ainsi qu'ADAMTS-4<sup>155, 158</sup>.

Chez l'animal, l'injection d'OSM dans l'articulation induit une inhibition de la synthèse de glycosaminoglycanes et augmente la quantité de glycosaminoglycanes libérée dans le fluide synovial<sup>159</sup>.

Comme l'IL-6, l'OSM potentialise de nombreux effets de l'IL-1 $\beta$  *in vitro*. Dans un modèle de culture d'explants de cartilage, elle induit la dégradation des protéoglycanes et de collagène en présence d'IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$  ou de TNF- $\alpha$ <sup>139, 155, 160</sup>. Elle augmente également l'effet stimulant de l'IL-1 $\alpha$  sur la production de MMP-1, -3, -8, -13 et ADAMTS-4 par les chondrocytes<sup>158</sup>.

⇒ *Actions de l'OSM sur l'os*

Contrairement à l'IL-6, l'OSM n'est pas produite par les ostéoblastes, et sa production n'est pas induite par l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$ <sup>154</sup>. Néanmoins, cette cytokine exerce de nombreuses actions au niveau de l'os, et les ostéoblastes expriment le récepteur spécifique pour l'OSM (OSMR)<sup>161</sup>. Elle inhibe l'apoptose des ostéoblastes et diminue leur synthèse de PAL<sup>162</sup> et d'OC<sup>161</sup>. Elle favorise la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes ou en cellules bordantes<sup>163</sup>. L'OSM augmente la production d'IL-6, de RANKL, d'OPG<sup>145, 164</sup>, de MMP-13<sup>165</sup>, de TIMP-1<sup>165</sup> et de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*)<sup>166</sup> par les ostéoblastes. Comme les autres membres de la famille des cytokines de type IL-6, elle induit l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse, par un mécanisme en partie dépendant de la synthèse de PGE<sub>2</sub><sup>164</sup>.

#### 5.1.4. Les formes activées de l'oxygène et les prostanoides

Les chondrocytes produisent essentiellement du monoxyde d'azote ( $\cdot$ NO) et de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Le  $\cdot$ NO est produit par les NO synthétases (NOS), et  $O_2^{\cdot-}$  par la NADPH oxydase. A partir de  $\cdot$ NO et de  $O_2^{\cdot-}$ , d'autres formes activées de l'oxygène,  $H_2O_2$ ,  $\cdot$ OH,  $-ONOO$ , sont formées en cascade<sup>167, 168</sup>.

Leurs productions peuvent être stimulées *in vitro* par des agents mitogènes (la concavalline A, le calcium ionophore A23187), des activateurs de la protéine kinase C, des cytokines (l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$ ), des immunoglobulines (IgG), des cycles d'anoxie-réoxygénation ou encore par des stimuli mécaniques<sup>167, 169, 170</sup>.

Les formes activées de l'oxygène sont des médiateurs de la dégradation du cartilage. Elles sont capables de réagir avec les protéines matricielles et d'altérer leur structure primaire, secondaire ou tertiaire, au point de les dénaturer<sup>171</sup>. Dans le cartilage, l'agrécan, l'acide hyaluronique et les collagènes sont dégradés par oxydation, sous l'action des formes activées de l'oxygène<sup>172</sup>. Elles sont également capables d'activer les MMP latentes et d'inhiber l'activité de l' $\alpha$ 1-antitrypsine<sup>173</sup>. De cette façon, elles diminuent les mécanismes de défense de l'organisme contre l'action des protéases. Aussi, l'exposition des chondrocytes à des concentrations élevées d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque une diminution de la synthèse des protéines matricielles du cartilage, par une diminution du facteur de transcription sox9<sup>174</sup>. Les formes activées de l'oxygène sont également impliquées dans la régulation des voies de signalisation intracellulaires déclenchées par de nombreux facteurs de croissance et cytokines<sup>175</sup>. Par exemple, l'induction des collagénases par l'IL-1 $\beta$  implique des formes activées de l'oxygène, et en particulier le  $\cdot$ NO<sup>176</sup>.

Les prostanoïdes, prostaglandines (PG) et thromboxanes, sont produits par une cascade enzymatique faisant intervenir la phospholipase A<sub>2</sub>, qui libère les acides gras précurseurs (principalement l'acide arachidonique) de la membrane phospholipidique. Ensuite, les cyclo-oxygénases (COX) transforment les acides gras précurseurs en PGH. La PGE<sub>2</sub> est ensuite produite à partir de la PGH<sub>2</sub> par l'action des PGE synthétases (PGES). Les PG sont des vasodilatateurs et contribuent à la formation de l'oedème et à la genèse des influx nociceptifs au cours de la réaction inflammatoire<sup>81</sup>.

Dans l'arthrose, l'expression de COX-2 et des PGES par les chondrocytes, synoviocytes et ostéoblastes est accrue<sup>177, 178</sup>, et des taux anormalement élevés de PGE<sub>2</sub> sont présents dans le liquide synovial des patients arthrosiques<sup>179</sup>. La PGE<sub>2</sub> agit suite à son interaction avec des récepteurs spécifiques couplés à des protéines G, dénommés EP (1-4)<sup>180</sup>, ainsi que par l'activation des récepteurs nucléaires de la classe des PPAR, qui agissent directement comme facteurs transcriptionnels<sup>181</sup>. La PGE<sub>2</sub> stimule la prolifération des chondrocytes<sup>182</sup> et augmente leur production d'IGF-1, et par conséquent la production de protéines matricielles<sup>183</sup>.

## 5.2. LES MECANISMES PATHOGENIQUES DE L'ARTHROSE

La faillite structurelle et fonctionnelle du cartilage articulaire résulte du déséquilibre entre, d'une part, la combinaison d'un stress mécanique et du dysfonctionnement métabolique des tissus articulaires, et d'autre part, la capacité du cartilage à supporter une agression et à réparer les dommages constitués. D'une manière générale, on peut considérer que la destruction du cartilage articulaire résulte soit d'un stress mécanique exercé sur un cartilage normal ou de sollicitations mécaniques normales appliquées sur un cartilage fragilisé (par exemple par le vieillissement)<sup>184</sup>.

Les agressions mécaniques répétées provoquent la rupture et la dissociation des fibres de collagène. Il s'ensuit une expansion anormale et une fragmentation des protéoglycanes, et l'apparition d'un œdème du cartilage. Ces circonstances pathogéniques s'accompagnent de perturbations métaboliques importantes se traduisant par une activation des chondrocytes et la libération excessive de médiateurs de l'inflammation et de la chondrolyse<sup>184</sup>.

Les facteurs biochimiques impliqués dans l'initiation et la progression de l'arthrose sont multiples. Ils exercent leurs activités biologiques au sein de trois boucles pathogéniques mettant en relation le cartilage, la membrane synoviale et l'os sous-chondral. Il s'agit des boucles physiopathologiques cartilagino-cartilagineuse, synovio-cartilagineuse et ostéo-cartilagineuse. Le chondrocyte occupe une position centrale et joue un rôle primordial dans l'ensemble de ces mécanismes physiopathologiques.

### 5.2.1. La boucle cartilagino-cartilagineuse

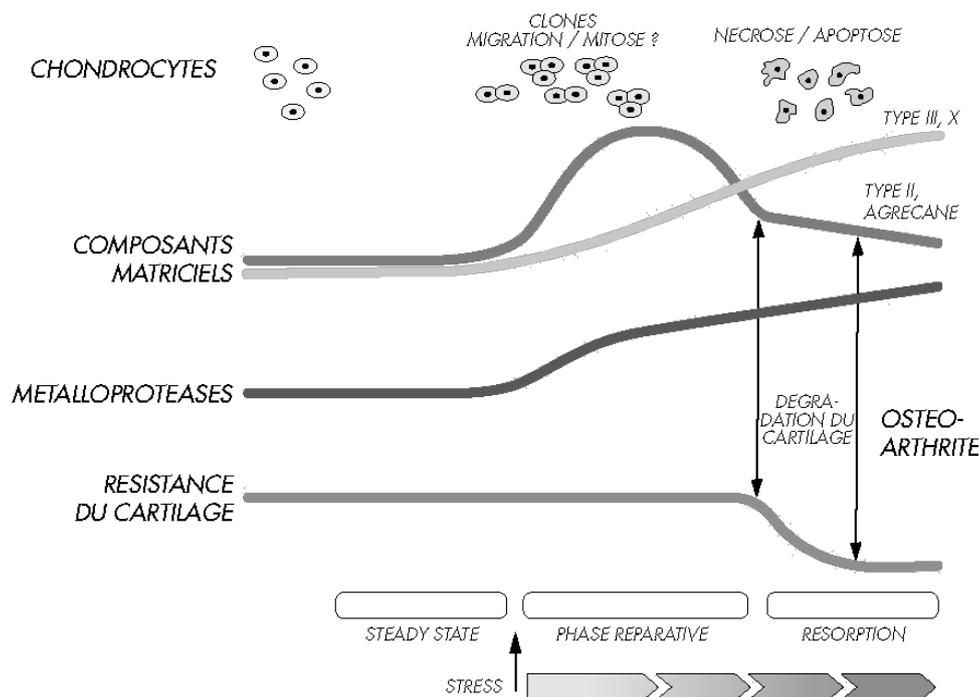
Dans le cartilage arthrosique, les chondrocytes sont impliqués dans trois processus pathologiques dénommés phase réactionnelle, chondrolyse péricellulaire et ossification endochondrale.

#### × **La phase réactionnelle**

Chez l'animal, une lésion mécanique du cartilage induit d'importantes modifications métaboliques et morphologiques des chondrocytes voisins de celle-ci<sup>185</sup>. Les chondrocytes se divisent, forment des agrégats (« *clusters* ») et présentent une activité synthétique accrue. Ils synthétisent abondamment les composants extracellulaires spécifiques du cartilage, comme l'agrécan ou le collagène de type II<sup>186</sup>, mais aussi des

quantités importantes de fibronectine ainsi que des molécules normalement absentes du cartilage comme le collagène de type X<sup>186, 187</sup>.

Cette phase dite aussi hypertrophique s'accompagne d'un épaissement du cartilage. Elle est considérée comme une véritable tentative du cartilage de réparer la lésion. Cependant, cette phase est transitoire et est suivie d'une accélération du turnover des constituants matriciels et d'une ossification endochondrale<sup>188</sup>. Les processus de chondrorésorption prennent progressivement le pas sur les processus de chondroformation et les chondrocytes meurent par apoptose ou par nécrose (figure 12).



**Figure 12 :** Représentation schématique de la phase réactionnelle. Comportement du chondrocyte dans les modèles animaux d'arthrose induite par rupture du ligament croisé ou ménisectomie (Selon Henrotin et al<sup>189</sup>).

### × **La chondrolyse péricellulaire**

Le chondrocyte arthrosique sécrète dans son environnement immédiat des quantités accrues de protéases (MMP, agrécanases, cathepsines, ...) et de formes activées de l'oxygène ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , ...). Celles-ci sont responsables de la chondrolyse péricellulaire et par conséquent de la libération, dans le fluide synovial, des peptides issus de la protéolyse des protéines matricielles (figure 13).

Ce phénomène de chondrolyse est stimulé essentiellement par l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$ . Pour rappel, ces facteurs augmentent la synthèse par le chondrocyte de métalloprotéinases et de formes activées de l'oxygène et inhibent la synthèse de protéines matricielles. De plus, la quantité de récepteurs pour l'IL-1 $\beta$  est plus élevée à la surface des chondrocytes arthrosiques qu'à celle des chondrocytes normaux<sup>108</sup>. A l'inverse, les chondrocytes arthrosiques expriment moins de récepteurs pour les TGF- $\beta$ <sup>190</sup>. Il en résulte une augmentation de sensibilité des chondrocytes aux cytokines cataboliques et une diminution de la sensibilité pour les facteurs anaboliques.

La synthèse des MMP est également stimulée par des peptides issus de la dégradation du collagène de type II et la fibronectine<sup>191-195</sup>. Ces peptides se fixent sur des glycoprotéines membranaires (l'annexine V et des intégrines) ou sur le récepteur CD<sub>44</sub><sup>195, 196</sup>. L'expression de ces molécules membranaires augmente chez les chondrocytes arthrosiques, ce qui les rend également plus sensibles à ces peptides<sup>194</sup>  
197.

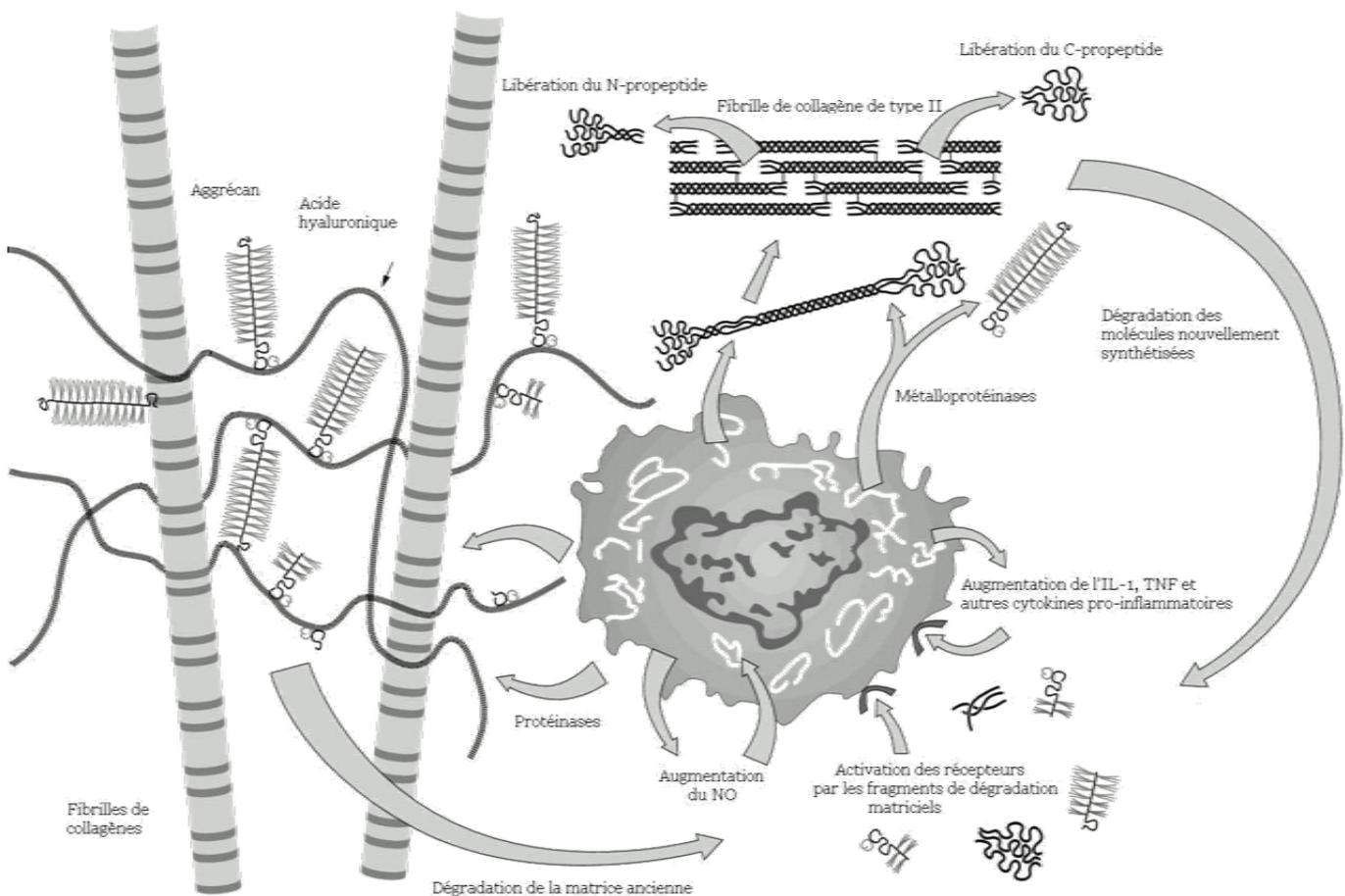


Figure 13 : La boucle cartilagineuse, d'après Poole<sup>191-193</sup>

### × **L'ossification endochondrale**

Dans les formes sévères d'arthrose, une minéralisation de la matrice extracellulaire du cartilage peut être observée.

L'ossification endochondrale se caractérise par une succession de plusieurs processus semblables à ceux observés durant l'ostéogenèse. Les chondrocytes des couches superficielle et intermédiaire prolifèrent et forment des *clusters*<sup>198</sup>. Ces cellules deviennent successivement pré-hypertrophiques puis hypertrophiques et minéralisent la matrice extracellulaire<sup>199</sup>. Ensuite, elles meurent par apoptose<sup>200</sup>. Une réactivation de l'ossification endochondrale est également observée à la jonction entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral. Il s'ensuit un épaissement de la couche calcifiée du cartilage et l'apparition d'une deuxième voire une troisième *tidemark*<sup>201, 202</sup>.

Dans le cartilage arthrosique, tous les marqueurs caractéristiques de l'ossification endochondrale (PTHrP, OC, ...) sont exprimés par les chondrocytes, et sont corrélés avec la sévérité de la pathologie<sup>188, 199, 203, 204</sup>. *In vitro*, l'expression de ces gènes peut être induite par l'IL-8, la BMP-2 ou -4 ou l'acide rétinoïque<sup>205, 206</sup>. Durant cette phase, les chondrocytes impliqués augmentent fortement de volume. Du glycogène et des lipides s'accumulent dans leur cytoplasme. Ils synthétisent également des quantités importantes de MMP-2, et -13, nécessaires au remodelage de la matrice extracellulaire<sup>207</sup>. L'expression de PAL, ank, TG2 et des NTPPPH mais aussi de protéines membranaires impliquées dans la minéralisation, est aussi augmentée<sup>31, 208</sup>. Enfin, des cristaux de pyrophosphate de calcium dihydrate ou d'hydroxyapatite se forment au sein de la matrice extracellulaire du cartilage<sup>209</sup>.

#### 5.2.2. La boucle synovio-cartilagineuse

Sur le plan histologique, l'arthrose s'accompagne toujours d'une inflammation de la membrane synoviale qui se limite à une congestion vasculaire accompagnée, dans les formes les plus sévères, d'une infiltration cellulaire (essentiellement des macrophages et des lymphocytes B et T)<sup>210</sup>. Cette réaction inflammatoire est secondaire à la libération dans le fluide synovial de débris ostéo-cartilagineux et/ou à la présence de microcristaux (pyrophosphate ou hydroxyapatite)<sup>211</sup>. Les chondrocytes jouent également un rôle déterminant dans l'initiation et la chronicité de la réaction inflammatoire. Les chondrocytes arthrosiques produisent des quantités anormalement

élevées de cytokines, de prostanoides et de formes activées de l'oxygène. Ces médiateurs de l'inflammation libérés par les chondrocytes régulent à leur tour l'activité synthétique des cellules de la membrane synoviale (synoviocytes et cellules de la réaction inflammatoire). En réponse à ces stimuli, les cellules de la membrane synoviale sécrètent des enzymes et des formes activées de l'oxygène qui s'attaquent à la couche superficielle du cartilage. De plus, elles libèrent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,...) qui stimulent les chondrocytes à produire davantage de facteurs cataboliques. Ainsi s'installe un cercle vicieux entre le cartilage et la membrane synoviale, responsable de la progression des lésions structurelles du cartilage arthrosique<sup>212</sup>.

### 5.2.3. La boucle ostéo-cartilagineuse

Une caractéristique anatomopathologique de l'arthrose est la sclérose de l'os sous-chondral<sup>213</sup>.

La sclérose sous-chondrale est l'épaississement de l'os cortical sous-chondral (figure 14). Elle apparaît suite à un important remodelage osseux.

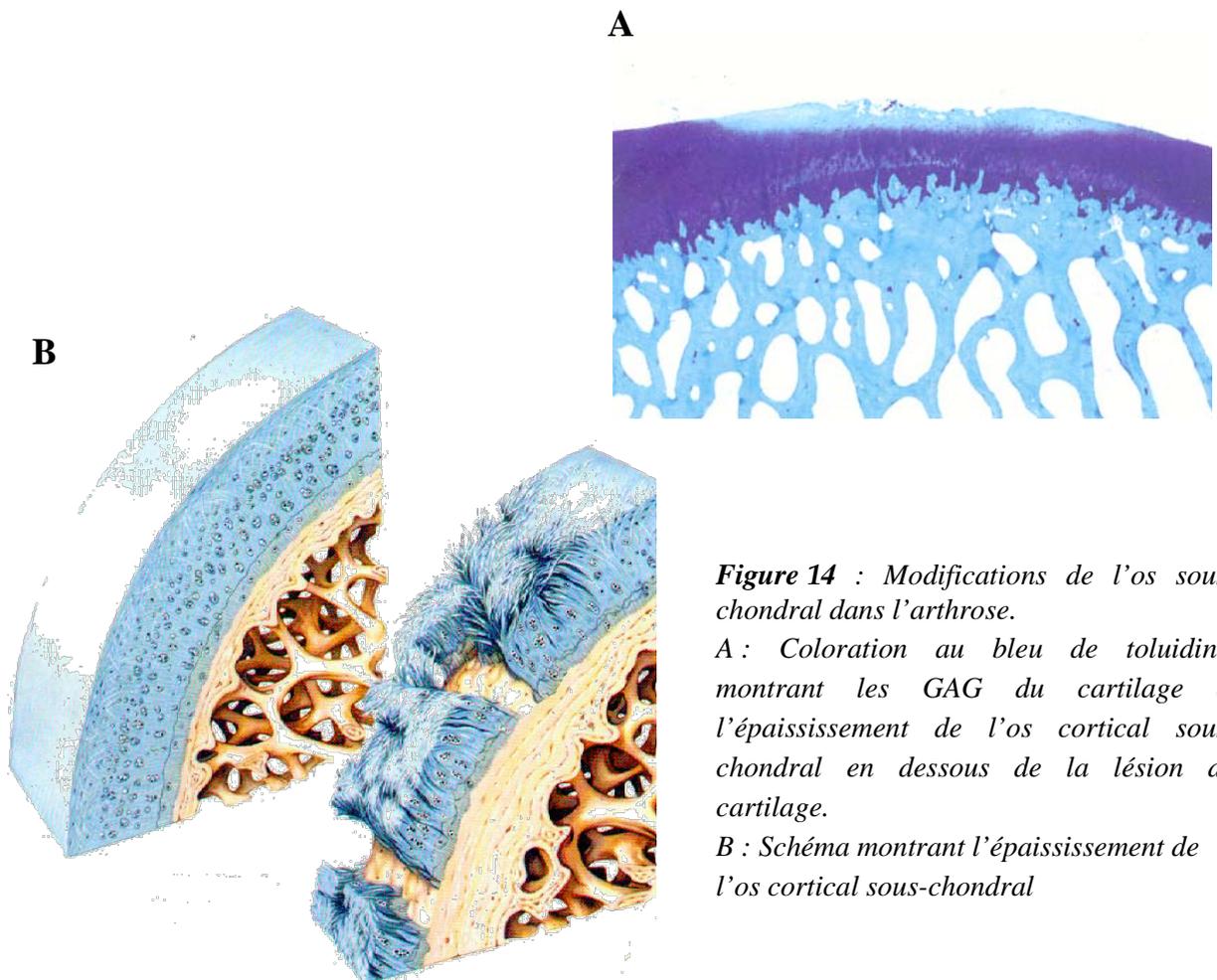
La sclérose de l'os sous-chondral se caractérise par une synthèse accrue de substance ostéoïde et un taux de minéralisation par mole de collagène diminué de 25 %<sup>214, 215</sup>. Ces modifications de la matrice sont la traduction d'une altération du phénotype des ostéoblastes dans l'arthrose<sup>216</sup>.

Les modifications phénotypiques des ostéoblastes arthrosiques sont :

- Une production accrue d'OC, de PAL, d'IGF-1, de TGF- $\beta$ 1, d'HGF, d'uPA, de MMP-2 et -9 ainsi que des cathepsines L, K et B<sup>217, 218</sup>.
- Une augmentation de la synthèse d'homotrimères de collagène [ $\alpha$ 1(I)]<sub>3</sub>. Cette fibre a une capacité de minéralisation plus faible que la forme hétérotrimérique [ $\alpha$ 1(I)]<sub>2</sub>  $\alpha$ 2(I) et donc une résistance moindre<sup>219</sup>.
- Une diminution de 50 % du nombre de récepteurs membranaires pour la PTH<sup>11, 13</sup>. Il en résulte une hyposensibilité des ostéoblastes à la PTH, et par conséquent une réduction de la résorption osseuse par les ostéoclastes.

- Enfin, Lajeunesse et ses collaborateurs distinguent deux populations d'ostéoblastes en fonction de leur synthèse en IL-6, PGE<sub>2</sub> et leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)<sup>10</sup> :
  - × Le premier groupe est caractérisé par une production élevée de PGE<sub>2</sub> et d'IL-6 ;
  - × Dans le second groupe, au contraire, ces productions sont inchangées mais les ostéoblastes synthétisent davantage de LTB<sub>4</sub>.

L'équipe du Professeur Pelletier suggère que la sclérose de l'os sous-chondral serait stimulée par l'accumulation locale d'IGF-1 libre<sup>12, 13</sup>. Celui-ci serait libéré du complexe IGF/IGFBP par l'uPA. Parallèlement, l'insensibilité relative des ostéoblastes à la PTH provoquerait une diminution de la résorption osseuse. La conjonction de ces deux phénomènes serait responsable de l'accumulation de substance ostéoïde, et donc de la sclérose de l'os sous-chondral.



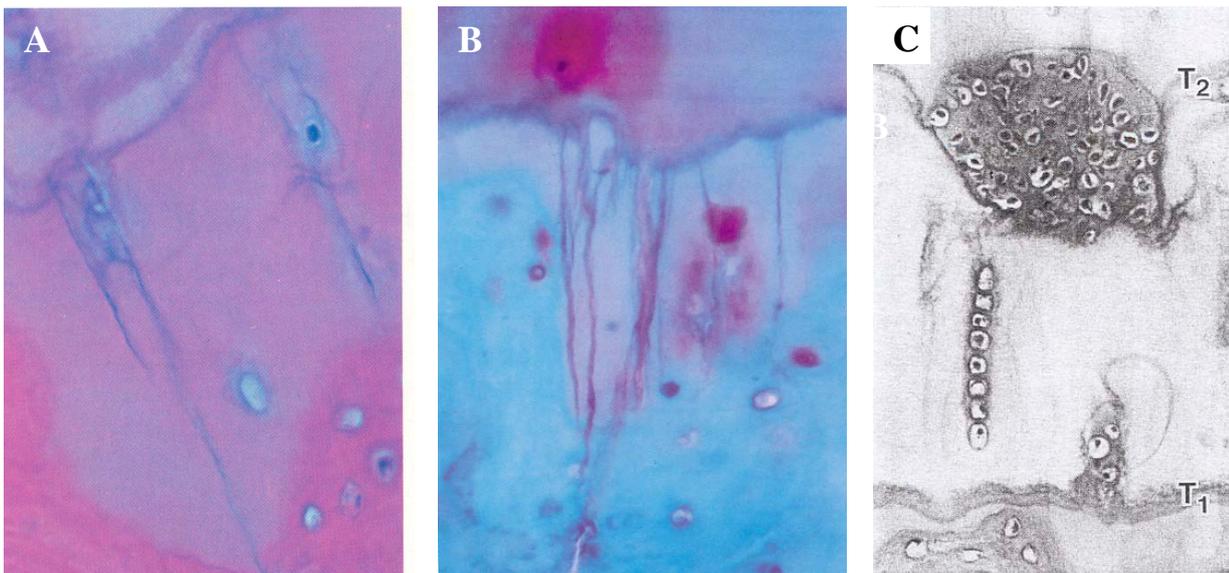
**Figure 14** : Modifications de l'os sous-chondral dans l'arthrose.

A : Coloration au bleu de toluidine, montrant les GAG du cartilage et l'épaississement de l'os cortical sous-chondral en dessous de la lésion du cartilage.

B : Schéma montrant l'épaississement de l'os cortical sous-chondral

Selon Radin et ses collaborateurs, des microfractures ostéochondrales seraient le point de départ de la sclérose sous-chondrale et de la minéralisation du cartilage<sup>2</sup>. Le nombre de ces microfractures, quasi inexistantes chez les patients jeunes et sains, augmente avec l'âge et la sévérité de l'arthrose<sup>14</sup>. On distingue deux types de microfractures. Les plus fréquentes sont les microfractures de type A (figure 15). Elles sont très fines et fixent avec grande affinité la safranine O (figure 15B). Les microfractures de type A ont approximativement 2 µm de large et 25 à 180 µm de long et situées entre la *tidemark* et la jonction ostéochondrale<sup>14</sup>. Elles sont souvent isolées mais apparaissent parfois en groupe de deux ou plus. Un faible pourcentage des microfractures de type A se prolonge dans l'os sous-chondral. Elles ne sont jamais visibles dans le cartilage non calcifié<sup>14</sup>.

Les microfractures de type B sont moins fréquentes et structurellement différentes : elles sont plus larges (3 à 7 µm), et remplies de cordons chondrogéniques avançant de la *tidemark* vers la jonction ostéochondrale (figure 15C)<sup>14</sup>.



**Figure 15** : Les types de microfractures ostéochondrales<sup>14</sup>.

A : Microfractures de type A, coloration hématoxyline-éosine, grossissement 400 x.

B : Microfractures de type A, coloration safranine O-fast green, grossissement 200 x.

C : Microfractures de type B, coloration hématoxyline-éosine, grossissement 285 x, T= tidemark.

De nombreuses études ont démontré l'importance des changements osseux dans la progression de l'arthrose. L'augmentation du remodelage osseux au niveau du genou arthrosique, mise en évidence par un examen scintigraphique, est prédictive de la

progression du pincement de l'interligne articulaire durant les 5 années suivantes<sup>220</sup>. De même, l'augmentation sur 1 an du taux sérique d'OC est corrélé avec la progression du pincement de l'interligne articulaire durant les 3 années suivantes<sup>221</sup>. Le volume osseux et l'épaisseur des travées osseuses sont positivement corrélés avec la gravité des lésions du cartilage<sup>4</sup>. Enfin, une densité minérale osseuse élevée du plateau tibial est prédictive de l'augmentation du pincement de l'interligne articulaire<sup>222</sup>.

Des études réalisées sur le primate (macaque fascicularis)<sup>7, 223</sup>, mais également sur l'homme<sup>2</sup>, indiquent que les modifications de l'os sous-chondral précèdent celles du cartilage, et que le durcissement progressif du socle osseux sous-chondral est un facteur déclenchant la dégradation du cartilage. Cependant, cette hypothèse reste controversée. En effet, d'autres études réalisées sur le chien, le lapin et l'homme suggèrent que la sclérose de l'os sous-chondral est la conséquence de l'altération des propriétés mécaniques du cartilage, et donc qu'elle apparaît après la dégradation du cartilage<sup>3, 6, 224</sup>.

Deux théories tentent d'expliquer le rôle joué par l'os sous-chondral dans la dégradation du cartilage. Il s'agit de la théorie mécanique et de la théorie biochimique.

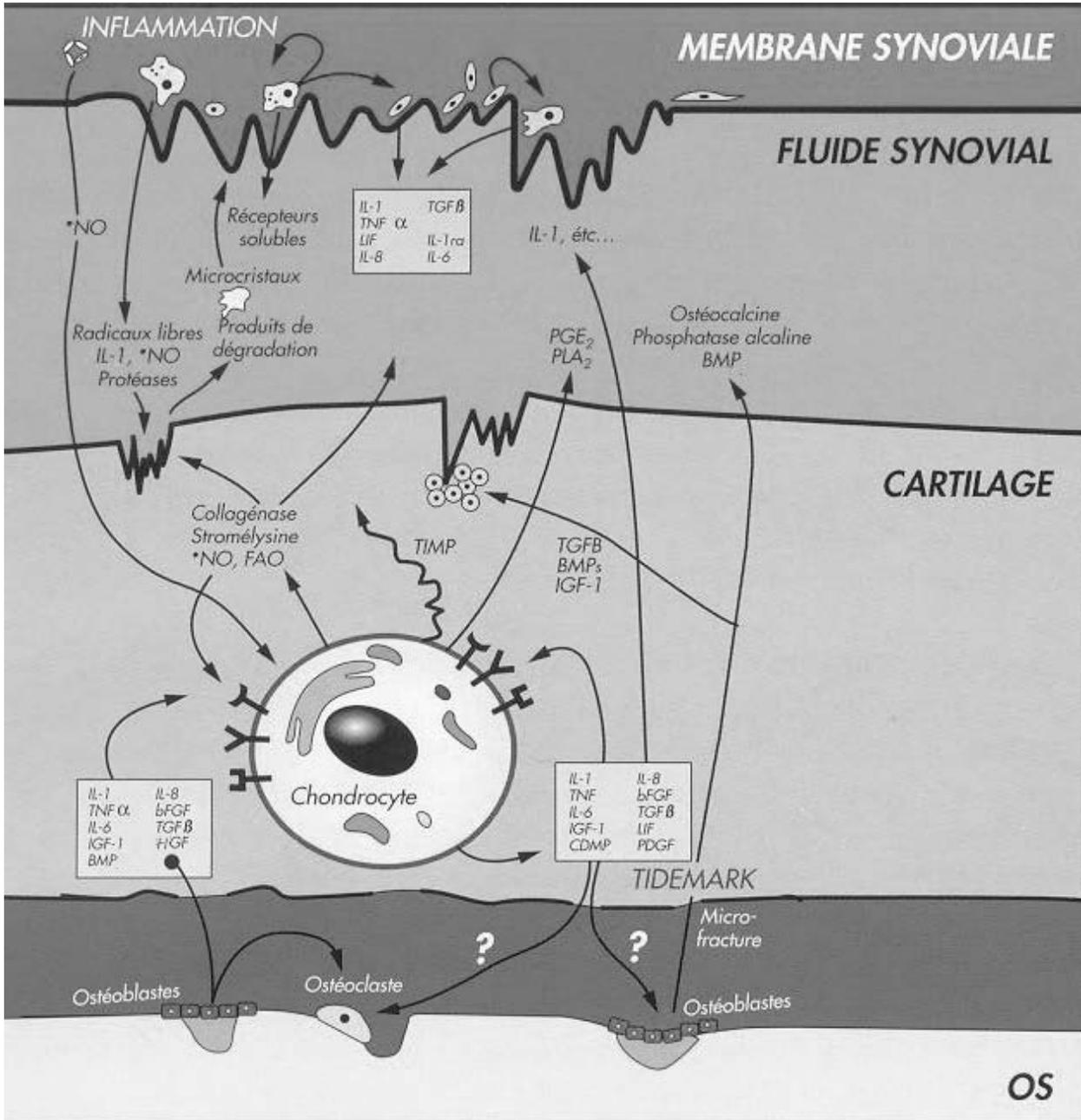
× Théorie mécanique

Dans des conditions normales, le cartilage articulaire et l'os sous-chondral forment une unité biomécanique responsable de l'amortissement de 35 % des contraintes mécaniques exercées sur l'articulation<sup>65</sup>. Il en découle que toute modification des propriétés mécaniques de l'os sous-chondral se répercute sur les capacités d'amortissement de l'articulation. L'épaississement de l'os sous-chondral cortical entraîne une rigidité qui provoque une augmentation des contraintes mécaniques exercées sur le cartilage. La couche cartilagineuse s'amincit progressivement et la sclérose de l'os sous-chondral progresse, ce qui diminue encore le pouvoir amortisseur de l'articulation<sup>5</sup>.

× Théorie biochimique

En 1997, Westacott et ses collaborateurs ont montré que des ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques co-cultivés avec des explants de cartilage étaient capables d'induire la dégradation des protéoglycanes du cartilage dans 50 % des cas, tandis que les ostéoblastes non arthrosiques n'avaient pas d'effet<sup>17</sup>. Ceci suggère qu'au niveau des articulations arthrosiques, les ostéoblastes sous-chondraux pourraient être impliqués

dans le remodelage du cartilage sus-jacent. Il est suggéré que des facteurs libérés par les ostéoblastes puissent, par les microfractures, atteindre les chondrocytes de la couche profonde du cartilage sus-jacent, et influencer leur activité synthétique<sup>14</sup>.



**Figure 16 :** Représentation schématique des trois boucles physiopathologiques de l'arthrose. BMP : bone morphongenetic protein, bFGF : basic fibroblast growth factor, CDMP : cartilage derived morphogenetic protein, FAO : formes activées de l'oxygène, HGF : hepatocyte growth factor, IGF : insulin-like growth factor, IL : interleukine, LIF : leukemia inhibitory factor, NO : oxide nitrique, PDGF : platelet derived growth factor, PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>, TGF : transforming growth factor, TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase, TNF : tumor necrosis factor. Modifié de Henrotin<sup>184</sup>.

## 6. Approches thérapeutiques de l'arthrose

**L**es objectifs principaux de la prise en charge thérapeutique de l'arthrose sont la diminution de la douleur, la restauration de la fonction articulaire et le retardement de la progression structurelle de la maladie<sup>225</sup>. Les traitements de première ligne sont principalement orientés vers la résolution des symptômes.

Les analgésiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement utilisés dans ce but<sup>226</sup>. Il existe par ailleurs des médicaments à action symptomatique lente, comme le sulfate de glucosamine, le sulfate de chondroïtine, les insaponifiables d'avocat et de soja (IAS) et la diacérhéine.

Pour ce dernier groupe, les effets symptomatiques apparaissent progressivement et s'installent pendant les 6 à 8 premières semaines de traitement. Le sulfate de glucosamine a également une action structurelle, c'est-à-dire qu'il interfère avec les changements structuraux du cartilage arthrosique. Ainsi, l'étude menée pendant 3 ans par Reginster et collaborateurs a révélé que le sulfate de glucosamine ralentissait la progression radiologique de l'arthrose<sup>227</sup>. Récemment, ces effets ont été confirmés par une autre équipe<sup>228</sup>.

Dans ce travail, nous avons étudié les effets des IAS sur nos différents modèles expérimentaux. Nous avons donc choisi dans ce chapitre de ne détailler que les effets de ce médicament.

Les IAS sont commercialisés sous le nom de Piasclédine 300<sup>®</sup> par les laboratoires Expanscience (Courbevoie, France). La Piasclédine 300<sup>®</sup> contient 1/3 d'insaponifiable d'avocat et 2/3 d'insaponifiable de soja. La composition exacte de ces résidus n'est pas connue. Cependant, un certain nombre des composés du mélange ont été dosés par les laboratoires Expanscience. Les résultats de ces analyses sont répertoriés dans le tableau 4. Les IAS ont été étudiés dans le traitement de diverses pathologies du tissu conjonctif depuis de nombreuses années.

### o *Etudes in vitro*

De nombreux effets *in vitro* des IAS ont été démontrés sur un modèle de chondrocytes de lapin cultivés en monocouche. Au terme de 7 jours de traitement, les IAS (10 µg/ml) augmentent significativement la synthèse des collagènes (déterminée par l'incorporation de <sup>3</sup>H-proline) par les chondrocytes<sup>229</sup>. De plus, au terme de 5 jours

d'incubation, les IAS (10 µg/ml) préviennent l'augmentation de l'activité collagénolytique induite par l'IL-1 $\beta$ <sup>230</sup>. Les IAS réduisent la synthèse de MMP-3, d'IL-6, d'IL-8 et de PGE<sub>2</sub> par les chondrocytes humains<sup>231</sup>. Ils stimulent l'expression des TGF $\beta$ -1 et -2 dans les chondrocytes bovins cultivés en monocouche<sup>232</sup>. Par contre, ils n'exercent aucun effet sur l'expression des récepteurs pour les TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ RI et TGF- $\beta$ RII). Ces éléments suggèrent que les IAS ont un effet bénéfique sur la matrice cartilagineuse, d'une part en réduisant la synthèse des métalloprotéinases et des cytokines cataboliques, mais également en stimulant la synthèse de la matrice extracellulaire.

○ *Etudes chez l'animal*

Sur un modèle d'arthrose induite chez le mouton par ménisectomie bilatérale, l'administration orale d'IAS prévient la perte d'agrécan et augmente l'épaisseur du cartilage dans les zones voisines de la lésion chondrale. De plus, les IAS réduisent significativement la sclérose de l'os sous-chondral. Par contre, ils ne préviennent pas l'apparition des lésions chondrales<sup>233</sup>.

○ *Etudes cliniques*

L'efficacité des IAS sur la symptomatologie de la gonarthrose a été rapportée par plusieurs auteurs<sup>234-236</sup>. Une étude prospective multicentrique, randomisée, contrôlée contre placebo et conduite en double aveugle, a étudié les effets des IAS (300 mg/jour en prise unique) sur la douleur et le handicap des patients coxarthrosiques et gonarthrosiques. La période d'administration du médicament ou du placebo était de 6 mois, et la durée du suivi clinique des patients de 8 mois. Cette étude a démontré que :

- les IAS améliorent, dès le deuxième mois de traitement, le statut algofonctionnel (indice de Lequesne) et la douleur spontanée (mesurée à l'aide d'une échelle visuelle analogique) du patient arthrosique ;
- l'effet des IAS sur la symptomatologie persiste 2 mois après l'interruption du traitement ;
- le nombre de patients ayant recours à un AINS durant la période de traitement est plus faible dans le groupe IAS que dans le groupe placebo (43 % vs 62 %). Cependant, la différence entre les deux groupes n'est pas significative ;

- la prise d'IAS ne s'accompagne pas d'effets secondaires indésirables importants.

Une autre étude prospective multicentrique randomisée, réalisée avec le concours de notre unité, incluant 260 patients souffrant de gonarthrose, a comparé les effets des IAS administrés aux doses journalières de 300 ou 600 mg à ceux d'un placebo, sur l'indice algo-fonctionnel de Lequesne, l'échelle visuelle analogique et la consommation d'AINS ou d'analgésiques<sup>236</sup>. Aux doses testées, les IAS diminuent significativement la prise d'AINS/analgésiques durant les 3 mois de traitement par rapport au groupe placebo. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre la dose de 300 mg et 600 mg d'IAS. Cette étude confirme également le statut de médicament à action lente sur la symptomatologie de l'arthrose des IAS. Elle montre également qu'une dose quotidienne de 600 mg n'a pas un effet supérieur à celui d'une dose de 300 mg.

Récemment, l'effet structurel des IAS au terme de 2 ans de traitement a été étudié sur une cohorte de 163 patients souffrant d'arthrose de la hanche. Les IAS retardent la progression du pincement de l'interligne articulaire, mesurée sur radiographie standard, uniquement chez les patients souffrant de coxarthrose sévère (interligne inférieur à 2,45 mm à l'inclusion)<sup>237</sup>. Par contre, aucune différence significative entre les groupes expérimentaux n'était observée lorsque l'analyse incluait l'ensemble des patients coxarthrosiques.

# 1. Introduction

**D**urant la dernière décennie, de nombreux modèles de cultures de chondrocytes ont été proposés<sup>238</sup>. La problématique de la culture des chondrocytes est double : d'une part recréer *in vitro* l'environnement naturel de la cellule (pO<sub>2</sub>, pH du milieu, contraintes mécaniques, etc.) et d'autre part maintenir son phénotype stable. Le phénotype du chondrocyte se caractérise par la synthèse de molécules spécifiques (essentiellement le collagène de type II et l'agrécane), une forme arrondie et une activité mitotique extrêmement faible. Lorsqu'il est cultivé en monocouche, le chondrocyte se différencie<sup>239</sup>. Il adopte une forme allongée, se divise et modifie quantitativement et qualitativement son activité synthétique. Les synthèses des collagènes de type II, IX et XI et d'agrécane diminuent alors que celles de versican et des collagènes de type I et III augmentent progressivement avec le processus de différenciation<sup>240-242</sup>. Pour empêcher la différenciation des chondrocytes en culture, il est indispensable de les placer soit en suspension en phase liquide, soit dans une matrice naturelle ou synthétique de substitution<sup>243-249</sup>.

Dans ce travail, nous avons choisi de cultiver des chondrocytes articulaires humains en billes d'alginate. L'alginate est un polysaccharide linéaire isolé de l'algue brune. En présence de cations divalents comme le calcium, ce polymère se gélifie instantanément et forme une matrice poreuse autour des chondrocytes<sup>250, 251</sup>. Au sein des billes d'alginate, chaque chondrocyte est entouré d'une matrice polysaccharidique chargée négativement dont la porosité est comparable à celle du cartilage hyalin<sup>251</sup>. Dans ces conditions, les chondrocytes conservent leur phénotype au moins 5 semaines<sup>252-256</sup>. En billes d'alginate, les chondrocytes prolifèrent essentiellement durant les 3 premiers jours de culture. Ensuite, le nombre de chondrocytes présent dans la bille reste stable<sup>257</sup>. Ils ont une forme sphérique et produisent des agrécanes et des collagènes spécifiques (de type II, IX et XI) du cartilage articulaire<sup>258</sup>.

Ce mode de culture offre de nombreux avantages :

- Dans la bille d'alginate, la matrice extracellulaire néosynthétisée s'organise de façon similaire à la matrice du cartilage. En microscopie électronique, il est possible de distinguer autour du chondrocyte une matrice péricellulaire, une matrice territoriale et une matrice interterritoriale (figure 17)<sup>259</sup>.

- Une récupération aisée des cellules et de la matrice extracellulaire au terme de la période de culture. En effet, en présence d'un agent chélateur du calcium (par exemple le citrate), la matrice d'alginate se dépolymérise. Par centrifugation, il est ensuite possible de séparer les chondrons (cellules + matrice péricellulaire + matrice territoriale) et la matrice interterritoriale. Les fractions sont collectées et analysées séparément<sup>252, 258</sup>. La production d'une molécule par les chondrocytes cultivés en billes d'alginate peut donc être quantifiée dans 3 compartiments : le milieu de culture, la matrice interterritoriale et les cellules entourées des matrices péricellulaire et territoriale. Ce modèle permet ainsi également d'étudier la distribution des molécules néosynthétisées dans les différents compartiments de la matrice.

- Les volumes occupés par les différents compartiments de la bille d'alginate sont similaires à ceux observés dans le cartilage normal. Au terme de 13 jours de culture, les cellules, la matrice associée aux cellules (équivalent des matrices péricellulaire et territoriale) et la matrice interterritoriale représentent respectivement 3,5 , 5,2 et 91,3 % du volume de la bille d'alginate<sup>259</sup>.

- La demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de l'agrécan est plus longue que celle enregistrée dans d'autres modèles de culture, et se rapproche de la valeur observée *in vivo*. Dans la matrice interterritoriale, la  $t_{1/2}$  de l'agrécan est de 95 jours<sup>260</sup> alors qu'elle est de 40 jours dans les cultures d'explants<sup>261</sup> et de 14 jours dans l'agarose<sup>262, 263</sup> ;

- Il n'est pas nécessaire de procéder à l'extraction des molécules matricielles par un solvant, comme c'est le cas dans le modèle de culture en agarose. L'intégrité des molécules matricielles est donc conservée<sup>252, 259</sup>.

Dans cette partie de notre travail, nous avons utilisé le modèle de culture en billes d'alginate pour :

- étudier l'influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des chondrocytes ;
- déterminer les effets pharmacologiques d'un mélange d'IAS. Ce mélange est utilisé comme médicament pour le traitement de l'arthrose.

**Figure 17 :** Micrographie électronique d'un chondrocyte cultivé en billes d'alginate durant 13 jours (Van OSCH et al, 1998<sup>259</sup>). FRM = « further removed matrix », équivalent in vivo de la matrice interterritoriale ; T = matrice territoriale et ➤ = matrice péricellulaire. En pointillé, le chondrocyte entouré de sa matrice territoriale et péricellulaire forme le compartiment CM (Cell-associated Matrix).

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1. DESCRIPTION DES CULTURES DE CHONDROCYTES ARTICULAIRES HUMAINS EN BILLES D'ALGINATE

#### 2.1.1. Prélèvement des échantillons de cartilage

Les cultures ont été réalisées à partir de cartilage articulaire humain prélevé sur des cadavres endéans les 12 heures qui suivent le décès. Les prélèvements étaient effectués au niveau de l'articulation fémoro-tibiale et fémoro-patellaire.

Dans cette étude, nous avons utilisé des prélèvements de cartilage provenant de 15 adultes, 8 hommes et 7 femmes, dont l'âge était compris entre 24 et 69 ans (moyenne de 46 ans). A l'examen macroscopique, tous les prélèvements de cartilage présentaient des lésions dont la sévérité a été évaluée sur une échelle de 0 à III<sup>264</sup> :

- Stade 0 : Cartilage normal avec une bonne élasticité et de couleur blanche.
- Stade I : Le cartilage est oedématié, anormalement mou au palper. La surface reste régulière. La zone de ramollissement est parfois très limitée, visible sous l'aspect d'une tache jaune-gris. L'oedème est présent sur une ou plusieurs surface(s) articulaire(s).
- Stade II : Le cartilage présente, sur au moins une surface articulaire, une ou plusieurs fissures profondes 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.
- Stade III : 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).

Parmi les échantillons étudiés, 6 présentaient des lésions de stade I, 4 de stade II et 5 de stade III.

#### 2.1.2. Isolement des chondrocytes

De fines lamelles de cartilage étaient excisées en évitant la couche calcifiée. Elles étaient lavées plusieurs fois dans du DMEM [*Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Cambrex, Verviers, Belgique)*] contenant 10 mM d'HEPES [*N-(2-hydroxyethyl)piperazin'-(2-ethanesulfonic acid), Cambrex, Verviers, Belgique*], 100

U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (*Cambrex, Verviers, Belgique*). Ce milieu sera nommé dans la suite du texte « milieu de base ». Les lamelles de cartilage étaient alors ensuite découpées en petits fragments de quelques mm<sup>3</sup>.

Les chondrocytes étaient alors libérés du cartilage par une succession de digestions enzymatiques. Les fragments de cartilage étaient incubés à 37°C et sous agitation constante dans le milieu de base, avec successivement de l'hyaluronidase (0,5 mg/ml, 30 minutes, type IV-S, *Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), de la pronase E (1 mg/ml, 60 minutes de milieu de base enrichi par 5 µg/ml de polymyxine, 10 µg/ml de gentamycine, et 10 µg/ml de vancomycine, *VWR, Louvain, Belgique*), et enfin, de la collagénase clostridiale (0,6 mg/ml, 16 heures, type IA, *Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*). Lors de cette dernière étape, le milieu de base était enrichi avec 1 % (v/v) d'Ultrosor G (*UG, Invitrogen, Merelbeke, Belgique*)<sup>264</sup>. L'UG est un substitut de sérum contenant une concentration constante en facteurs de croissance, hormones, minéraux, vitamines et protéines.

Les cellules étaient ensuite filtrées à travers une membrane de nylon dont la porosité était de 70 µm, lavées 3 fois dans une solution NaCl 9 g/L (*Baxter, Lessines, Belgique*) et comptées à l'aide d'une plaque de Neubauer. A ce moment, la viabilité cellulaire, estimée par le test d'exclusion du bleu trypan, était supérieure à 95 %. Cette méthode d'isolement permet de récolter environ  $4,3 \times 10^6$  de chondrocytes par gramme de cartilage<sup>264</sup>.

### 2.1.3. Mise en culture

Les cellules étaient mises en suspension dans une solution NaCl 9 g/L contenant 1,2 % d'alginate (*Macrocystis pyrifera, Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), à la densité de  $4 \times 10^6$  cellules par ml. Ce mélange était placé dans une seringue de 25 gauges et ensuite élué goutte à goutte dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 102 mM (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*). Au contact de cette solution, l'alginate se polymérise et forme des billes d'environ 2 mm de diamètre (figure 18). Après 10 min d'incubation dans la solution de calcium, les billes d'alginate étaient rincées 3 fois avec une solution NaCl 9 g/L. Ensuite, 9 billes étaient placées délicatement dans les puits d'une plaque de culture 24 puits contenant chacun 1 ml de milieu de base enrichi par 2 % (v/v) d'UG. Après 48 heures, ce milieu nutritif était remplacé par un milieu de culture composé du milieu de base contenant 50 µg/ml d'acide ascorbique (*Sigma Aldrich,*

Bornem, Belgique), 20 µg/ml de proline (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), 2 mM de glutamine (*Cambrex, Verviers, Belgique*) et 1 % (v/v) d'ITS+ (*ICN Biomedicals, Asse-Relegem, Belgique*). L'ITS+ est un substitut de sérum contenant 0,625 mg/ml d'insuline, 0,625 mg/ml de transferrine, 0,625 µg/ml de sélénium, 125 mg/ml d'albumine sérique de bœuf et 0,535 mg/ml d'acide linoléique. Les chondrocytes étaient cultivés pendant 12 jours dans ce milieu en l'absence ou en présence d'IL-1β, d'IL-6, d'OSM et/ou d'un mélange d'IAS. Le milieu de culture était remplacé tous les 3 jours et les billes d'alginate maintenues à 37°C dans une atmosphère formée de 95 % d'air et de 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 2.1.4. Traitements des cellules

L'IL-1β humaine recombinante produite par *E. coli* (*Roche Pharmaceuticals, Bruxelles, Belgique*) était ajoutée au milieu de culture aux concentrations finales comprises entre 1,7 pg à 17 ng/ml (soit respectivement de 0,085 à 850 U/ml ou 10<sup>-13</sup> à 10<sup>-9</sup> M).

L'IL-6 recombinante humaine (*Biosource Europe, Fleurus, Belgique*) était testée aux concentrations de 20, 100 et 500 ng/ml, en présence de son récepteur soluble IL-6sR (50 ng/ml, *R&D systems, Abingdon, Angleterre*). L'OSM (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*) était ajoutée au milieu de culture aux concentrations de 0,1, 1 et 10 ng/ml. Ces deux cytokines étaient testées en présence ou non d'IL-1β 10<sup>-10</sup> M.

Les IAS étaient administrés sous la forme d'un mélange composé de 1/3 d'insaponifiable d'avocat et de 2/3 d'insaponifiable de soja aux concentrations de 0,625, 2,5, 10 et 40 µg/ml. Les IAS étaient solubilisés dans du THF (tétrahydrofurane, *Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*). Une quantité équivalente de THF (concentration finale de 0,1 %) était ajoutée au milieu de culture des contrôles.

Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple. Les milieux de culture et les molécules testées étaient renouvelés tous les 3 jours.

#### 2.1.5. Arrêt de la culture

Au terme de la culture, les milieux de culture étaient prélevés et conservés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Les billes étaient rincées avec une solution NaCl 9 g/L et placées dans des tubes Falcon de 15 ml contenant 1 ml d'une solution 100 mM de citrate de sodium. Après 15

min, une dépolymérisation complète des billes d'alginate était obtenue et les tubes étaient centrifugés pendant 10 min à 150 g. Les phases liquides, dénommées FRM (*Further Removed Matrix*), étaient prélevées et conservées à -20°C. Les culots étaient lavés 3 fois dans du tampon phosphate 6,7 mM à pH 7,4 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  144 mg/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  795 mg/L et NaCl 9 g/L, PBS, Cambrex, Verviers, Belgique), puis dissociés par ultrasons à 4°C dans 1 ml de PBS (30 secondes à 50 watt/cm<sup>2</sup>). Les extraits cellulaires ainsi obtenus ont été dénommés CM pour *Cell-associated Matrix* et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

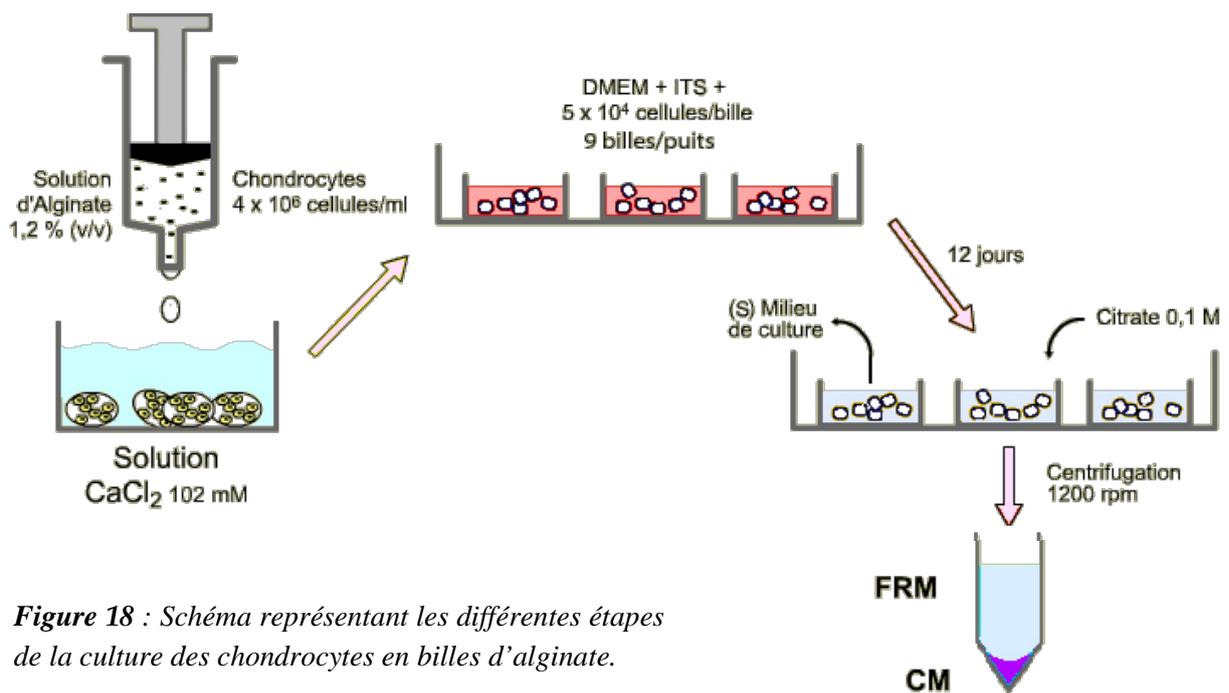


Figure 18 : Schéma représentant les différentes étapes de la culture des chondrocytes en billes d'alginate.

## 2.2. DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'ANALYSE HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES

### 2.2.1. Fixation des billes d'alginate et inclusion en paraffine

Pour la fixation, les billes étaient placées à 4°C dans une solution contenant 40 g/L de paraformaldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  20 mM à pH 7,4. Après 4h d'incubation, les billes étaient lavées 3 fois dans un tampon cacodylate de sodium 100 mM,  $\text{BaCl}_2$  50 mM à pH 7,4 afin de prévenir la désintégration des billes d'alginate. Elles étaient ensuite déshydratées par passages successifs dans des bains de concentrations croissantes en méthanol, incubées dans des bains d'isopropanol puis de xylène et enfin incluses dans la paraffine. Les blocs de

paraffine étaient découpés en lamelles de 5 µm d'épaisseur (coupes) à l'aide d'un microtome, et déposées sur des lames de verre.

### **2.2.2. Coloration au bleu / jaune alcian**

Afin de mettre en évidence les GAG hautement sulfatés et les différencier des polysaccharides de l'alginate, nous avons coloré des coupes au bleu et au jaune alcian. Les coupes étaient déparaffinées et réhydratées par passages successifs dans des bains de xylène, puis de méthanol en concentrations décroissantes, et enfin d'eau déminéralisée. Elles étaient alors incubées 2 x 5 min dans une solution d'HCl 200 mM, pH 1, puis 1h dans une solution de bleu alcian 5 g/L (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), HCl 200 mM, pH 1. Elles étaient ensuite rincées à 2 reprises avec une solution HCl 200 mM, pH 1, puis 2 fois avec de l'eau déminéralisée. Alors, elles étaient incubées 15 min dans une solution de jaune alcian 1 g/L (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*) et d'acide acétique 3 %, pH 2,5. Les coupes étaient enfin rincées avec de l'eau déminéralisée et observées au microscope.

### **2.2.3. Immunohistochimie**

Les coupes étaient déparaffinées et réhydratées par passages successifs dans des bains de xylène, puis de méthanol en concentrations décroissantes, et ensuite d'eau déminéralisée. Notons que le deuxième bain de méthanol contenait 0,5 % de peroxyde d'hydrogène (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*) afin de neutraliser l'activité des peroxydases endogènes. Quinze mM de CaCl<sub>2</sub> étaient ajoutés à tous les bains d'eau déminéralisée et de TBS (*Tris Buffer Saline*, Tris 50 mM et NaCl 120 mM, pH 7,6), pour prévenir la désintégration des billes d'alginate. Une coupe de cartilage sain était utilisée comme contrôle positif. Les coupes étaient digérées par une solution de trypsine (100 mg/L de trypsine 250 dans du TBS, *Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*) pendant 30 min à 37°C. Après 3 lavages dans du TBS, les coupes étaient incubées pendant 30 min avec du sérum de lapin (*Novocastra, Merelbeke, Belgique*), puis pendant 90 min en chambre humide avec un anticorps polyclonal anti-collagène de type II obtenu chez le lapin (*Novocastra, Merelbeke, Belgique*) ou avec du sérum de lapin (contrôle négatif). Les coupes étaient alors rincées avec du TBS et incubées pendant 30 min en chambre humide avec un polymère sur lequel étaient couplés de la peroxydase et des anticorps anti-lapin et anti-souris (*EnVision system, Dako*,

*Heverlee, Belgique*). Après plusieurs rinçages, les coupes étaient plongées pendant 10 min dans une solution de 3,3-diaminobenzidine (0,5 mg/ml, *FAST DAB, Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*). Les coupes étaient ensuite rincées avec de l'eau déminéralisée et contre-colorées à l'hématoxyline avant leur observation au microscope.

### 2.3. DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'ANALYSE BIOCHIMIQUES

#### 2.3.1. Dosage de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) a été quantifié selon la technique de Labarca et Paigen<sup>265</sup>. 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 PBS dans une gamme de concentrations comprises entre 1,25 et 20 µg/ml. Deux cent µl de la solution de bis-benzimidazole (*Calbiochem-La JOLIA, CA, USA*) (20 mg/100 ml de tampon phosphate 50 mM, NaCl 2 M, pH 7,2) étaient alors ajoutés aux 50 µl de l'extrait cellulaire ou aux 50 µl des solutions de référence. Après 1h d'incubation, la lecture était effectuée à l'aide d'un fluorimètre (*Labsystems, Beverly, USA*), en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 356 nm et d'émission de 458 nm.

#### 2.3.2. Dosage de la LDH

La mortalité cellulaire a été déterminée par la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture. Cinquante µl de tampon Tris 10 mM, pH 8,5, contenant 10 mg/L d'albumine sérique bovine (BSA, *Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique*), et 800 nM de lactate (*Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique*) étaient mélangés à 100 µl de standard ou d'échantillon (avant toute congélation). Ensuite, 50 µl du mélange réactionnel étaient ajoutés. Le mélange réactionnel était composé de p-iodonitrotétrazolium violet (1,6 mg/ml, *Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique*), de nicotinamide-adénine dinucléotide (4 mg/ml, *Roche pharmaceuticals, Bruxelles, Belgique*) et de phénazine méthosulfate (0,4 mg/ml, *Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique*). Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance était lue à

492 nm. La droite de calibration était réalisée avec de la LDH isolée à partir de muscle de lapin (*Roche pharmaceuticals, Bruxelles, Belgique*), dans une gamme de concentrations comprises entre 12,5 et 2000 ng/ml. Le pourcentage de cellules mortes a été calculé en utilisant la formule suivante : (LDH des milieux de culture/LDH totale) x 100. La LDH totale correspond à la somme de la LDH contenue dans la CM, la FRM et les milieux de culture (jours 0 à 12).

### **2.3.3. Incorporation de la thymidine tritiée**

Une  $\mu\text{Ci}$  de thymidine tritiée (méthyl- $^3\text{H}$ -thymidine, 50 Ci/mmol, *ICN Biomedicals, Asse-Relegem, Belgique*) était ajoutée par ml de milieu de culture, 24 h avant l'arrêt de la culture. Après dissociation des billes d'alginate, les culots de cellules étaient recueillis et mélangés à 1 ml d'acide trichloroacétique 10 % (v/v). Au terme de 15 min d'incubation à 4°C, le mélange était centrifugé à 1100 g. Cette procédure permet de conserver l'ADN marqué au tritium et d'éliminer la thymidine tritiée contenue dans le cytoplasme et non incorporée. Le culot était ensuite solubilisé dans 500  $\mu\text{l}$  d'une solution de NaOH 1 N pendant 30 min. La solution était alors amenée à pH 7 par l'addition d'HCl et de tampon HEPES. La radioactivité contenue dans les échantillons était comptée (400  $\mu\text{l}$  d'extrait cellulaire et 4 ml de liquide scintillant) pendant 4 min sur un compteur beta.

### **2.3.4. Dosages EASIA de l'agrécane, du TGF- $\beta$ 1, de la MMP-3 et du TIMP-1**

L'agrécane, le TGF- $\beta$ 1, la MMP-3 et le TIMP-1 ont été quantifiés par EASIA (Solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay, *Biosource Europe, Fleurus, Belgique*) dans les milieux de culture et dans les fractions FRM et CM des billes d'alginate. Ces dosages sont basés sur un système oligonal, constitué de deux anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes distincts de la molécule quantifiée. La fixation du premier anticorps dans le fond d'une plaque 96 puits était réalisée par l'incubation de cet anticorps, dilué dans un tampon composé de NaCl 8 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,42 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/L et KCl 0,2 g/L, pH 7,4 (tampon EASIA), durant une nuit à 4°C. La plaque était alors lavée avec du tampon de lavage composé de 0,1 % (v/v) de tween 20 (*Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique*) et d'HEPES 1 mM, et ensuite saturée avec une solution d'albumine bovine (BSA, *Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique*) 5 g/L dans le tampon EASIA, 2 h à température ambiante. L'antigène réagit avec les

anticorps fixés sur le fond d'une plaque 96 puits et avec des anticorps couplés à de la biotine. Après une période d'incubation de 2 h permettant la formation de complexes anticorps-antigène-anticorps biotinylé, les plaques étaient lavées et une solution de streptavidine-peroxydase (0,02 U/ml dans le tampon utilisé pour la saturation des plaques, *Roche Pharmaceuticals, Bruxelles, Belgique*) était alors ajoutée. Au terme de 30 min d'incubation, la plaque était lavée et la révélation des anticorps fixés à l'antigène était effectuée par l'addition d'une solution de tétraméthylbenzidine et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Biosource Europe, Fleurus, Belgique*). Après 20 min d'incubation, la réaction était stoppée par l'addition d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 N et l'absorbance était lue à 450 nm. Le dosage était réalisé en une ou deux étape(s) selon l'antigène quantifié :

- Dans les dosages réalisés en une étape, les échantillons ou les standards et le deuxième anticorps étaient incubés ensemble.
- Dans les dosages réalisés en deux étapes, les échantillons ou les standards étaient incubés seuls en présence de l'anticorps fixé, et ensuite, après lavage des plaques, incubés avec le deuxième anticorps.

<i>Molécules étudiées</i>	<i>Type de dosage</i>	<i>Sensibilité</i>	<i>Précision (CV intraassay)</i>	<i>Reproductibilité (CV interassay)</i>
Agrécane	2 étapes	1 ng/ml	2,7 %	7,0 %
TGF-β1	1 étape	10 pg/ml	8,3 %	7,2 %
MMP-3	1 étape	0,2 ng/ml	5,6 %	6,5 %
TIMP-1	2 étapes	0,5 ng/ml	4,7 %	4,9 %

**Tableau 5 :** Caractéristiques analytiques des différents dosages EASIA utilisés.

**Remarques :**

- Dans le dosage EASIA de MMP-3, les anticorps reconnaissent la MMP-3 active, la pro-MMP-3, et les complexes MMP-3/TIMP.
- Les anticorps utilisés dans le dosage de TIMP-1 reconnaissent la forme libre du TIMP-1 et celle complexée aux MMP.
- Pour le dosage de l'agrécane, l'anticorps fixé à la plaque reconnaît les résidus KS et l'anticorps biotinylé reconnaît la partie HABR de la protéine centrale. Ce dosage permet ainsi la reconnaissance de la protéine entière mais également de la protéine après clivage enzymatique.

### 2.3.5. Dosage de l'activité de type stromélysine

L'activité de type stromélysine a été quantifiée dans les milieux de culture par une méthode basée sur la digestion enzymatique de la caséine couplée à la résorufine (*Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne*). Cent  $\mu\text{l}$  de milieu de culture étaient alors incubés 18 h à 37°C avec 25  $\mu\text{g}$  de caséine-résorufine solubilisée dans 25  $\mu\text{l}$  de tampon Tris 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, triton X-100 0,005 %, NaCl 300 mM, N-éthylmaleimide 5 mM (*VWR, Louvain, Belgique*) et phénylméthanesulphonylfluoride 1 mM (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), pH 7,5. La réaction enzymatique était alors stoppée par l'addition de 600  $\mu\text{l}$  d'acide trichloroacétique 2,5 % (v/v) et d'EDTA 20 mM pendant 10 min à 37°C. Les fragments de caséine étaient séparés de la molécule native par centrifugation à 6500 g durant 10 min. Les fragments contenus dans le surnageant étaient ensuite mesurés par fluorimétrie après addition d'1 ml de tampon Tris-HCl 500 mM pH 8,8. La lecture était réalisée aux longueurs d'ondes d'excitation de 574 nm et d'émission de 584 nm.

L'activité enzymatique contenue dans les milieux de culture était évaluée avant ou après activation la stromélysine latente des échantillons par le p-aminophenylmercuric acétate (APMA, *Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*, 500 nM durant 4h à 37°C). Ce procédé permet de déterminer la proportion d'enzyme active dans le milieu de culture conditionné par les chondrocytes.

### 2.4. CALCULS ET ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats ont été exprimés en quantités d'agrécane, de MMP-3, de TIMP-1 ou de TGF- $\beta$ 1 par  $\mu\text{g}$  d'ADN. Les productions totales ont été obtenues en additionnant les quantités trouvées dans la CM, dans la FRM et dans les milieux de culture. Nous avons ensuite calculé la proportion des différentes molécules dans les différents compartiments de la culture.

La moyenne et l'écart-type réduit (SEM) ont été calculés pour chaque condition de culture. Les moyennes obtenues ont été comparées par le test non paramétrique U de Mann Whitney.

Le test de Mann-Whitney permet de décider si une variable X possède la même distribution dans deux populations différentes  $P_1$  et  $P_2$ . L'hypothèse sous épreuve s'écrit donc  $H_0$  : la distribution de X est la même dans  $P_1$  et  $P_2$ .

Le test peut se réaliser de la façon suivante :

Désignons par  $n_1$  et  $n_2$  les effectifs des échantillons prélevés de façon indépendante et simplement fortuite dans deux populations. Convenons que  $n_1 \leq n_2$ . On procède alors comme suit :

- 1) On rassemble les données des deux échantillons et on les ordonne par valeurs croissantes, puis on attribue à chacune des observations son rang, c'est-à-dire son numéro d'ordre. Si des observations sont égales, on attribue à chacune d'elles comme rang, la moyenne des rangs qu'elles occupent.
- 2) On calcule la somme  $T'$  des rangs des observations de l'échantillon de moindre effectif (c'est-à-dire de l'échantillon issu de  $P_1$  puisque nous avons convenu que  $n_1 \leq n_2$ ).

La somme des rangs  $T'$  est forcément comprise entre

$$\frac{n_1(n_1 + 1)}{2} \quad \text{et} \quad \frac{n_1(n_1 + 2n_2 + 1)}{2}$$

Si  $H_0$  est vrai, alors la somme des rangs relatifs à un échantillon est, en moyenne, proportionnelle à l'effectif de cet échantillon. Autrement dit, on doit avoir

$$E(T') = \frac{n_1(n_1 + n_2 + 1)}{2}$$

Les échantillons défavorables à  $H_0$  seront donc ceux pour lesquels la valeur de la statistique  $T'$  s'écarte trop de cette quantité. Les valeurs critiques sont données dans les tables adéquates.

On rejette alors  $H_0$  avec un risque de première espèce  $\alpha$  dès que

$$\left| \frac{t' - \frac{n_1(n_1 + n_2 + 1)}{2}}{\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}} \right| > Q_z \left( 1 - \frac{\alpha}{2} \right)$$

Où  $t'$  est la valeur observée de la statistique  $T'$ .

Les coefficients de corrélation de Spearman ( $r$ ) ont été calculés pour évaluer l'effet de la concentration des molécules testées sur le paramètre étudié.

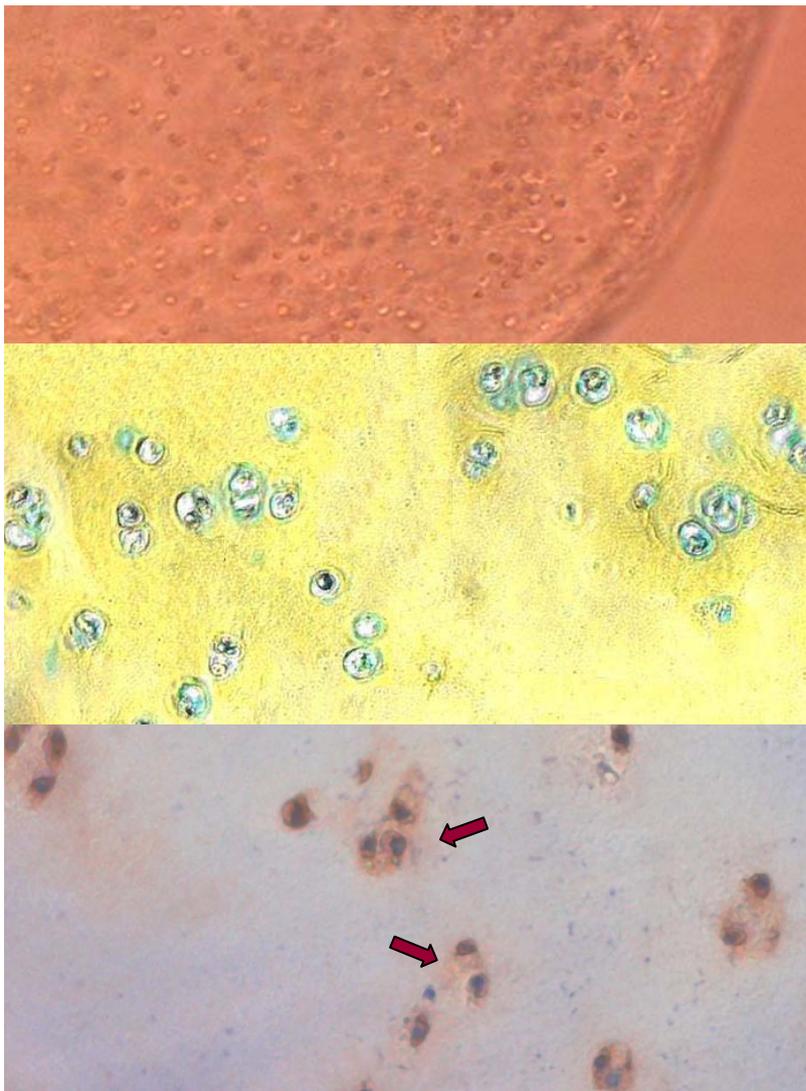
Une remarque importante s'impose concernant les dosages dans le milieu de culture : les milieux de culture ont été conditionnés par les chondrocytes pendant des périodes de 3 jours de culture, puisque telle est la fréquence de son renouvellement. Les quantités mesurées correspondent à la production effectuée par les chondrocytes pendant les différents intervalles de durées identiques (0-3, 3-6, 6-9 et 9-12 jours). Ces données ont été représentées graphiquement par des histogrammes. L'addition de ces valeurs donne des valeurs cumulées, lesquelles ont été représentées graphiquement par des courbes.

## 3. Résultats

### 3.1. CARACTERISATION DU MODELE DE CULTURE EN BILLES D'ALGINATE DE CHONDROCYTES ARTICULAIRES HUMAINS

#### 3.1.1. Etude histologique des billes d'alginate

L'examen microscopique des billes d'alginate montrait des chondrocytes de forme sphérique, localisés dans des logettes formées au sein de la matrice d'alginate (figure 19A). L'examen histologique des coupes colorées au bleu/jaune alcian (figure 19B) nous permettait de distinguer les GAG hautement sulfatés (qui se colorent en bleu), comme l'agrécane, des polysaccharides faiblement sulfatés (qui se colorent en jaune) comme l'alginate. Il mettait en évidence un halo bleu autour des chondrocytes témoignant de la forte concentration en GAG hautement sulfatés à ce niveau. L'utilisation d'un anticorps spécifique du collagène de type II nous a permis de révéler la présence de collagène de type II dans la matrice extracellulaire (figure 19C).



**Figure 19 :**

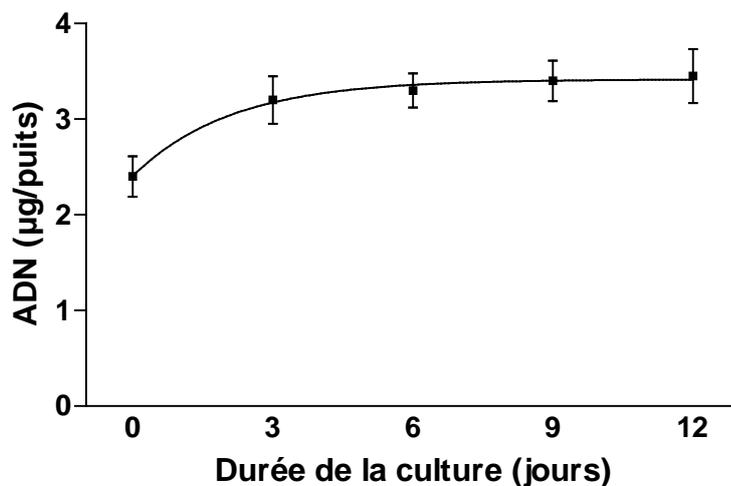
*A : Observation microscopique d'une bille d'alginate dans son surnageant de culture. Grossissement : 400 x*

*B : Mise en évidence des protéoglycanes hautement sulfatés (bleu) ou non (jaune) par la technique de coloration au bleu/jaune alcian. Grossissement : 800 x*

*C : Mise en évidence du collagène de type II par immunohistochimie et contre coloration à l'hématoxyline éosine. Grossissement : 650 x  
Le collagène de type II apparaît sous la forme d'un halo rouge autour des cellules ( ➡ )*

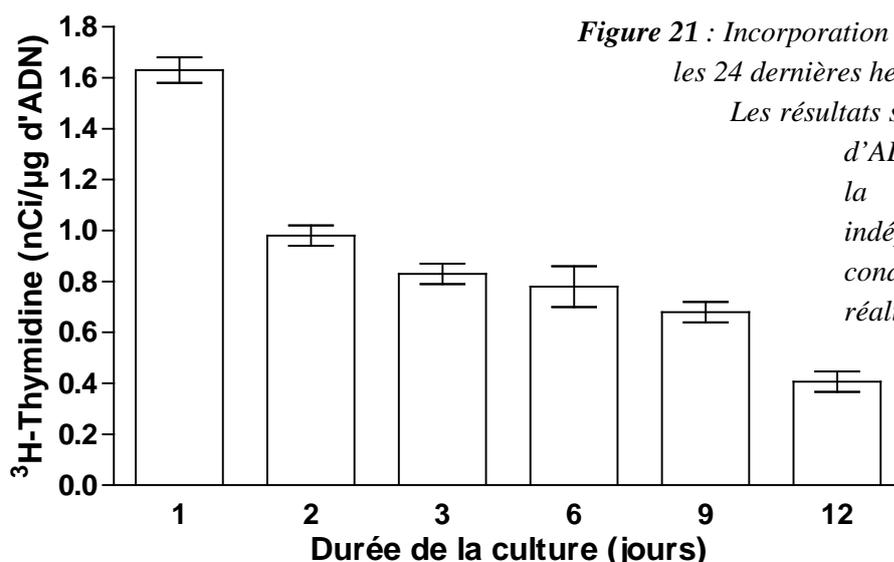
### 3.1.2. Mesure de la synthèse d'ADN

Nous avons mesuré la quantité d'ADN au terme des différentes périodes de culture (0, 3, 6, 9 et 12 jours) (figure 20). Il apparaît que la quantité en ADN des billes d'alginate augmentait principalement durant les 3 premiers jours de culture (0 vs 3 jours, + 32 % :  $p < 0,05$ ). Ensuite, la concentration en ADN restait stable jusqu'au terme de la culture (3 jours vs 12 jours, + 10 %).



**Figure 20 :** Courbe d'évolution de la quantité d'ADN en fonction de la durée de la culture. Les résultats sont exprimés en µg d'ADN par puits et sont représentés par la moyenne de 15 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=45$ ).

Afin d'étudier la synthèse d'ADN, de la thymidine tritiée a été ajoutée au milieu de culture pendant les 24 dernières heures des différentes périodes de culture (1, 2, 3, 6, 9 et 12 jours) (figure 21). L'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine était maximale durant les 24 premières heures de culture (1,6 nCi/µg d'ADN/24 h). Ensuite, elle diminuait progressivement jusqu'au terme de la culture. A ce stade, l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine était de 0,4 nCi/µg d'ADN/24 H.

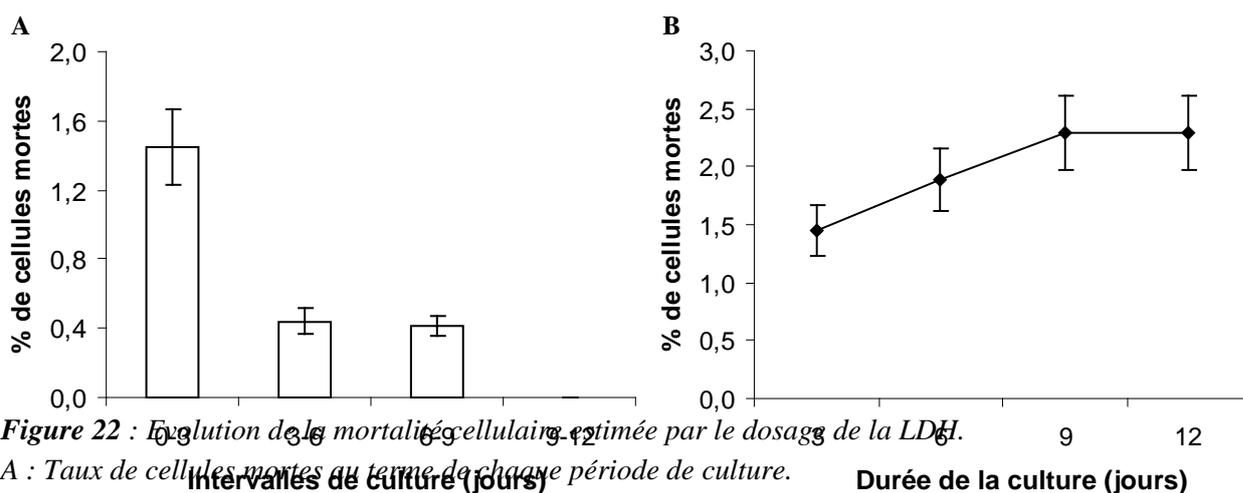


**Figure 21 :** Incorporation de thymidine tritiée pendant les 24 dernières heures de la culture.

Les résultats sont exprimés en nCi par µg d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9).

### 3.1.3. Etude de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été estimée par deux méthodes : l'incorporation du bleu trypan dans la cellule et la libération dans le milieu extracellulaire de la LDH. L'incorporation du bleu trypan par les chondrocytes restait inférieure à 5 % des cellules pendant toute la durée de la culture (résultats non illustrés). Le taux de cellules mortes, déterminé par la quantité de LDH libérée dans le milieu extracellulaire, demeurait inférieur à 2,5 % après 12 jours de culture (figure 22).



**Figure 22 :** Evolution de la mortalité cellulaire estimée par le dosage de la LDH.

A : Taux de cellules mortes au terme de chaque période de culture.

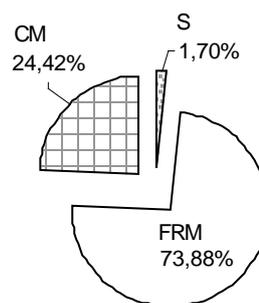
B : Taux cumulé de cellules mortes.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules mortes et sont représentés par la moyenne de 15 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=45).

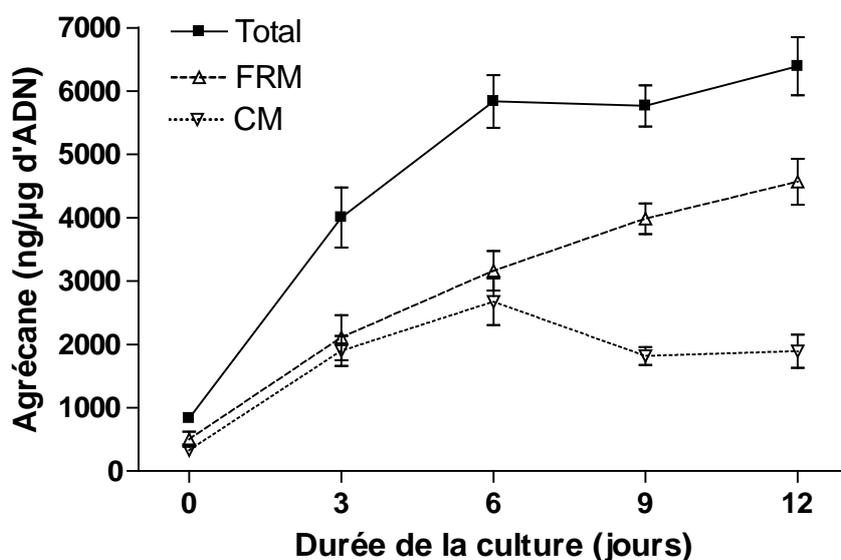
### 3.1.4. Etude de la production d'agrécane

La quantité d'agrécane a été mesurée dans les 3 compartiments (CM, FRM et S) de la culture en billes d'alginate à l'aide d'un dosage immunologique spécifique. La distribution de l'agrécane dans ces compartiments est représentée par la figure 23. L'agrécane produite par les chondrocytes était immobilisée presque totalement (98 %) dans la bille d'alginate (CM et FRM).

**Figure 23 :** Distribution de l'agrécane dans les différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 12 jours de culture. CM = matrice péricellulaire et territoriale, FRM = matrice interterritoriale et S = milieu de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la production totale et représentent la moyenne de 15 cultures indépendantes. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=45).



La production d'agrécane se déroulait essentiellement durant les 6 premiers jours de la culture. Pendant cette période, l'agrécane néosynthétisé se distribuait de manière égale dans les compartiments CM et FRM. Après le 6<sup>e</sup> jour de culture, la quantité d'agrécane contenue dans le compartiment CM diminuait et celle contenue dans la fraction FRM augmentait, alors que le contenu total de la bille (CM + FRM) restait constant (figure 24). Après 12 jours de culture, environ 70 % du contenu des billes d'alginate en agrécane se situait dans le compartiment FRM (matrice interterritoriale).

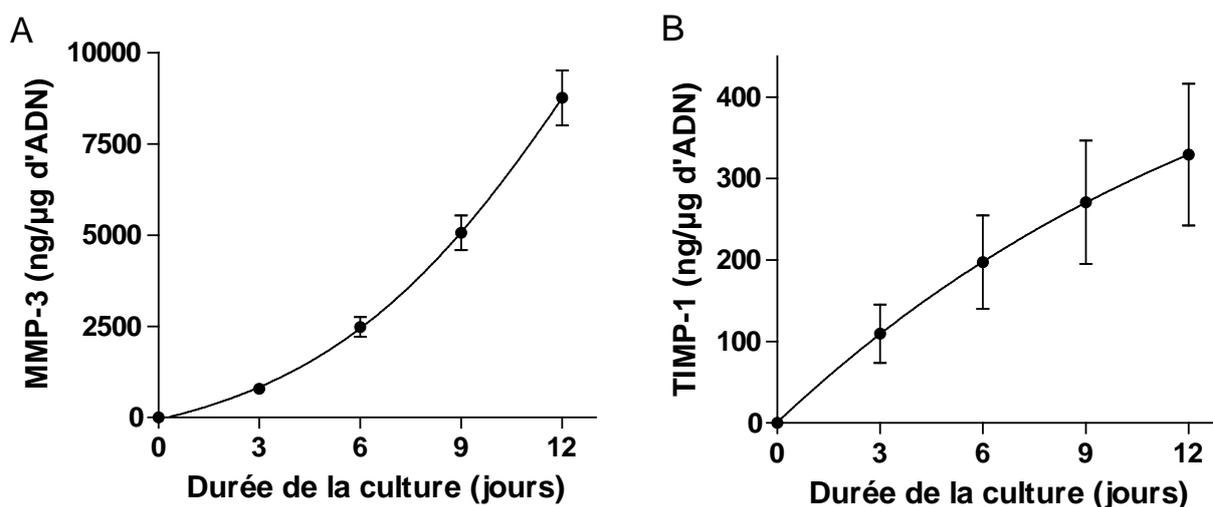


**Figure 24 :** Quantité d'agrécane mesurée dans les compartiments FRM et CM de la culture en billes d'alginate en fonction de la durée de la culture. La quantité totale correspond à la somme des agrécane présents dans la phase cellulaire (CM) et dans l'alginate (FRM). Les résultats sont exprimés en ng d'agrécane par µg d'ADN et sont représentés par la moyenne de 6 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=18).

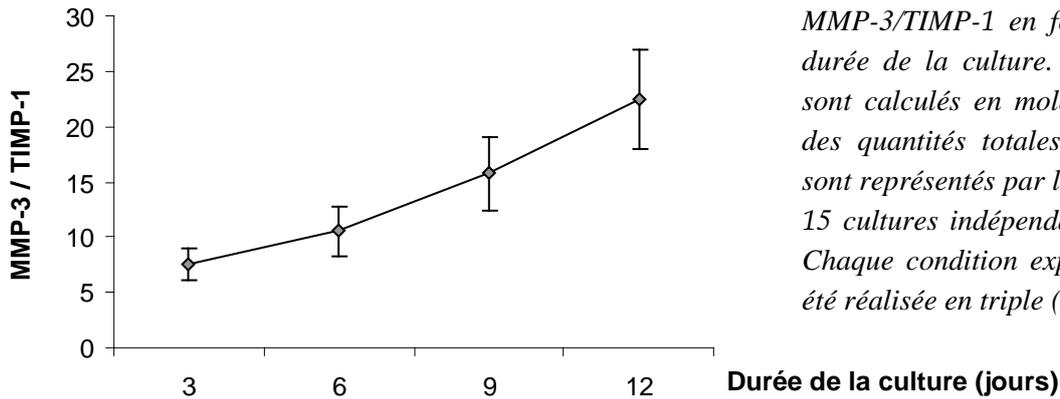
### 3.1.5. Etude de la production de MMP-3 et de TIMP-1

Dans les conditions basales, la presque totalité (97 %) de MMP-3 produite par les chondrocytes arthrosiques était libérée dans le milieu de culture. La production de MMP-3 augmentait en fonction de la durée de culture ( $r = 0,9981$  et  $p < 0,001$ ). La quantité de MMP-3 sécrétée par les chondrocytes arthrosiques était de 790 ng/ $\mu$ g d'ADN pendant les 3 premiers jours, mais atteignait la valeur de 3700 ng/ $\mu$ g d'ADN entre le 9<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour de culture. A l'inverse, la production de TIMP-1 diminuait en fonction de la durée de la culture ( $r = -0,9945$  et  $p < 0,01$ ). Pendant les 3 premiers jours de culture, les chondrocytes produisaient 110 ng/ $\mu$ g d'ADN de TIMP-1, mais seulement 54 ng/ $\mu$ g d'ADN entre le 9<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour de culture (figure 25). La conséquence de l'évolution divergente de ces deux paramètres était la croissance exponentielle du rapport MMP-3/TIMP-1 (figure 26).

Nous avons également mesuré l'activité enzymatique de type «stromélysine » dans nos milieux de culture à l'aide d'un test colorimétrique utilisant la caséine-résorufine comme substrat. L'activité enzymatique de type stromélysine était indétectable dans les milieux de culture, et ce quelle que soit la durée de la culture. Ce résultat suggère que la majorité de la stromélysine produite restait sous la forme d'un zymogène inactif.



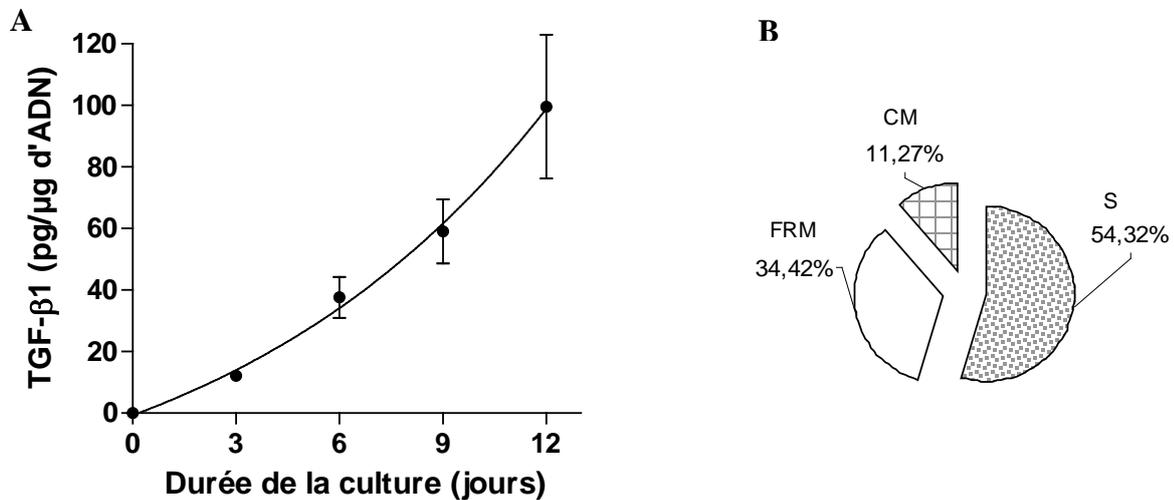
**Figure 25 :** Quantités cumulées de MMP-3 (A) et de TIMP-1 (B) libérées dans le milieu de culture. Les résultats sont exprimés en ng de MMP-3 ou de TIMP-1 par  $\mu$ g d'ADN et sont représentés par la moyenne de 15 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=45$ ).



**Figure 26** : Evolution du rapport MMP-3/TIMP-1 en fonction de la durée de la culture. Les rapports sont calculés en molarité à partir des quantités totales cumulées et sont représentés par la moyenne de 15 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=45).

### 3.1.6. Etude de la production de TGF- $\beta$ 1

Dans les conditions basales, les chondrocytes arthrosiques produisaient (figure 27A) en moyenne 12,2 pg de TGF- $\beta$ 1 par  $\mu$ g d'ADN durant les 3 premiers jours de culture, mais 40,5 pg entre le 9<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour. Une partie importante du TGF- $\beta$ 1 néosynthétisé était accumulée dans la bille d'alginate. Après 12 jours de culture, 45 % du TGF- $\beta$ 1 néosynthétisé étaient stockés dans la matrice extracellulaire, et plus particulièrement la matrice interterritoriale (11 % dans CM et 34 % dans FRM, figure 27B).



**Figure 27** : A : Quantités cumulées de TGF- $\beta$ 1 libérées dans le milieu de culture. Les résultats sont exprimés en pg de TGF- $\beta$ 1 par  $\mu$ g d'ADN et sont représentés par la moyenne de 15 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=45).

B : Distribution du TGF- $\beta$ 1 dans différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 12 jours de culture. CM = matrice péricellulaire et territoriale, FRM = matrice interterritoriale et S = milieu de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la production totale et sont représentés par la moyenne de 15 cultures indépendantes. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=45).

### 3.2. EFFETS DE L'IL-1 $\beta$ SUR LE METABOLISME DES CHONDROCYTES CULTIVES EN BILLES D'ALGINATE

#### 3.2.1. Influence de l'IL-1 $\beta$ sur la quantité d'ADN et la viabilité cellulaire

La quantité d'ADN contenue dans les billes d'alginate n'était pas significativement modifiée par l'addition d'IL-1 $\beta$  aux concentrations comprises entre 10<sup>-13</sup> et 10<sup>-9</sup> M (tableau 6).

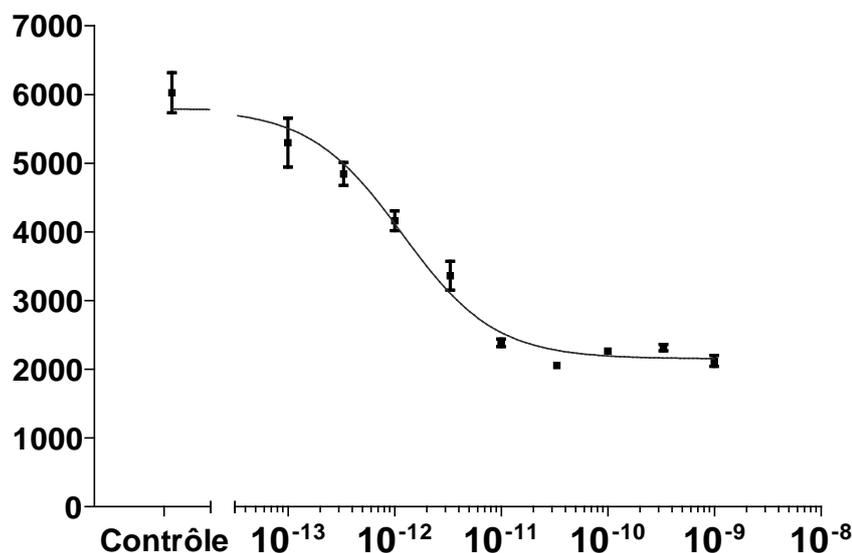
Concentration en IL-1 $\beta$	$\mu\text{g}$ d'ADN/puits
0	2,67 $\pm$ 0,08
10 <sup>-13</sup> M	2,67 $\pm$ 0,05
3,3 x 10 <sup>-13</sup> M	2,69 $\pm$ 0,09
10 <sup>-12</sup> M	2,76 $\pm$ 0,08
3,3 x 10 <sup>-12</sup> M	2,59 $\pm$ 0,08
10 <sup>-11</sup> M	2,28 $\pm$ 0,02
3,3 x 10 <sup>-11</sup> M	2,32 $\pm$ 0,02
10 <sup>-10</sup> M	2,27 $\pm$ 0,07
3,3 x 10 <sup>-10</sup> M	2,29 $\pm$ 0,07
10 <sup>-9</sup> M	2,26 $\pm$ 0,05

**Tableau 6 :** Quantités d'ADN contenues dans les billes d'alginate au terme de 12 jours de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$ . Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'ADN par puits et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ).

De même, la prolifération cellulaire estimée par l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine et la viabilité cellulaire déterminée par la libération de LDH n'étaient pas affectées par l'IL-1 $\beta$  (résultats non montrés), et ce quelle que soit la concentration testée.

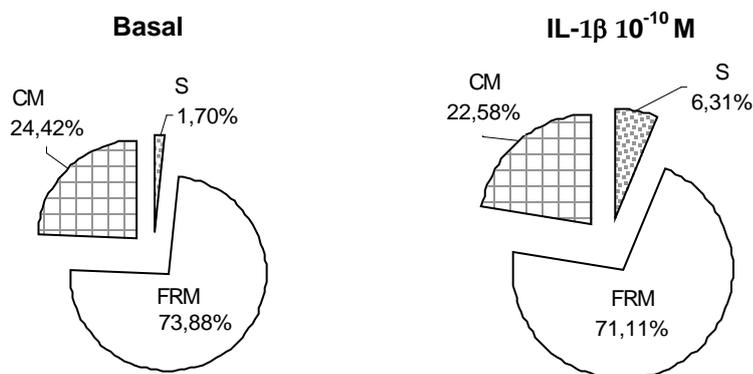
### 3.2.2. Influence de l'IL-1 $\beta$ sur la production d'agrécane

L'IL-1 $\beta$  inhibait de manière concentration-dépendante la production d'agrécane ( $r = -0,9422$ ,  $p < 0,001$ , figure 28). L'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  était significatif à partir de la concentration de  $3,33 \times 10^{-13}$  M ( $p < 0,05$ ), et atteignait un maximum à la concentration de  $10^{-11}$  M ( $p < 0,001$ ).



**Figure 28 :** Effet de la concentration en IL-1 $\beta$  sur la production d'agrécane durant les 12 jours de culture. Les résultats sont exprimés en ng d'agrécane par  $\mu$ g d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ).

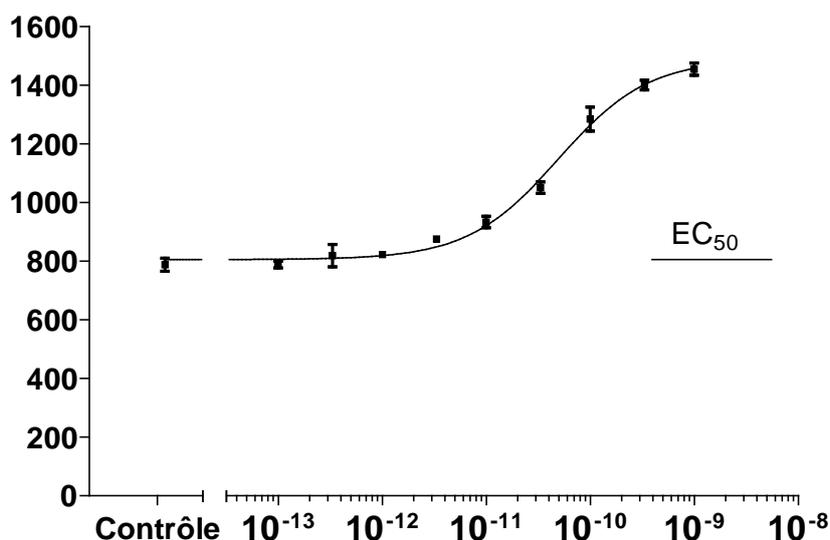
De plus, l'IL-1 $\beta$  modifiait la répartition des molécules d'agrécane néosynthétisées dans les différents compartiments de la culture : la proportion d'agrécane contenue dans la bille d'alginate (FRM + CM) diminuait en présence d'IL-1 $\beta$  (groupe témoin 98 % vs groupe IL-1 $\beta$  93 %,  $p < 0,05$ ) alors que la quantité libérée dans le surnageant augmentait (groupe témoin 1,7 % vs groupe IL-1 $\beta$  6,3 % ;  $p < 0,05$ , figure 29).



**Figure 29 :** Effet de l'IL-1 $\beta$   $10^{-10}$  M sur la distribution d'agrécane dans les compartiments de la bille d'alginate après 12 jours de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la production totale et sont représentés par la moyenne de 12 cultures indépendantes. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=36$ ).

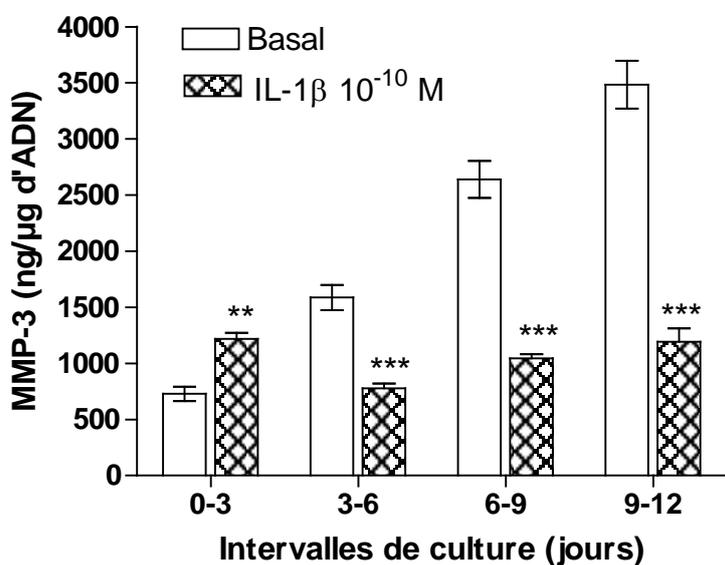
### 3.2.3. Influence de l'IL-1 $\beta$ sur la production de MMP-3 et de TIMP-1

En présence d'IL-1 $\beta$ , la production basale de MMP-3 était augmentée de manière concentration-dépendante après 3 jours d'incubation ( $r= 0,8637$ ,  $p < 0,001$ , figure 30). L'effet était significatif à partir de la concentration de  $10^{-11}$  M ( $p < 0,05$ ) et atteignait un maximum à la concentration de  $3,33 \times 10^{-10}$  M ( $p < 0,01$ ).



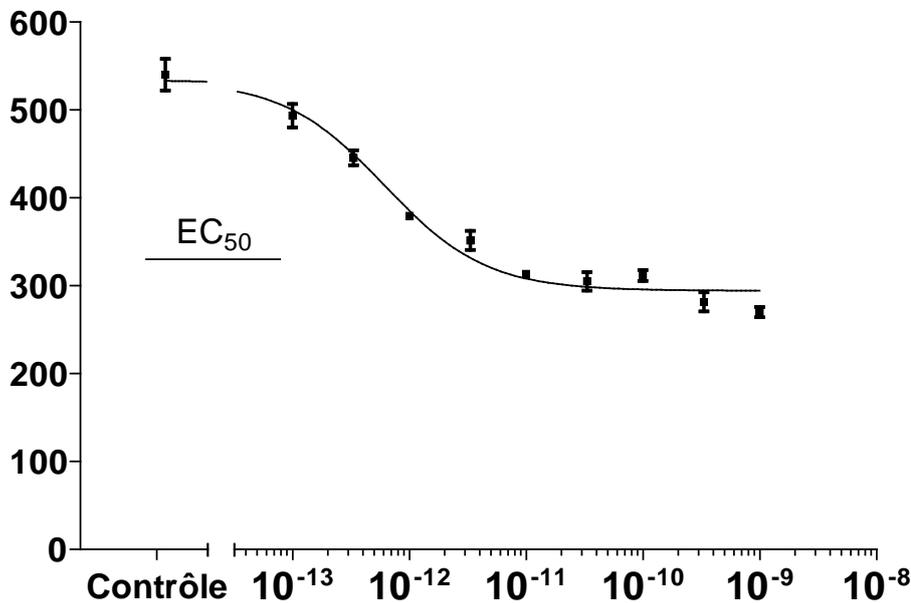
**Figure 30 :** Effet de la concentration en IL-1 $\beta$  sur la production de MMP-3 durant les 3 premiers jours de culture. Les résultats sont exprimés en ng de MMP-3 par  $\mu\text{g}$  d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ).

Par contre, après 6, 9 ou 12 jours de culture, l'IL-1 $\beta$  exerçait un effet inhibiteur sur la synthèse de MMP-3 ( $p < 0,001$ , figure 31).



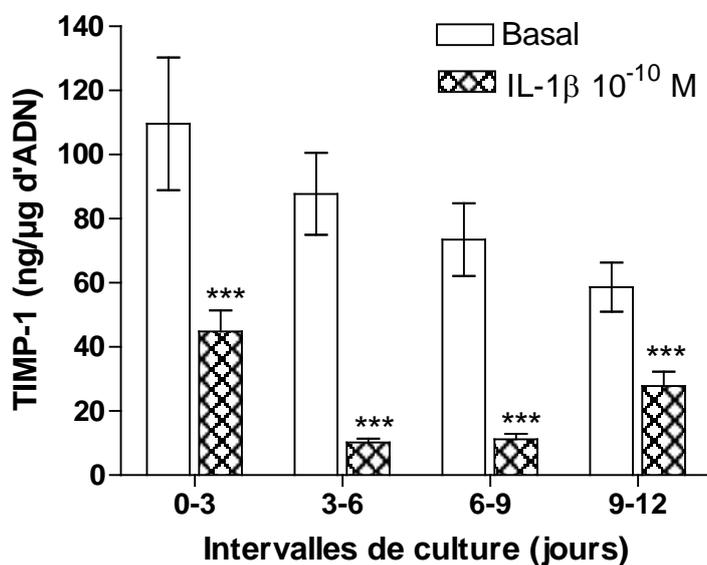
**Figure 31 :** Quantités de MMP-3 libérées dans le surnageant durant chaque période de 72h de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$   $10^{-10}$  M. Les résultats sont exprimés en ng de MMP-3 par  $\mu\text{g}$  d'ADN et sont représentés par la moyenne de 12 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=36$ ).  
\*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

L'IL-1 $\beta$  inhibait de façon concentration-dépendante la production de TIMP-1 par les chondrocytes ( $r = -0,9634$ ,  $p < 0,001$ , figure 32). L'effet était significatif à partir de la concentration de  $10^{-13}$  M ( $p < 0,01$ ) et atteignait un maximum à la concentration de  $3,33 \times 10^{-10}$  M ( $p < 0,001$ ).



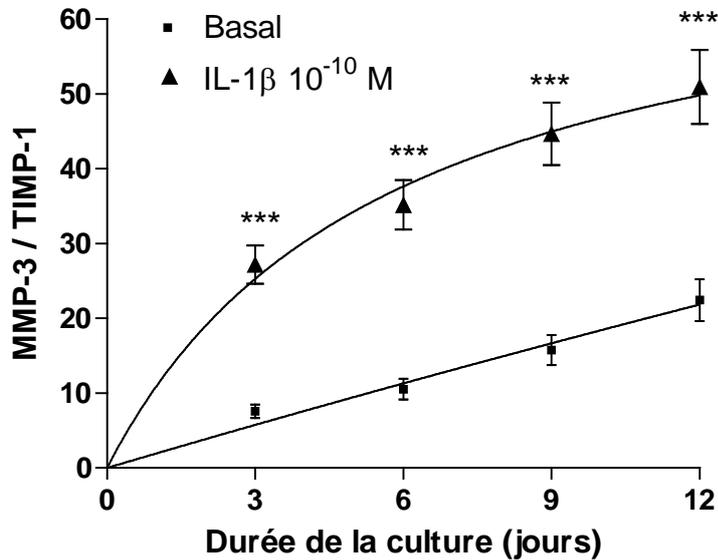
**Figure 32 :** Effet de la concentration en IL-1 $\beta$  sur la production cumulée de TIMP-1 durant les 12 jours de culture. Les résultats sont exprimés en ng de TIMP-1 par  $\mu$ g d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ).

L'effet était significatif dès le 3<sup>e</sup> jour d'incubation et atteignait un maximum entre 3<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour. Après 9 jours de culture, l'inhibition était de 76 % ( $p < 0,001$  ; figure 33)

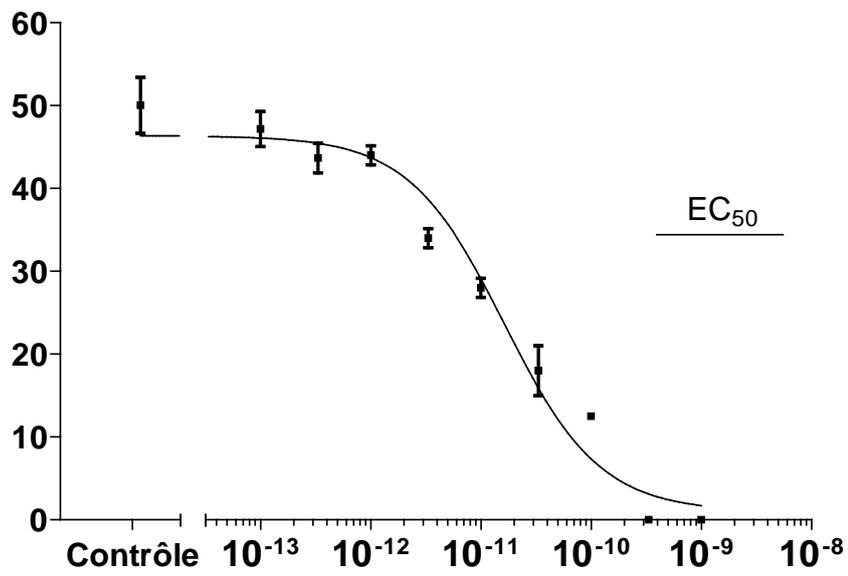


**Figure 33 :** Quantités de TIMP-1 libérées dans le surnageant durant chaque période de 72h de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$   $10^{-10}$  M. Les résultats sont exprimés en ng de TIMP-1 par  $\mu$ g d'ADN et sont représentés par la moyenne de 12 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=36$ ). \*\*\*= $p < 0,001$ .

Le rapport molaire MMP-3/TIMP-1 était significativement augmenté en présence d'IL-1 $\beta$ , et ce quelle que soit la durée de l'incubation (figure 34).



**Figure 34 :** Rapport molaire MMP-3/TIMP-1 calculé à l'aide des valeurs cumulées de TIMP-1 et de MMP-3, en présence ou non d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M. Les résultats sont représentés par la moyenne de 12 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=36). \*\*\*= p<0,001.



### 3.3. EFFETS DE L'IL-6 ET DE L'OSM SUR LE METABOLISME DES CHONDROCYTES CULTIVES EN BILLES D'ALGINATE

#### 3.3.1. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la quantité d'ADN et la viabilité cellulaire

La quantité d'ADN contenue dans les billes d'alginate n'était pas significativement modifiée après 12 jours d'incubation avec de l'IL-6 ou de l'OSM, ajoutées seules ou simultanément avec  $10^{-10}$  M d'IL-1 $\beta$  (tableau 7).

Condition de culture	$\mu\text{g}$ d'ADN/puits	
	Basal	+ IL-1 $\beta$ $10^{-10}$ M
Témoins	2,67 $\pm$ 0,08	2,27 $\pm$ 0,07
IL-6sR 50 ng/ml	2,63 $\pm$ 0,07	2,23 $\pm$ 0,05
IL-6sR 50 ng/ml + IL-6 20 ng/ml	2,74 $\pm$ 0,05	2,39 $\pm$ 0,04
IL-6sR 50 ng/ml + IL-6 100 ng/ml	2,70 $\pm$ 0,13	2,32 $\pm$ 0,12
IL-6sR 50 ng/ml + IL-6 500 ng/ml	2,68 $\pm$ 0,05	2,28 $\pm$ 0,10
OSM 0,1 ng/ml	2,89 $\pm$ 0,21	2,60 $\pm$ 0,10
OSM 1 ng/ml	2,66 $\pm$ 0,14	2,67 $\pm$ 0,11
OSM 10 ng/ml	2,51 $\pm$ 0,22	2,71 $\pm$ 0,39

**Tableau 7 :** Quantités d'ADN contenues dans les billes d'alginate au terme de 12 jours de culture, avec ou sans IL-1 $\beta$ , IL-6 ou OSM. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'ADN par puits et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ).

La viabilité cellulaire estimée par la libération de LDH n'était pas significativement affectée par l'IL-6 ou par l'OSM, ajoutées seules au milieu de culture ou avec de l'IL-1 $\beta$  ( $10^{-10}$  M) (résultats non montrés).

### 3.3.2. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production d'agrécane

En présence de son récepteur soluble (IL-6sR) et à la concentration de 500 ng/ml, l'IL-6 diminuait significativement la production totale d'agrécane (- 20 %,  $p < 0,05$ ), sans modifier la distribution de cette molécule dans les différents compartiments de la culture. Aux concentrations inférieures à 500 ng/ml, l'IL-6 n'avait pas d'effet significatif sur ce paramètre (tableau 8). L'OSM diminuait de façon concentration-dépendante le contenu en agrécane de la bille d'alginate ( $r = -0,9958$ ,  $p = 0,0042$ ). De plus, à la concentration de 10 ng/ml, mais pas aux concentrations inférieures, l'OSM modifiait la distribution des molécules d'agrécane au sein des billes d'alginate. Dans les contrôles, la majorité des molécules d'agrécane était contenue dans la fraction FRM. En présence d'OSM, la quantité d'agrécane était presque identique dans les fractions FRM et CM (tableau 8 et figure 37).

		Agrécane (ng/μg d'ADN)			
		FRM	CM	S	Total
Contrôle		3860 ± 517	2465 ± 43	57 ± 7	6386 ± 567
IL-6sR 50 ng/ml + IL-6 (ng/ml)	0	3897 ± 354	2440 ± 222	51 ± 5	6388 ± 581
	20	3863 ± 469	2419 ± 294	51 ± 6	6333 ± 769
	100	3695 ± 395	2314 ± 247	48 ± 5	6057 ± 647
	500	3176 ± 202 *	1989 ± 127 *	42 ± 3 *	5207 ± 332 *
OSM (ng/ml)	0,1	2871 ± 215 *	1686 ± 116 **	52 ± 5	4609 ± 336 *
	1	1905 ± 133 ***	1420 ± 68 ***	48 ± 5	3373 ± 206 ***
	10	1297 ± 80 ***	1246 ± 69 ***	34 ± 4 **	2577 ± 153 ***

**Tableau 8** : Effets de l'IL-6/IL-6sR et de l'OSM sur la production totale d'agrécane par les chondrocytes et sur sa distribution dans les fractions FRM, CM et S après 12 jours de culture.

Les résultats sont exprimés en ng d'agrécane par μg d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ).

\* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

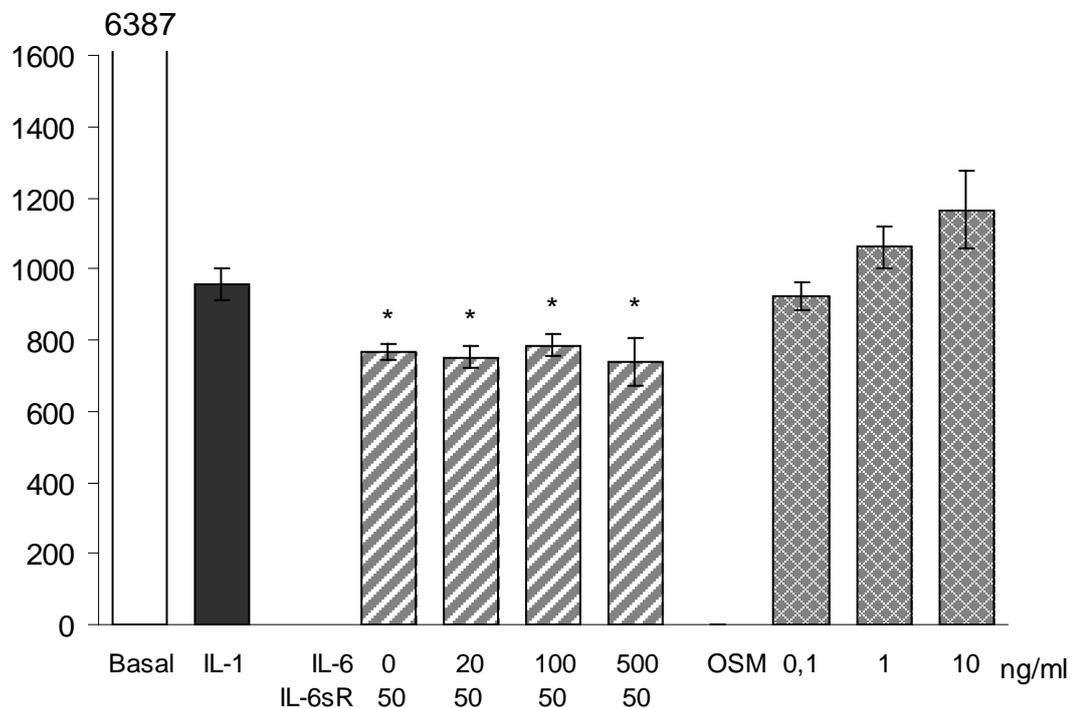
Basal

IL-6/IL-6sR

OSM

**Figure 37 :** Effet de l'IL-6 (500 ng/ml) + IL-6sR (50 ng/ml) et de l'OSM (10 ng/ml) sur la distribution des molécules d'agrécane dans les différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 12 jours de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la production totale d'agrécane et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendante. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9).

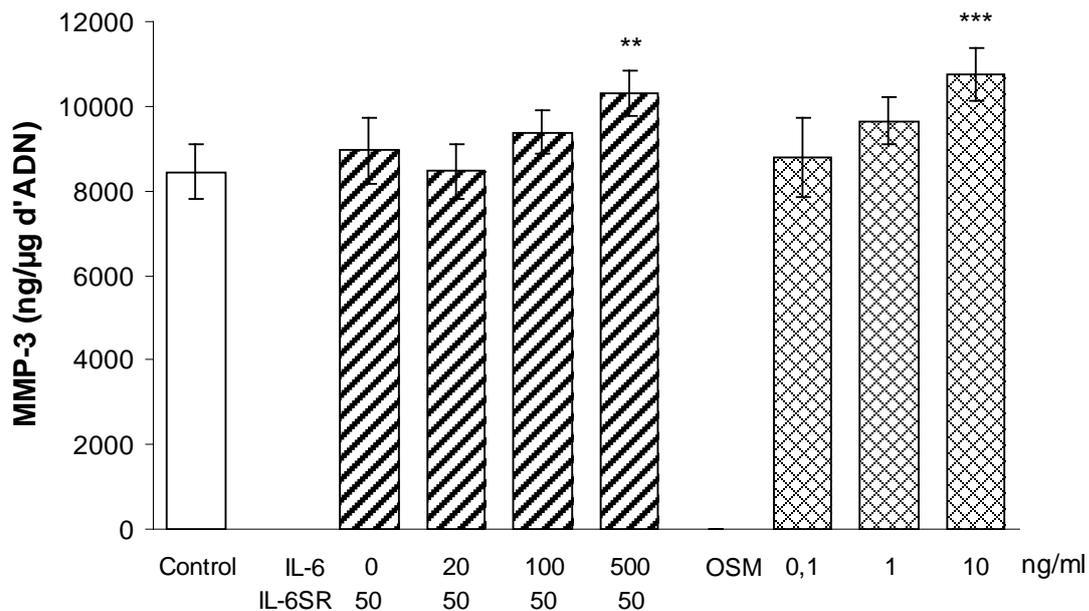
Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la quantité d'agrécane présente dans les billes d'alginate était diminuée de 85 % par l'IL-1 $\beta$  ( $10^{-10}$  M). En présence d'IL-6sR, l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur cette synthèse était significativement plus important ( $p < 0,05$ ). Par contre, l'addition d'IL-6 exogène ne modifiait pas l'effet de l'IL-1 $\beta$ . L'OSM ne modifiait pas significativement l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse d'agrécane (figure 38), et ce quelle que soit la concentration considérée.



**Figure 38 :** Effets de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la quantité totale d'agrécane accumulée dans les billes d'alginate après 12 jours de culture en présence d'IL-1 $\beta$   $10^{-10}$  M. Les résultats sont exprimés en ng d'agrécane par  $\mu$ g d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \* =  $p < 0,05$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.3.3. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de MMP-3 et de TIMP-1

Au terme de 12 jours de culture, la production totale de MMP-3 par les chondrocytes arthrosiques était significativement augmentée par l'IL-6 à la concentration de 500 ng/ml ( $p < 0,01$ ) et par l'OSM à la concentration de 10 ng/ml ( $p < 0,001$ ) (figure 39). Aux concentrations inférieures, aucun effet significatif n'a pu être observé.



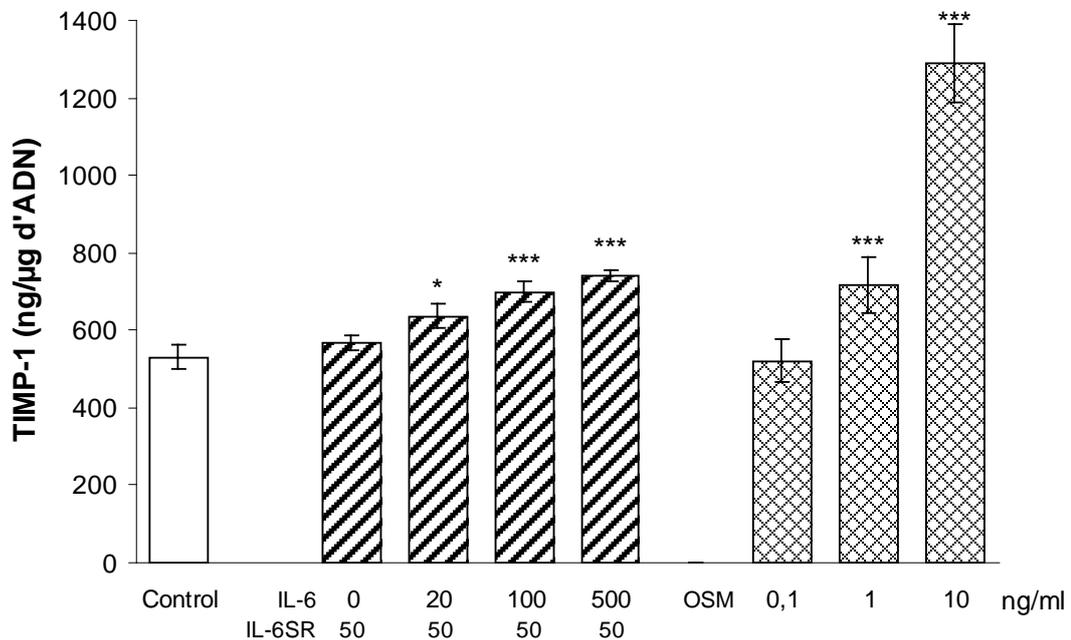
**Figure 39 :** Effet de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production basale cumulée de MMP-3 par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate. Les résultats sont exprimés en ng de MMP-3 par  $\mu\text{g}$  d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

L'IL-6 et l'OSM augmentaient de manière concentration-dépendante la production de TIMP-1 (IL-6 :  $r = 0,9903$ ,  $p < 0,01$  ; OSM :  $r = 0,8951$ ,  $p < 0,05$ , figure 40).

Le rapport molaire MMP-3/TIMP-1 diminuait de moitié en présence de 10 ng/ml d'OSM ( $p < 0,001$ ).

Nous avons précédemment décrit que l'IL-1 $\beta$ , administrée tous les 3 jours, augmentait la synthèse de MMP-3 durant les 3 premiers jours d'incubation, après quoi elle la diminuait. Pendant les 3 premiers jours de culture, l'IL-6 ou l'OSM ne modifiait pas l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse de MMP-3 (figure 41A). Après 12 jours de culture, l'IL-6sR amplifiait l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la production de MMP-3 ( $p < 0,001$ ). L'addition d'IL-6 ne modifiait pas cet effet inhibiteur (figure 41A). L'OSM,

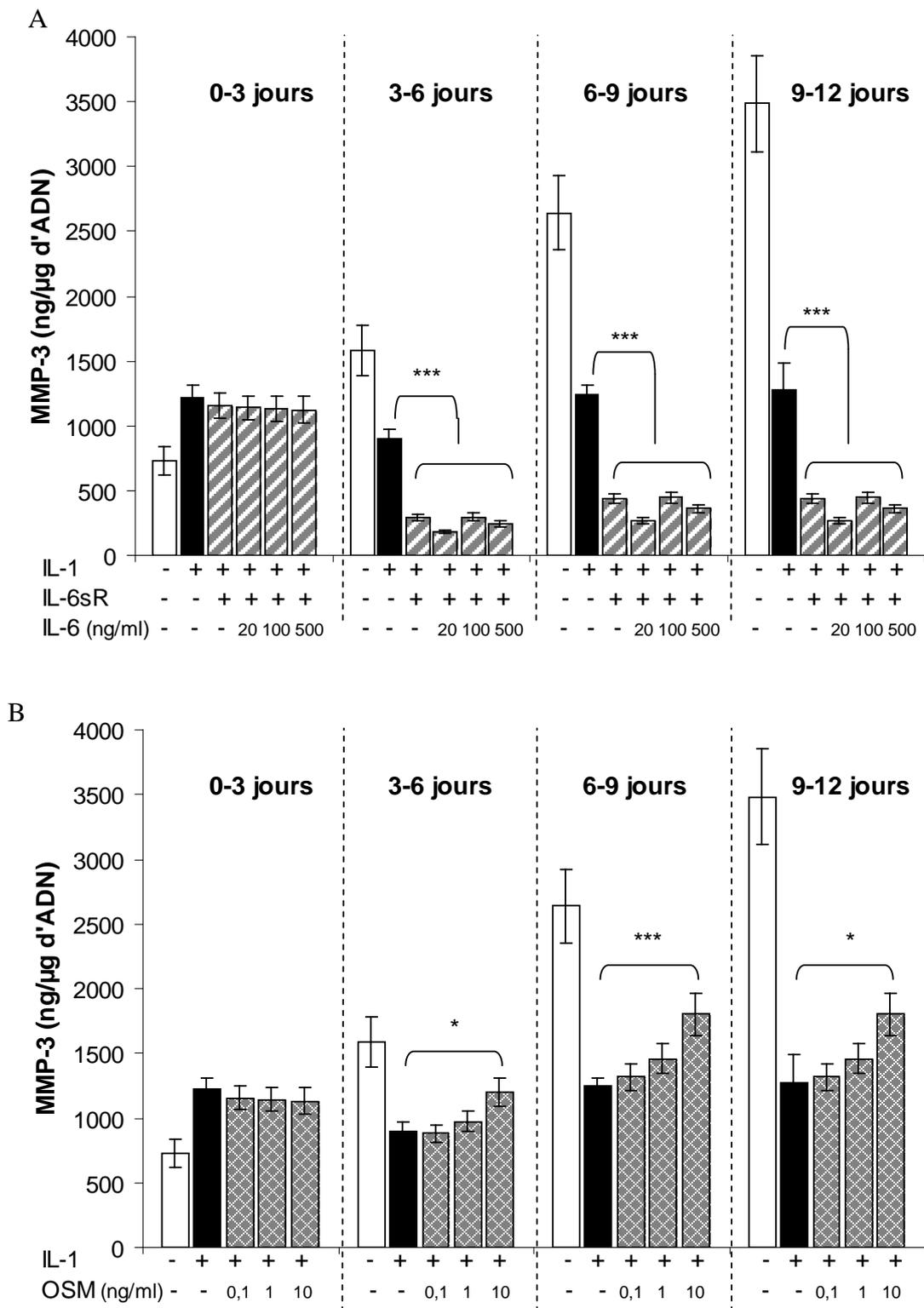
à la concentration de 10 ng/ml, s'opposait partiellement à l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la production de MMP-3 ( $p < 0,01$ ; figure 41B).



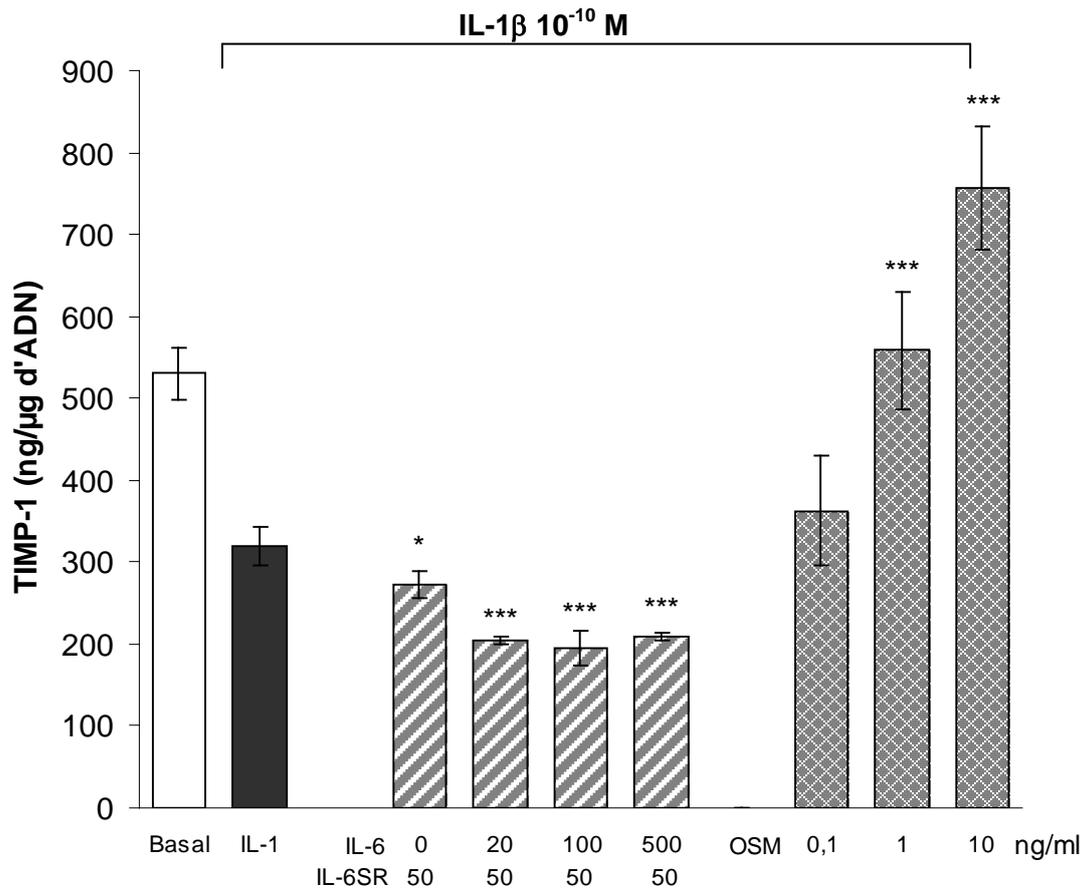
**Figure 40 :** Effet de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production basale cumulée de TIMP-1 par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate. Les résultats sont exprimés en ng de TIMP-1 par  $\mu\text{g}$  d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). \* =  $p < 0,05$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Au terme de 12 jours d'incubation, l'IL-1 $\beta$  ( $10^{-10}$  M) diminuait la production cumulée totale de TIMP-1 de 40 %. L'OSM, aux concentrations de 1 et 10 ng/ml, s'opposait à l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse de TIMP-1. Au contraire, la présence d'IL-6 accentuait l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la production de TIMP-1 (figure 42).

Après 12 jours de culture en présence d'IL-1 $\beta$ , l'OSM et l'IL-6 réduisaient significativement le rapport MMP-3/TIMP-1. En présence de 10 ng/ml d'OSM, le rapport MMP-3/TIMP-1 était réduit de 45 %, alors que l'IL-6 (500 ng/ml) réduisait le rapport MMP-3/TIMP-1 de 32 % ( $p < 0,01$ ).



**Figure 41:** Effet de concentrations croissantes d'IL-6 (A) et d'OSM (B) sur la production de MMP-3 durant les intervalles de 72h de culture par les chondrocytes en présence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M. Les résultats sont exprimés en ng de MMP-3 par  $\mu$ g d'ADN présents à la fin de chaque intervalle de culture, et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \* = p<0,05 et \*\*\* = p<0,001.



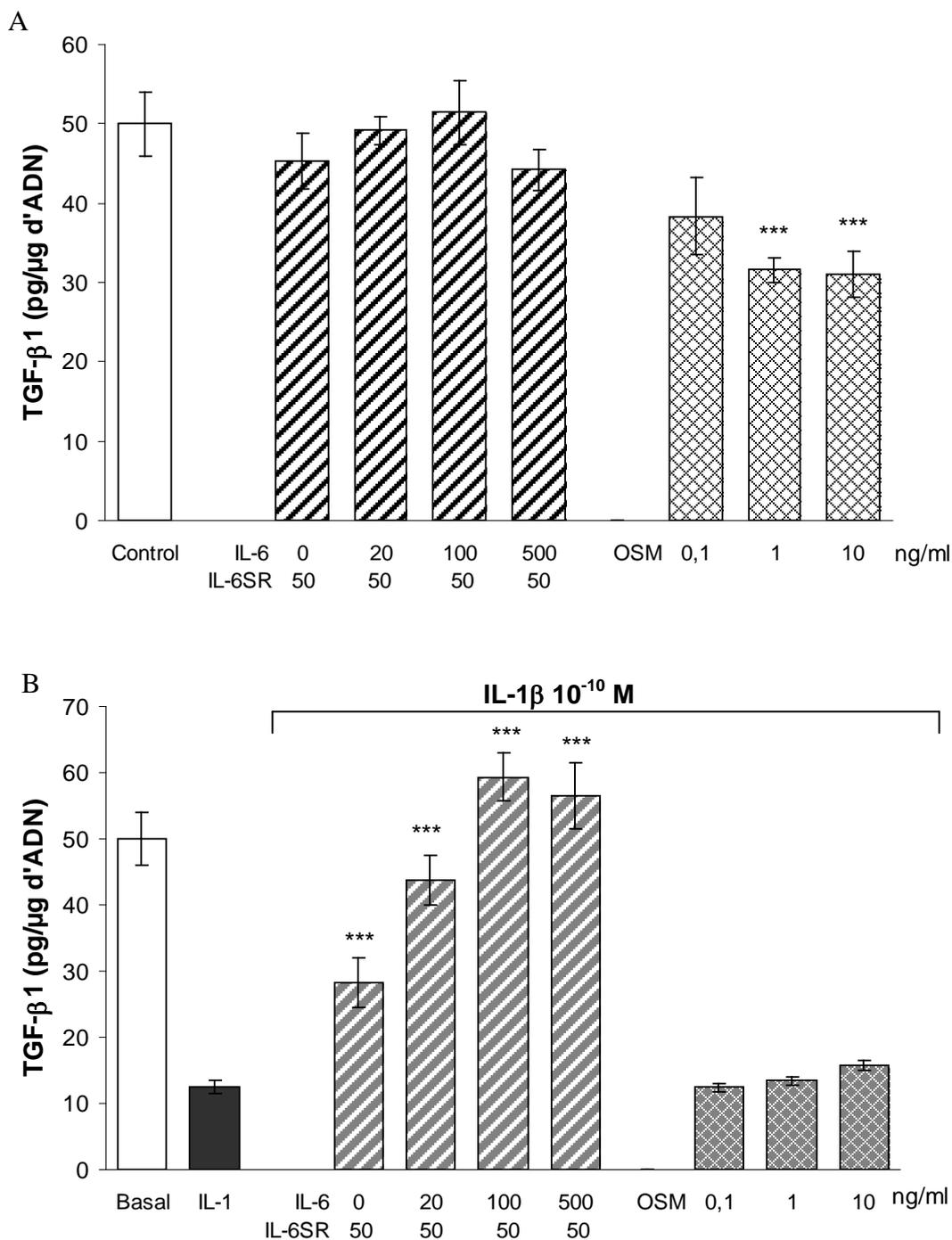
**Figure 42 :** Effets de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production totale cumulée de TIMP-1 par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate en présence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M. Les résultats sont exprimés en ng/ $\mu$ g d'ADN de TIMP-1 et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \* =  $p < 0,05$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.3.4. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de TGF- $\beta$ 1

La production basale de TGF- $\beta$ 1 par les chondrocytes n'était pas significativement modifiée par l'IL-6, et ce quelle que soit la concentration testée (figure 43A). L'OSM, par contre, diminuait de façon concentration-dépendante la production de TGF- $\beta$ 1 ( $r = -0,9794$  ;  $p = 0,02$ ).

Après 12 jours d'incubation, l'IL-1 $\beta$  (10<sup>-10</sup> M) inhibait de 75 % la production de TGF- $\beta$ 1. L'addition d'IL-6sR (50 ng/ml) s'opposait de façon significative à l'effet de l'IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ). L'addition d'IL-6 exogène (entre 20 et 500 ng/ml) restaurait complètement la production basale de TGF- $\beta$ 1 (figure 43B). Au contraire, l'OSM

n'avait pas d'effet significatif sur l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur le TGF- $\beta$ 1 (figure 43B).



**Figure 43 :** Effets de concentrations croissantes d'IL-6 et d'OSM sur la production totale cumulée de TGF- $\beta$ 1 en l'absence (A) ou en présence de  $10^{-10}$  M d'IL-1 $\beta$  (B) par les chondrocytes après 12 jours de culture en billes d'alginate. Les résultats sont exprimés en pg de TGF- $\beta$ 1 par  $\mu$ g d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.4. EFFETS DES IAS SUR LE METABOLISME DES CHONDROCYTES CULTIVES EN BILLES D'ALGINATE

#### 3.4.1. Influence des IAS sur le contenu en ADN et la viabilité cellulaire

En l'absence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M et aux concentrations comprises entre 0,625 et 40  $\mu$ g/ml, les IAS n'avaient pas d'effet significatif sur la quantité d'ADN (tableau 9).

Cependant, lorsque les IAS et l'IL-1 $\beta$  (10<sup>-10</sup> M) étaient ajoutés simultanément au milieu de culture, le contenu en ADN des cultures était diminué de façon significative ( $p < 0,05$  pour les concentrations de 0,625 et de 2,5  $\mu$ g/ml et  $p < 0,01$  pour les concentrations supérieures du mélange).

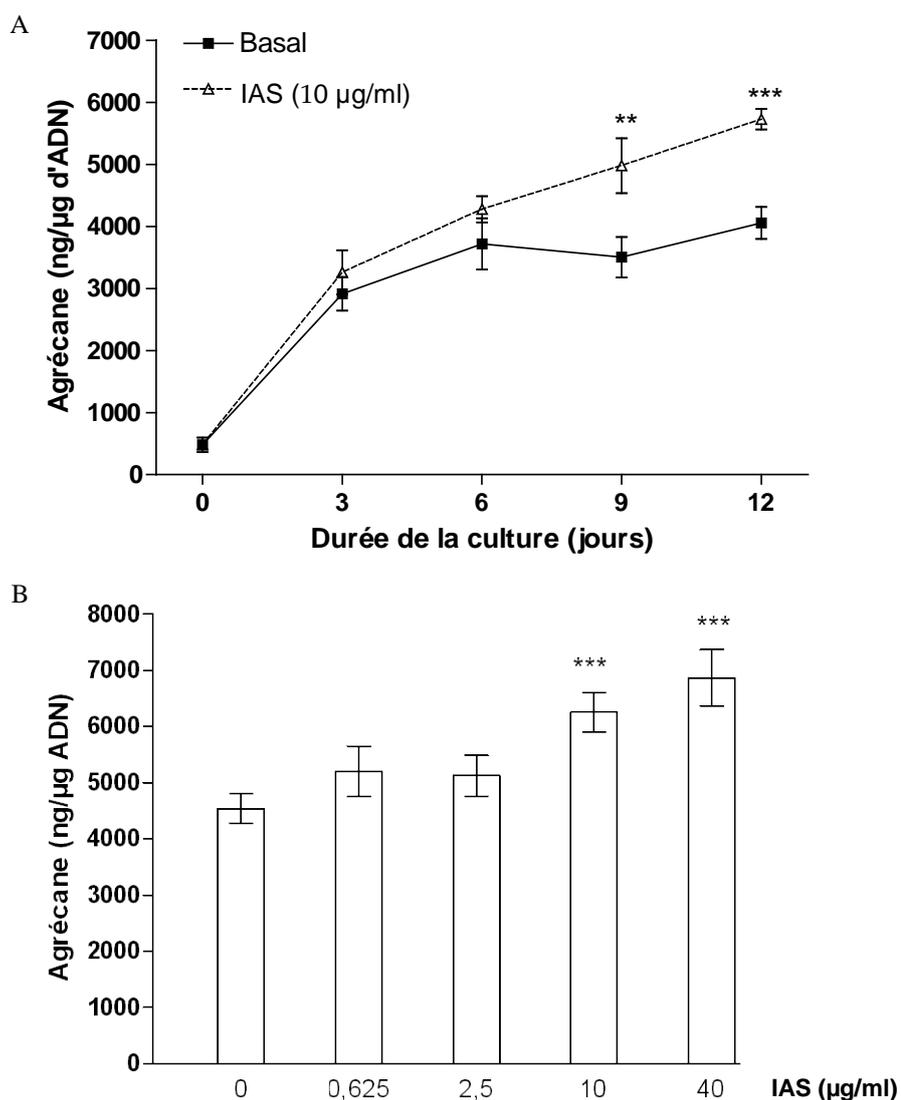
Substance testée	Basal	+ IL-1 $\beta$
Contrôle	4,43 $\pm$ 0,21	3,95 $\pm$ 0,15
IAS 0,625 $\mu$ g/ml	4,02 $\pm$ 0,68	3,85 $\pm$ 0,18 *
IAS 2,5 $\mu$ g/ml	4,36 $\pm$ 0,09	3,90 $\pm$ 0,07 *
IAS 10 $\mu$ g/ml	4,37 $\pm$ 0,18	3,68 $\pm$ 0,17 **
IAS 40 $\mu$ g/ml	4,12 $\pm$ 0,29	3,41 $\pm$ 0,18 **

**Tableau 9 :** Quantités d'ADN contenues dans les billes d'alginate au terme de 12 jours de culture, en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M et/ou des IAS. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ g d'ADN par puits et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \* =  $p < 0,05$  et \*\* =  $p < 0,01$  entre la condition testée et le contrôle basal.

Les IAS, aux concentrations testées, ne modifiaient pas significativement la mortalité cellulaire estimée par la quantité de LDH libérée dans le milieu de culture (résultats non montrés).

### 3.4.2. Influence des IAS sur la production d'agrécane

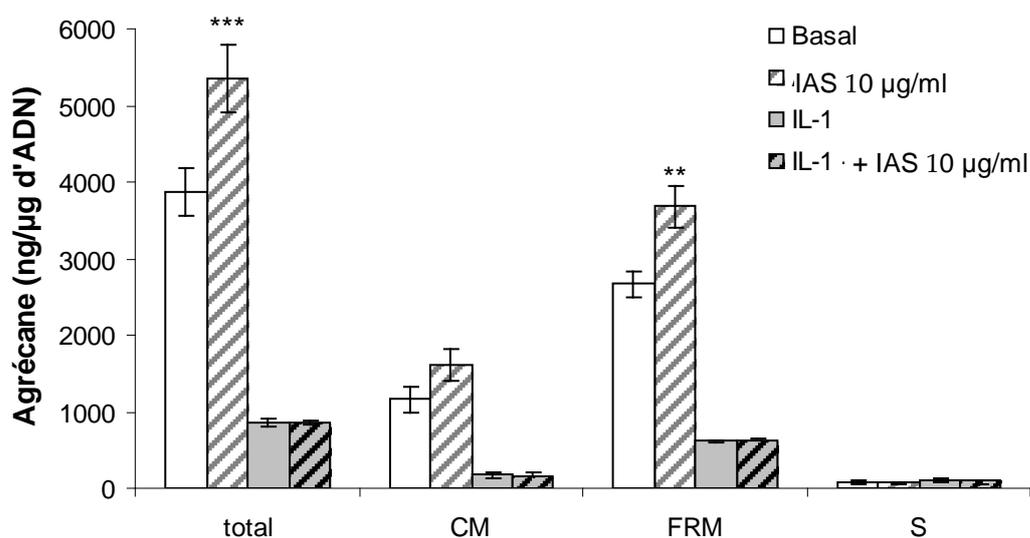
Dans les conditions basales, la quantité d'agrécane accumulée au sein des billes d'alginate augmentait durant les 6 premiers jours de culture. Ensuite, la teneur en agrécane des billes restait constante jusqu'au terme de la culture. En présence de 10  $\mu\text{g/ml}$  d'IAS, la quantité d'agrécane dans les billes d'alginate était significativement augmentée après 9 et 12 jours de culture (figure 44A). Après 12 jours de culture, l'effet des IAS sur la synthèse d'agrécane était dépendant de la concentration (figure 44B,  $r = 0,8803$  ;  $p < 0,05$ ). A la concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$ , les IAS augmentaient la quantité de d'agrécane dans les billes d'alginate de 40 % ( $p < 0,001$ ).



**Figure 44** : A : Cinétique de la production d'agrécane en présence ou non de 10  $\mu\text{g/ml}$  d'IAS. B : Effet de concentrations croissantes d'IAS sur la production totale d'agrécane après 12 jours de culture. Les résultats sont exprimés en ng d'agrécane par  $\mu\text{g}$  d'ADN, et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

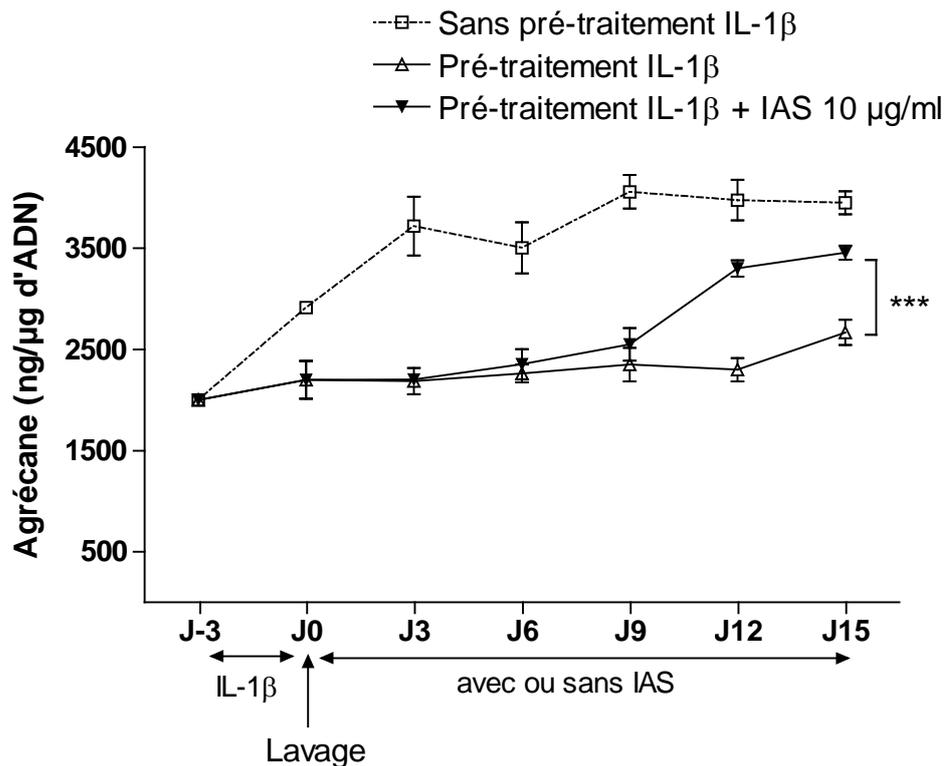
L'augmentation d'agrécane était observée essentiellement dans la zone interterritoriale de la matrice extracellulaire (figure 45).

En présence d'IL-1 $\beta$ , les IAS ne modifiaient pas significativement la synthèse d'agrécane (figure 45).



**Figure 45 :** Effet des IAS (10  $\mu$ g/ml) sur la distribution de l'agrécane dans les différents compartiments de la culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M. Les résultats sont exprimés en ng d'agrécane par  $\mu$ g d'ADN présents à la fin des 12 jours de culture (CM = matrice péricellulaire et territoriale ; FRM = matrice interterritoriale ; S = milieu de culture et total = la somme des compartiments) et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Par contre, les IAS restauraient la production d'agrécane, après une pré-incubation des chondrocytes pendant 3 jours avec de l'IL-1 $\beta$  (figure 46).

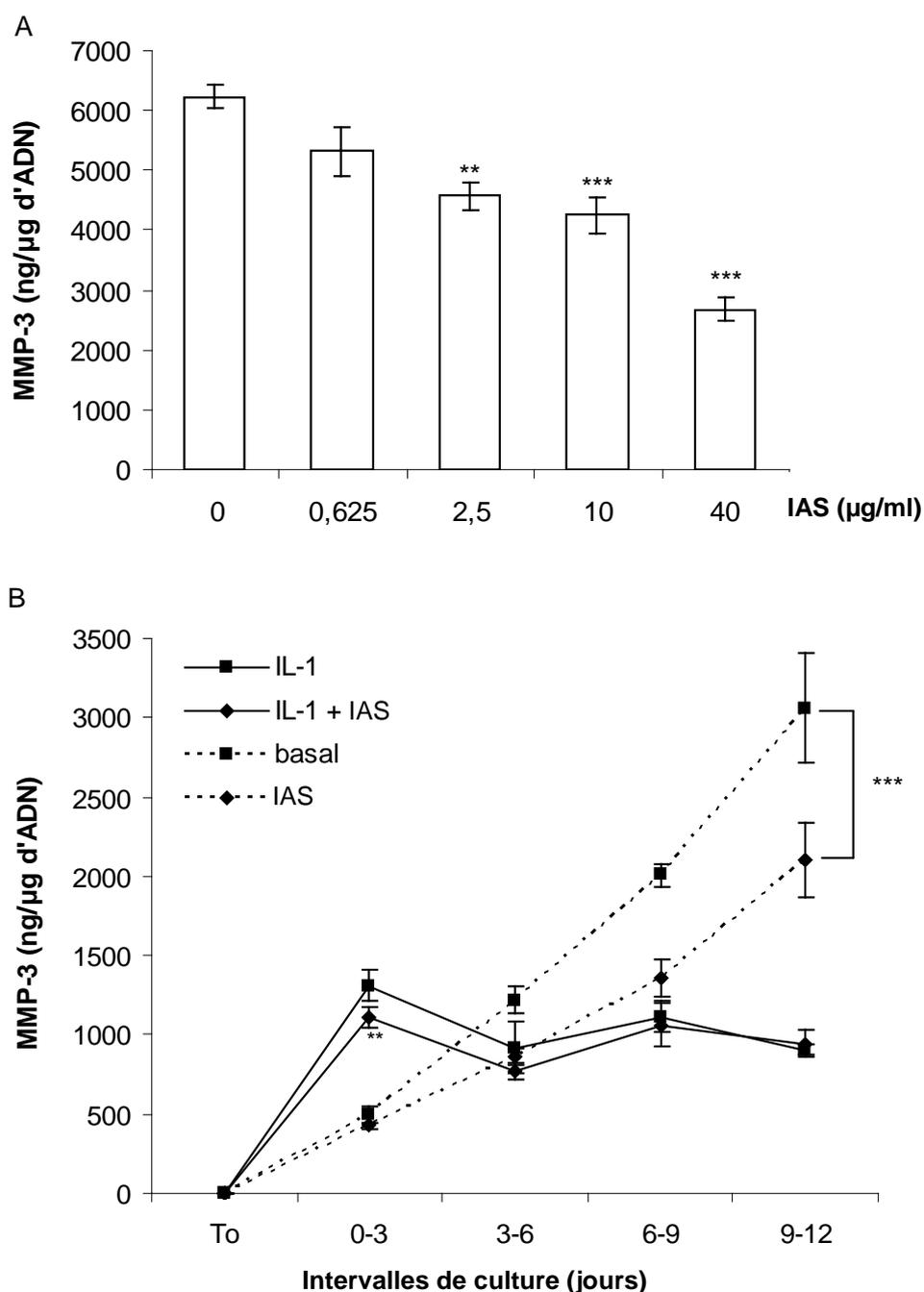


**Figure 46** : Effet des IAS (10 µg/ml) sur la production totale d'agrécane après une incubation de 72h avec  $10^{-10}$  M d'IL-1 $\beta$ . Les résultats sont exprimés en ng d'agrécane par µg d'ADN présents dans les différents compartiments de la culture, et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.4.3. Influence des IAS sur la production de MMP-3 et de TIMP-1

Dans les conditions basales, les IAS réduisaient de manière concentration-dépendante la production de MMP-3 par les chondrocytes cultivés en billes d'alginate ( $r = -0,9015$  ;  $p < 0,03$ , figure 47A). L'effet inhibiteur des IAS (10 µg/ml) était significatif dès le 3<sup>e</sup> jour de culture. Après 12 jours de culture, la production basale cumulée de MMP-3 était diminuée en moyenne de 30 % par 10 µg/ml d'IAS.

En présence d'IL-1 $\beta$ , les IAS diminuaient de façon significative la production de MMP-3 après 3 jours d'incubation. Ensuite, Les IAS n'influençaient pas significativement la production de MMP-3 des chondrocytes cultivés en présence d'IL-1 $\beta$  (figure 47B).



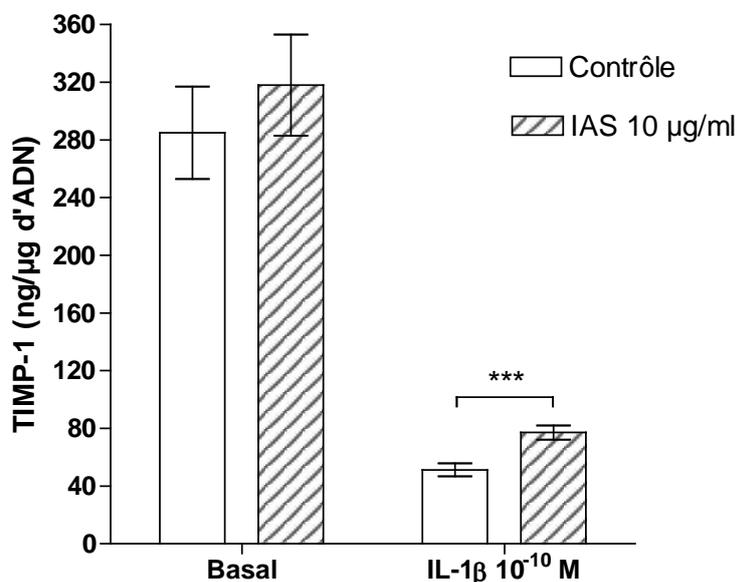
**Figure 47** : Effet des IAS sur la production de MMP-3.

A : Effet de concentrations croissantes d'IAS sur la production totale de MMP-3 durant 12 jours de culture.

B : Production totale de MMP-3 en présence ou non de  $10^{-10}$  M d'IL-1 $\beta$  et de 10  $\mu$ g/ml d'IAS durant chaque intervalle de culture.

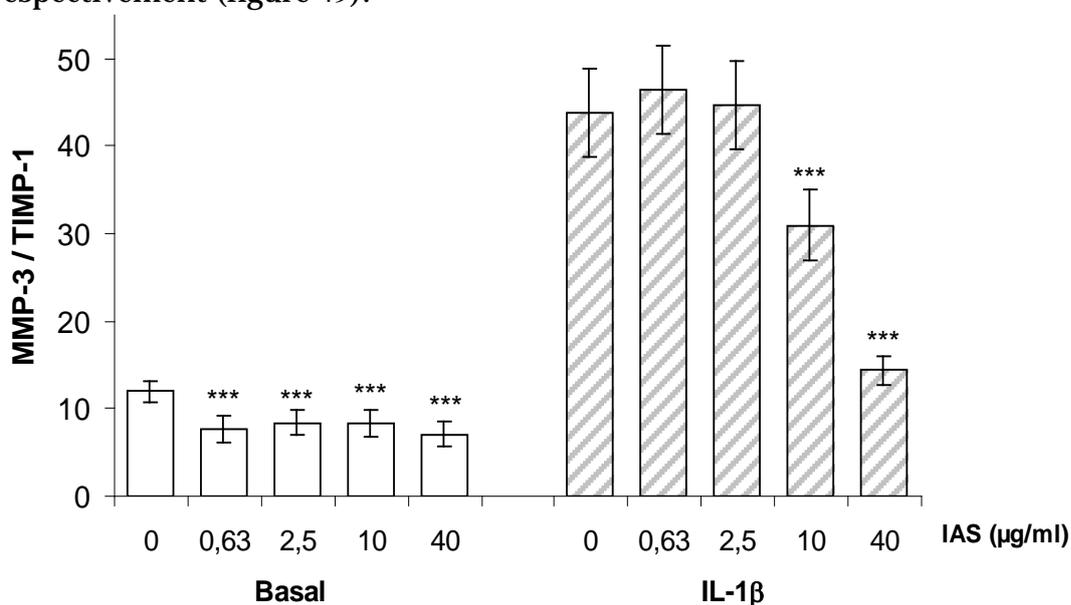
Les résultats sont exprimés en ng de MMP-3 par  $\mu$ g d'ADN, et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$

Les IAS ne modifiaient pas significativement la production basale de TIMP-1 (figure 48). En présence d'IL-1 $\beta$ , les IAS s'opposaient partiellement à l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la production de TIMP-1.



**Figure 48 :** Effet des IAS (10 μg/ml) sur la production totale de TIMP-1 au terme de 12 jours de culture, en présence ou non d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M. Les résultats sont exprimés en ng de TIMP-1 par μg d'ADN, et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\*\* = p<0,001.

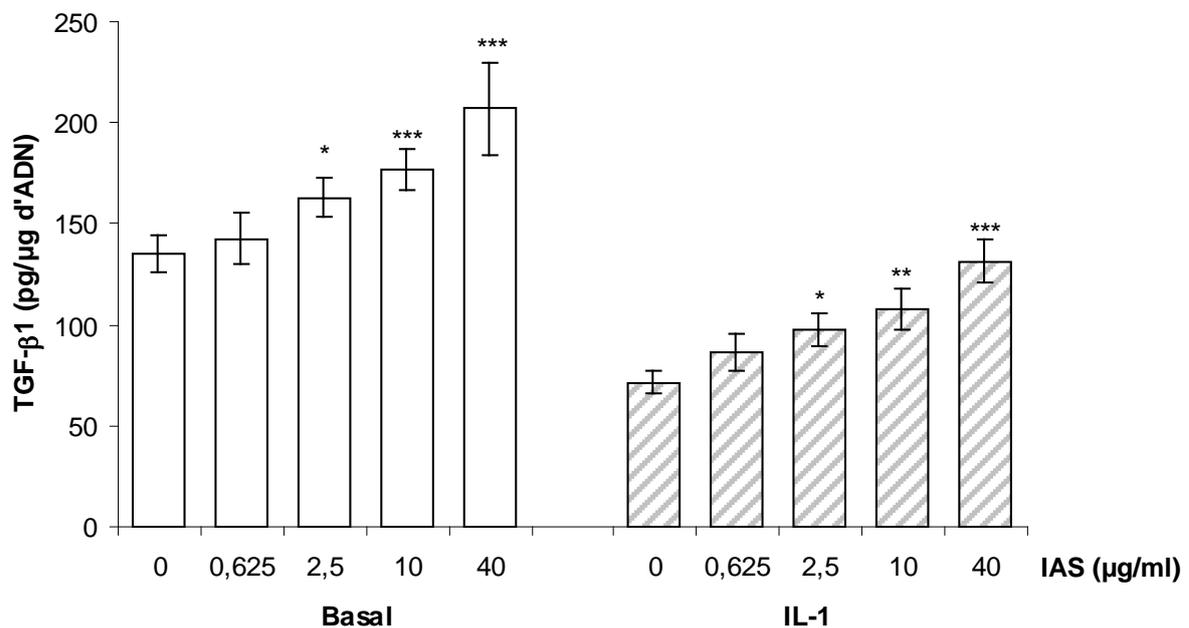
Dans les conditions basales, le rapport molaire MMP-3/TIMP-1 calculé après 12 jours d'incubation était diminué d'environ 35 % par les IAS et ce, quelle que soit la concentration testée. En présence d'IL-1 $\beta$ , le rapport MMP-3/TIMP-1 était multiplié par 2,3. Aux concentrations de 10 et 40 μg/ml, les IAS réduisait le rapport de 32 et 40 % respectivement (figure 49).



**Figure 49 :** Evolution du rapport molaire MMP-3/TIMP-1 en fonction de la concentration en IAS, en présence ou non d'IL-1 $\beta$  10<sup>-10</sup> M. Les résultats sont exprimés en rapport molaire calculé à l'aide des valeurs cumulées des productions de MMP-3 et de TIMP-1 à la fin des 12 jours de culture et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\*\* = p<0,001 entre les groupes contrôles et ceux traités avec des IAS.

### 3.4.4. Influence des IAS sur la production de TGF- $\beta$ 1

Dans les conditions basales, les IAS augmentaient de manière concentration-dépendante ( $r = 0,91$ ,  $p = 0,03$ ) la production de TGF- $\beta$ 1 (figure 50). A la concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$ , les IAS augmentaient de 31 % la production de TGF- $\beta$ 1. L'IL-1 $\beta$  inhibait très significativement la production de TGF- $\beta$ 1. Lorsque l'IL-1 $\beta$  et les IAS étaient ajoutés simultanément, l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la production de TGF- $\beta$ 1 était réduit de façon concentration-dépendante par les IAS ( $r = 0,93$ ,  $p = 0,02$ ).



**Figure 50 :** Effet de concentrations croissantes d'IAS sur la production totale de TGF- $\beta$ 1 après 12 jours de culture, en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$   $10^{-10}$  M.

Les résultats sont exprimés en pg de TGF- $\beta$ 1 par  $\mu\text{g}$  d'ADN, et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$

## 4. Discussion

La première partie de ce mémoire était consacrée à la mise au point et la validation d'un modèle de culture de chondrocytes articulaires humains en billes d'alginate. Nous avons également décrit les effets de 3 cytokines, directement impliquées dans la pathogénie de l'arthrose (l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'OSM), et d'un médicament utilisé dans le traitement de cette pathologie (les IAS) sur le métabolisme des chondrocytes. Il ressort de ce travail expérimental quatre observations que nous avons choisi de commenter et de discuter.

- Lorsqu'ils sont cultivés en billes d'alginate, les chondrocytes humains restent différenciés pendant une longue période et synthétisent une matrice dont l'organisation est semblable à celle du cartilage *in vivo*.
- L'IL-1 $\beta$  provoque une série de déséquilibres métaboliques favorables à la dégradation de la matrice cartilagineuse.
- L'IL-6 et l'OSM jouent un rôle important dans la régulation de la dégradation de la matrice cartilagineuse.
- Les IAS stimulent la production d'agrécane et de TGF- $\beta$ 1, et diminuent le rapport MMP-3/TIMP-1.

### **Les chondrocytes humains conservent leur phénotype cartilagineux en culture en billes d'alginate.**

Les chondrocytes expriment un phénotype particulier appelé aussi phénotype cartilagineux. Il se définit par la forme arrondie des cellules, la synthèse d'agrécane et de collagène de type II, l'absence de synthèse de collagènes de type I et III, et une activité mitotique faible par rapport à d'autres types cellulaires. Nos travaux montrent que les chondrocytes cultivés en billes d'alginate conservent l'ensemble de ces caractéristiques après 12 jours de culture. D'autres auteurs ont montré que les chondrocytes restaient différenciés pendant 8 mois en billes d'alginate<sup>252, 255, 256</sup>. En billes d'alginate, les chondrocytes conservent une forme sphérique et s'installent dans des logettes formées au sein de la matrice d'alginate. Ils synthétisent du collagène de type II et de l'agrécane, deux molécules spécifiques du cartilage hyalin. La synthèse d'ADN a lieu durant le premier jour de culture. Ensuite, la synthèse d'ADN diminue

progressivement, pour finalement devenir insignifiante après 12 jours de culture. Toutefois, l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine mesurée durant les 24 premières heures de culture (1,6 nCi/ $\mu\text{g}$  d'ADN) est très faible par rapport à celle des lymphocytes (16 à 40 nCi/ $\mu\text{g}$  d'ADN après 4 heures d'incubation). Ces résultats indiquent que l'activité mitotique des chondrocytes est très faible dans nos conditions de culture. En 1988, Bassleer et ses collaborateurs ont observé un comportement semblable des chondrocytes lorsqu'ils étaient placés en suspension en phase liquide sous agitation constante<sup>243, 266</sup>. Dans ces conditions, les chondrocytes formaient spontanément des agrégats et s'entouraient progressivement d'une matrice extracellulaire. Un pic d'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine était observé au huitième jour de culture. Ensuite, l'activité mitotique diminuait au fur à mesure que la matrice s'organisait autour des cellules. Il est donc possible que l'accumulation progressive de matrice autour du chondrocyte soit responsable de l'inhibition progressive de leur activité mitotique. En effet, les chondrocytes possèdent des récepteurs ( $\text{CD}_{44}$  et des intégrines) pour les molécules matricielles<sup>267, 268</sup>. Par exemple, la fixation de l'acide hyaluronique au récepteur  $\text{CD}_{44}$  s'accompagne d'une augmentation de l'activité mitotique des chondrocytes à la concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mais d'une inhibition à la concentration de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>269</sup>. Il est donc vraisemblable que la liaison des chondrocytes avec la matrice extracellulaire environnante régule l'activité mitotique des chondrocytes.

Les chondrocytes cultivés en billes d'alginate produisent des molécules d'agrécan qui sont caractéristiques du cartilage hyalin. La synthèse a lieu essentiellement pendant les 6 premiers jours de culture. Notre étude montre que la majorité des molécules d'agrécan synthétisées par les chondrocytes est immobilisée dans la bille d'alginate. Après 12 jours de culture, seulement 2 % de la production d'agrécan sont libérés dans le milieu de culture. Au sein de la bille d'alginate, les molécules d'agrécan s'accumulent essentiellement dans la matrice interterritoriale (fraction FRM; 74 % après 12 jours de culture). Cependant, l'analyse du contenu en agrécan des fractions FRM et CM suggère la présence d'un mouvement des molécules d'agrécan de la matrice péricellulaire (CM) vers la matrice interterritoriale (FRM). Pendant les 6 premiers jours de culture, la quantité d'agrécan dans les compartiments CM et FRM de la bille d'alginate augmentent de façon parallèle. Ensuite, le contenu de la fraction CM diminue et celui de fraction FRM augmente

alors que le contenu total en agrécane de la bille d'alginate reste constant. Nous pouvons conclure de cette analyse qu'une partie des molécules d'agrécane produites par les chondrocytes migre de la matrice péri-cellulaire vers la matrice interterritoriale. Cette observation confirme l'hypothèse émise préalablement par d'autres auteurs<sup>252, 260, 270</sup>. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les chondrocytes en billes d'alginate synthétisent deux sortes de molécules d'agrécane qui se distinguent par leur affinité pour la molécule d'acide hyaluronique. Les molécules d'agrécane avec une affinité élevée pour l'acide hyaluronique forment rapidement des complexes de haut poids moléculaire avec l'acide hyaluronique et s'immobilisent dans la matrice péri-cellulaire. Par contre, les molécules d'agrécane avec une faible affinité pour l'acide hyaluronique, dites "immatures", migrent vers la matrice interterritoriale. Au cours de cette migration, les molécules d'agrécane immatures subissent une maturation qui accroît leur affinité pour l'acide hyaluronique.

### **L'IL-1 $\beta$ provoque des déséquilibres métaboliques favorables à la dégradation du cartilage articulaire et au développement de la réaction inflammatoire.**

Dans ce travail, nous avons également étudié le comportement des chondrocytes à des traitements successifs (4 administrations en 12 jours) avec de l'IL-1 $\beta$ .

Nous avons réalisé les observations suivantes :

- L'IL-1 $\beta$  ne modifie pas le contenu en ADN des cultures et n'induit pas la libération de LDH, même après 12 jours d'incubation. Ces observations suggèrent que le traitement à l'IL-1 $\beta$  ne modifie pas le nombre de cellules contenues dans les billes d'alginate, ni leur viabilité. Les variations métaboliques enregistrées en présence d'IL-1 $\beta$  ne sont donc pas la conséquence d'une modification du nombre de cellules.

- L'IL-1 $\beta$  bloque la synthèse d'agrécane et diminue la production de TGF- $\beta$ 1 par les chondrocytes. Les TGF- $\beta$  sont des facteurs de croissance très actifs sur le métabolisme du cartilage. Ils stimulent la synthèse d'agrécane et diminuent la synthèse des MMP-1 et -3 par les chondrocytes<sup>190</sup>. Ils sont également capables de s'opposer aux effets délétères de l'IL-1 $\beta$  sur le cartilage<sup>271-275</sup>. L'inhibition de la synthèse de TGF- $\beta$ 1 par le chondrocyte est sans doute un des mécanismes par lequel l'IL-1 $\beta$  exerce une action délétère sur le cartilage.

- L'IL-1 $\beta$  augmente le rapport molaire MMP-3/TIMP-1. Après 12 jours de culture, ce rapport est égal à 22 dans les conditions basales, mais il atteint une valeur de 51 en présence d'IL-1 $\beta$ . Par comparaison, ce rapport est égal à 9 dans un milieu de culture conditionné par des chondrocytes normaux (donneur sain âgé de 18 ans). Un rapport MMP-3/TIMP-1 anormalement élevé a également été observé dans le cartilage arthrosique et est favorable à la dégradation de la matrice extracellulaire<sup>88</sup>.

Dans nos conditions expérimentales, l'augmentation du rapport MMP-3/TIMP-1 est le résultat d'une forte inhibition de la synthèse de TIMP-1 par l'IL-1 $\beta$ , et non la conséquence d'une augmentation de la synthèse de MMP-3. En effet, l'IL-1 $\beta$  augmente la synthèse de MMP-3 uniquement pendant les 3 premiers jours de traitement. Ensuite, IL-1 $\beta$  inhibe la production de MMP-3. Au terme de 12 jours de culture et de 4 administrations successives d'IL-1 $\beta$ , les chondrocytes ont produit 2 fois moins de MMP-3 que les chondrocytes non traités par l'IL-1 $\beta$ . Ces résultats concordent avec ceux publiés récemment par Lee et collaborateurs<sup>276</sup>, qui montrent qu'après une administration répétée d'IL-1 $\beta$ , les chondrocytes produisent moins de MMP-13 que les chondrocytes témoins, entre la deuxième et la sixième administration. Ensuite, la synthèse de MMP-13 est à nouveau augmentée par l'IL-1 $\beta$ . Nous n'avons pas d'explication à donner à ce phénomène et nous n'avons pas trouvé d'autre publication le décrivant. Dans la majorité des études, l'IL-1 $\beta$  n'est administrée qu'une seule fois et pendant une courte période (jusqu'à 4 jours). Dès lors, nous devons nous contenter de quelques hypothèses basées sur des données de la littérature. Il est possible que l'inhibition de la synthèse de MMP-3 soit secondaire à l'action d'un autre facteur synthétisé par le chondrocyte en réponse à l'IL-1 $\beta$ . Parmi les nombreux facteurs sécrétés par les chondrocytes activés, le 'NO est un candidat potentiel à ce rôle. Le 'NO est un médiateur de la stimulation de la synthèse de MMP-3 par l'IL-1 $\beta$ <sup>277, 278</sup>. Dans notre modèle de culture et dans celui de Lee et collaborateurs, l'effet stimulant de l'IL-1 $\beta$  sur la production de 'NO disparaît après la seconde administration<sup>276, 279</sup>. Dès lors, la diminution de production de MMP-3 induite par l'IL-1 $\beta$  pourrait être secondaire à la chute de 'NO.

## **L'IL-6 et l'OSM jouent un rôle important dans la régulation de la dégradation de la matrice cartilagineuse.**

*In vitro*, l'IL-1 $\beta$  est considéré comme la cytokine avec l'activité biologique la plus importante sur le métabolisme du cartilage. Elle favorise la production d'enzymes protéolytiques et inhibe la production des constituants matriciels<sup>280</sup>. Néanmoins, des travaux récents ont montré que l'IL-1 $\beta$  ajoutée seule induisait une dégradation très partielle d'explants de cartilage. Celle-ci était limitée au clivage des agrécanes. Par contre, lorsque l'IL-1 était ajoutée au milieu de culture simultanément avec de l'OSM ou de l'IL-6, la dégradation des explants de cartilage était plus rapide et touchait à la fois les molécules d'agrécanes et le réseau de collagène<sup>139, 281</sup>. Ces résultats indiquent clairement que l'IL-6 et l'OSM jouent un rôle primordial dans la dégradation du cartilage. Dans ce travail nous décrivons pour la première fois les effets de l'OSM et de l'IL-6 sur le métabolisme des chondrocytes humains cultivés en billes d'alginate<sup>282</sup>. L'OSM, mais pas l'IL-6, inhibe de manière concentration-dépendante la synthèse d'agrécane et diminue la proportion d'agrécane accumulée dans la matrice interterritoriale (FRM). En parallèle, l'OSM diminue de façon concentration-dépendante la synthèse du TGF- $\beta$ 1, indiquant que la diminution de production d'agrécane par l'OSM pourrait être le résultat d'une réduction de la production du TGF- $\beta$ 1. Au cours du processus arthrosique, la déplétion en agrécane de la matrice extracellulaire n'est pas uniquement la conséquence d'une diminution de sa synthèse mais résulte également d'une augmentation de sa dégradation, notamment par la MMP-3. L'activité de la MMP-3 est directement contrôlée par des inhibiteurs naturels, les TIMP<sup>283</sup>. Un déséquilibre quantitatif entre les MMP et les TIMP est considéré comme un facteur déterminant de la sévérité des lésions du cartilage<sup>284</sup>. Dans nos conditions expérimentales, l'OSM augmente de 20 % la production basale de MMP-3, mais double la production de TIMP-1. En conséquence, le rapport molaire MMP-3/TIMP-1 est diminué dans les cultures traitées par l'OSM. A l'inverse, l'IL-6 ne modifie pas le rapport MMP-3/TIMP-1.

Dans un paragraphe précédent, nous avons décrit les effets de l'IL-1 $\beta$  sur la production de MMP-3. L'IL-1 $\beta$  stimule la production de MMP-3 durant les 3 premiers jours de culture, et ensuite la diminue. En parallèle, l'IL-1 $\beta$  diminue la production de TIMP-1, et ce quelle que soit la durée de la culture. Il en résulte une augmentation du rapport MMP-3/TIMP-1. Durant les 3 premiers jours de culture, ni l'IL-6 ni l'OSM ne

modifie l'effet stimulant de l'IL-1 $\beta$  sur la production de MMP-3. Quand l'incubation est prolongée au-delà des 3 premiers jours de culture, l'IL-6 agit en synergie avec l'IL-1 $\beta$  pour inhiber la synthèse de MMP-3 tandis que l'OSM s'oppose à cet effet. De nouveau, l'OSM diminue de façon importante le rapport molaire MMP-3/TIMP-1, alors que l'IL-6 ne l'influence pas.

En conclusion, il apparaît que l'OSM, mais pas l'IL-6, est capable d'interférer avec le métabolisme des agrécanes en diminuant à la fois leur synthèse et leur dégradation. Dans la pathogénie de l'arthrose, les effets de l'OSM sur le chondrocyte pourraient favoriser le retour à l'homéostasie.

### **Les IAS stimulent la production d'agrécane et de TGF- $\beta$ 1, et diminuent le rapport MMP-3/TIMP-1.**

Les IAS sont utilisés dans le traitement de l'arthrose depuis de nombreuses années. Ce médicament a démontré son efficacité sur la symptomatologie de l'arthrose du genou et de la hanche<sup>236</sup>. Par contre, son action sur les changements structuraux associés à l'arthrose demeure hypothétique, même si récemment une étude radiologique pilote a montré un effet bénéfique des IAS sur un sous-groupe de patients présentant un pincement important de l'interligne articulaire coxo-fémoral ( $\leq 2,45$  mm au début de l'étude) au terme de 2 ans de traitement<sup>237</sup>. Sur ce point, notre étude apporte des enseignements nouveaux et supporte l'hypothèse selon laquelle les IAS exerceraient une action structurelle sur le cartilage<sup>285</sup>. En effet, nous avons démontré que les IAS augmentent la production d'agrécane, un composant majeur de la matrice cartilagineuse. De plus, il favorise la restauration de la synthèse d'agrécane après un traitement par l'IL-1 $\beta$ . Nous avons également observé que l'effet des IAS sur la production d'agrécane est différé et n'apparaît qu'après une période d'incubation de 6 jours. Cette observation suggère que cet effet pourrait être secondaire à la sécrétion par les chondrocytes d'un médiateur intermédiaire. Le TGF- $\beta$ 1 pourrait exercer ce rôle. En effet, nous avons démontré que les IAS augmentent la synthèse de TGF- $\beta$ 1 par les chondrocytes. Nos résultats corroborent ceux publiés par Boumédiène et collaborateurs en 1999. Ces chercheurs ont montré que les IAS stimulaient la synthèse de TGF- $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 par des chondrocytes bovins cultivés en monocouche<sup>232</sup>.

D'autre part, les IAS diminuent la production de MMP-3 par les chondrocytes arthrosiques et s'opposent partiellement à l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse de TIMP-1. Nous pouvons conclure de ces résultats que les IAS diminuent la synthèse, par les chondrocytes, de certains facteurs cataboliques qui contribuent à l'initiation et au développement des lésions du cartilage dans l'arthrose. Ces observations permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action de ce médicament en clinique humaine et apportent une série d'éléments nouveaux plaidant en faveur d'une action structurelle de cette drogue sur le cartilage.

En conclusion, le modèle de culture en bille d'alginate est un modèle pertinent pour l'étude du métabolisme des chondrocytes. Il permet l'analyse qualitative et quantitative de la matrice extracellulaire. Ce modèle sera utilisé ultérieurement en co-culture avec des ostéoblastes.

# 1. Introduction

**P**lusieurs études ont récemment démontré que le phénotype des ostéoblastes sous-chondraux était modifié dans l'arthrose. Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques produisent plus d'OC, de PAL, d'IGF-1, de TGF- $\beta$ 1, de HGF et d'uPA que les ostéoblastes sains<sup>10-13, 15</sup>. De plus, le métabolisme du collagène de type I est modifié. Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques synthétisent davantage la forme homotrimérique  $\alpha$ 1 du collagène de type I. Cette forme de collagène possède des propriétés mécaniques et une capacité de minéralisation plus faibles que la forme hétérotrimérique  $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$ <sup>286</sup>.

Cette partie de notre travail a été consacrée à la mise au point d'un modèle de culture d'ostéoblastes sous-chondraux, ainsi qu'à la comparaison du phénotype des ostéoblastes provenant des zones sclérosées (SC) à celui des ostéoblastes des zones non sclérosées (NSC) de l'os sous-chondral arthrosique.

Nous avons également étudié les effets de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des ostéoblastes. Nous nous sommes intéressés à ces cytokines, car plusieurs études ont montré qu'elles étaient impliquées dans la communication ostéoblastes/ostéoclastes et qu'elles régulaient le remodelage osseux<sup>120, 123, 142, 150, 161, 164</sup>. Elles pourraient être impliquées dans l'initiation et/ou la progression de la sclérose sous-chondrale chez les patients arthrosiques. L'IL-6, en présence de son récepteur soluble (IL-6sR), augmente l'expression de MMP-13 et d'IGF-1 par les ostéoblastes<sup>147, 149</sup>. L'IL-6 stimule aussi la résorption osseuse en augmentant le recrutement et la différenciation des pré-ostéoclastes<sup>145</sup>. L'OSM stimule la prolifération des ostéoblastes murins en culture primaire et la synthèse par ces cellules du collagène de type I et d'IL-6. Par contre, elle inhibe la synthèse de PAL<sup>164</sup>. L'IL-1 $\beta$  diminue la synthèse d'OC par les ostéoblastes de rat alors qu'elle n'a pas d'effet sur l'activité PAL<sup>287</sup>. Elle augmente aussi la production de PTHrP, de PGE<sub>2</sub>, d'IL-6 et de l'uPA et diminue celle de TGF- $\beta$ 1 par les ostéoblastes humains en culture<sup>121, 123, 288</sup>.

Enfin, nous avons étudié les effets des IAS. Notre but était de vérifier si ce médicament, utilisé dans le traitement de l'arthrose et actif sur le chondrocyte, pouvait également influencer le métabolisme des ostéoblastes.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. DESCRIPTION DES CULTURES D'OSTEOBLASTES SOUS-CHONDRAUX HUMAINS

#### 2.1.1. Isolement des ostéoblastes de l'os sous-chondral

La plaque osseuse sous-chondrale était prélevée au niveau des condyles fémoraux. Le cartilage articulaire et l'os trabéculaire étaient minutieusement enlevés, de manière à ne conserver que l'os sous-chondral. Les zones SC et NSC de l'os sous-chondral étaient séparées sous microscope à l'aide d'une pince et d'un scalpel, puis fragmentées en morceaux d'environ 2 mm<sup>2</sup>. L'os sous-chondral était considéré comme SC lorsque son épaisseur était supérieure à 2 mm et NSC lorsque son épaisseur était inférieure à 1 mm. Les fragments d'os sous-chondral étaient ensuite lavés à plusieurs reprises avec du DMEM, et incubés avec de l'hyaluronidase et de la collagénase afin d'éliminer le cartilage et la moelle hématopoïétique résiduels. Dans cette étape, les fragments osseux étaient incubés à 37°C sous agitation constante pendant 20 min avec de l'hyaluronidase [type IV-S, 0,5 mg/ml], puis avec de la collagénase clostridiale [type IA, 0,6 mg/ml] pendant successivement 35 et 240 min. Notons que 3 grammes d'os étaient placés dans 20 ml de la solution enzymatique. Les enzymes étaient solubilisées dans du « milieu de base ». Rappelons que celui-ci était composé de DMEM contenant 10 mM d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Lors de la première période d'incubation avec la collagénase, 5 µg/ml de polymyxine, 10 µg/ml de gentamycine et 10 µg/ml de vancomycine étaient ajoutés au milieu de base.

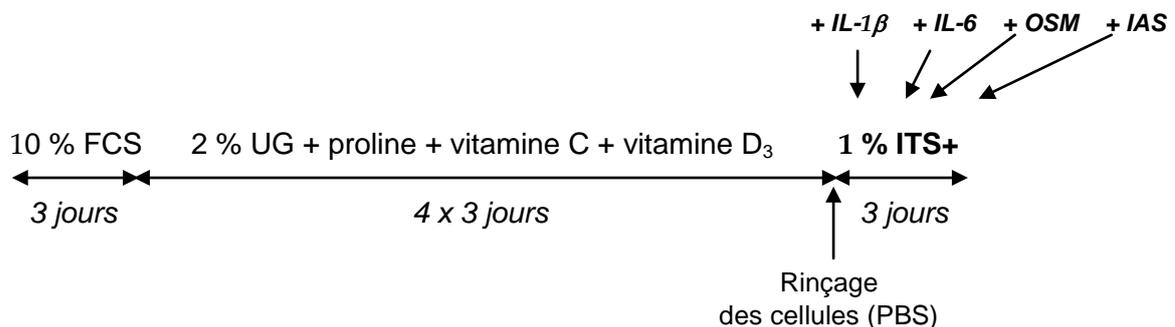
Ensuite, les fragments d'os étaient rincés plusieurs fois avec le milieu de base et placés dans des boîtes de culture (T-flask, *Nunc, Bruxelles, Belgique*) de 75 cm<sup>2</sup> ( $\pm$  1 g d'os par boîte et par 25 ml de milieu nutritif). Le milieu nutritif était composé de milieu de base contenant 15 % de sérum foetal bovin (FBS, « south american origin » *Cambrex, Verviers, Belgique*). Il était renouvelé tous les 3 jours jusqu'à ce que les cellules sortent des explants. Dès l'apparition des cellules, environ une semaine plus tard, le pourcentage de FBS du milieu nutritif était réduit à 10 %.

Après 3 semaines de culture, les ostéoblastes étaient à confluence. A ce stade, les fragments d'os étaient enlevés, les cellules rincées plusieurs fois avec du PBS, et

ensuite détachées par l'addition d'une solution 0,125 % trypsine - 0,5 mM EDTA (éthylène diamine tétra acétate, *Invitrogen, Merelbeke, Belgique*) pendant 5 min à 37°C. Les cellules étaient ensuite recueillies par centrifugation (150 g, 5 min à température ambiante), lavées, comptées etensemencées dans des plaques de culture 24 puits, à la concentration de 50.000 cellules /ml et par puits, dans un milieu de base contenant 10 % de FBS.

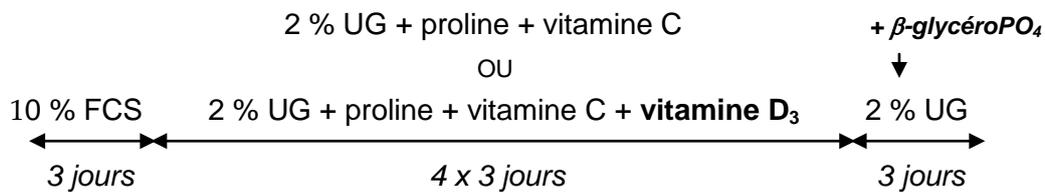
### 2.1.2. Culture des ostéoblastes

Après 3 jours de culture, le milieu nutritif (milieu de base contenant 10 % de FBS) était remplacé par un milieu nutritif composé du milieu de base, de 2 % (v/v) d'UG, de 20 µg/ml de proline, de 50 µg/ml d'acide ascorbique et de  $10^{-8}$  M de  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub> (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*). Ce milieu de culture était renouvelé tous les 3 jours pendant 12 jours. Ensuite, les ostéoblastes étaient rincés 2 fois avec du PBS et cultivés pendant 3 jours dans un milieu de base enrichi avec 1 % (v/v) d'ITS+, 20 µg/ml de proline et 50 µg/ml d'acide ascorbique en présence ou non de 1,7 ng/ml d'IL-1β, de 100 ng/ml d'IL-6 et de 50 ng/ml d'IL-6sR, de 10 ng/ml d'OSM ou de 10 µg/ml d'IAS (sous la forme d'un mélange composé de 1/3 d'insaponifiable d'avocat et de 2/3 d'insaponifiable de soja). Les IAS étaient préalablement solubilisés dans du THF. Une quantité équivalente de THF (0,1 % final) était ajoutée aux cultures témoins. Les concentrations des cytokines utilisées correspondaient aux concentrations maximales de ces cytokines dans le sérum et le fluide synovial des patients arthrosiques<sup>152, 289, 290</sup>.



Pour l'étude de la minéralisation, les ostéoblastes étaient cultivés pendant 12 jours dans le milieu composé du milieu de base, de 2 % (v/v) d'UG, de 20 µg/ml de proline, de 50 µg/ml d'acide ascorbique et avec ou sans  $10^{-8}$  M de  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub>. Ensuite, les ostéoblastes étaient cultivés pendant 3 jours dans le même milieu nutritif

en présence ou non de 5 mM de  $\beta$ -glycérophosphate (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*).



### 2.1.3. Arrêt de la culture

Au terme de la période de culture, le milieu de culture était enlevé et conservé à -20°C. Les cellules étaient rincées avec du PBS, et ensuite détachées par l'addition d'une solution 0,125 % trypsine - 0,5 mM EDTA pendant 5 min à 37°C. Les cellules étaient ensuite recueillies par centrifugation (150 g, 5 min à température ambiante) et lavées 3 fois avec du PBS. Le culot de cellules était remis en suspension dans 1 ml de PBS puis dissocié par ultrasons à 4°C (30 secondes à 50 watt/cm<sup>2</sup>). Les extraits cellulaires ainsi obtenus étaient conservés à -20°C.

## 2.2. DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'ANALYSE CYTOLOGIQUES

### 2.2.1. Marquage de la PAL

La méthode de marquage au naphthol AS-MX phosphate et au Fast Red a été utilisée pour visualiser l'activité PAL membranaire des cellules. Les ostéoblastes étaient rincés 2 fois avec du PBS puis fixés une nuit dans 1 ml d'éthanol 80 % (v/v), à 4°C. Ensuite, les cellules étaient incubées 15 min à 37°C dans 1 ml de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 contenant 0,4 mg/ml de naphthol AS-MX phosphate (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), 1 mg/ml de Fast Red TR (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), 2 % (v/v) de diméthylformamide (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*). Après plusieurs lavages, les cellules étaient colorées 5 min à l'hématoxyline et observées au microscope.

### 2.2.2. Incorporation du Red Oil

Afin de vérifier l'absence d'adipocytes dans nos cultures, nous avons réalisé un marquage au Red Oil O (*Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*). Ce colorant s'incorpore dans les vésicules lipidiques. Après plusieurs lavages avec du PBS, les cellules étaient

fixées pendant 1 h à 4°C dans une solution 40 g/L de paraformaldéhyde. Le fixateur était ensuite éliminé et les cellules lavées plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée. Les cellules étaient alors incubées 15 min dans une solution 0,05 g/L de Red Oil. Le colorant était éliminé et les cellules rincées à l'eau déminéralisée avant d'être observées au microscope. Les cellules colorées en rouge correspondaient aux adipocytes.

### **2.2.3. Coloration à l'Alizarin Red**

La minéralisation de la matrice extracellulaire a été évaluée par la coloration à l'Alizarin Red. Directement après rinçage des puits au PBS, une solution 0,05 g/L d'Alizarin Red pH 5,3 était ajoutée aux puits de culture. Après 10 min, les puits étaient rincés à l'eau déminéralisée et observés au microscope.

## **2.3. DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'ANALYSE BIOCHIMIQUES**

### **2.3.1. Dosage de l'ADN**

L'ADN cellulaire était quantifié selon la technique de Labarca et Paigen<sup>265</sup>. Cette technique a été décrite précédemment (voir page 51).

### **2.3.2. Dosage de la PAL**

L'activité PAL était quantifiée dans les extraits cellulaires. Cinquante µl d'extrait cellulaire étaient incubés avec 100 µl de p-nitrophénylphosphate (p-NPP liquide prêt à l'emploi, *KEM-EN-TEC, Kobenhavn, Danemark*). En présence de PAL, le p-NPP est hydrolysé en p-nitrophénol et en phosphate inorganique. Après 10 min d'incubation à 37°C, l'absorbance à 405 nm de la solution était mesurée et la concentration en p-nitrophénol calculée en se rapportant à une courbe de référence. La courbe de référence était obtenue en diluant dans du PBS une solution de p-nitrophénol (concentrations comprises entre 1000 et 15 µM). Les résultats étaient exprimés en nmol de p-nitrophénol libérées par min et par µg d'ADN.

### **2.3.3. Dosage de la LDH**

La mortalité cellulaire était estimée par la mesure de la LDH dans le surnageant de culture. Cette technique a été décrite précédemment (voir page 51).

### 2.3.4. Dosage ELISA de l'OC

L'OC était dosée dans les milieux de culture par une méthode ELISA (Biosource Europe, Fleurus, Belgique). Ce dosage est basé sur un système oligonal, constitué de deux anticorps monoclonaux, dirigés contre des épitopes distincts de la molécule testée. Vingt-cinq µl d'échantillon et 100 µl d'une solution d'anticorps couplés à la peroxydase étaient incubés ensemble durant 2 h sous agitation continue (700 rpm) et à température ambiante afin de permettre la formation de complexes anticorps-antigène-anticorps couplé à la peroxydase. Les plaques étaient ensuite lavées avec du tampon de lavage [0,1 % (v/v) de tween 20 et 1 mM d'HEPES] afin d'éliminer les anticorps non liés. La révélation des anticorps fixés à l'antigène était effectuée par l'addition d'une solution de tétraméthylbenzidine et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après 30 min d'incubation, la réaction était stoppée par l'addition d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 N et l'absorbance était lue à 450 nm. La sensibilité du dosage était de 1 ng/ml.

### 2.3.5. Dosages EASIA de l'IL-1β, de l'IL-6, du TGF-β1, de la MMP-3 et du TIMP-1

L'IL-1β, l'IL-6, le TGF-β1, la MMP-3 et le TIMP-1 ont été quantifiés par EASIA (Biosource Europe, Fleurus, Belgique) dans les milieux de cultures. Ces dosages ont été décrits dans le chapitre 2 (page 52). Leurs caractéristiques analytiques sont reprises dans le tableau 10.

<i>Molécules étudiées</i>	<i>Type de dosage</i>	<i>Sensibilité</i>	<i>Précision (CV intraassay)</i>	<i>Reproductibilité (CV interassay)</i>
IL-1β	1 étape	10 pg/ml	5,2 %	5,9 %
IL-6	1 étape	3 pg/ml	6,1 %	4,8 %
TGF-β1	1 étape	10 pg/ml	8,3 %	7,2 %
MMP-3	1 étape	0,2 ng/ml	5,6 %	6,5 %
TIMP-1	2 étapes	0,5 ng/ml	4,7 %	4,9 %

**Tableau 10** : Caractéristiques analytiques des différents dosages EASIA utilisés.

### 2.3.6. Dosage radio-immunologique de la PTHrP

La PTHrP était directement mesurée dans les milieux de culture conditionnés par les ostéoblastes, par une méthode IRMA (*ImmunoRadioMetric Assay, Diagnostic Systems Laboratories, Oxon, Royaume-Uni*). Dans cette méthode, un anticorps est immobilisé sur la paroi des tubes, et un deuxième anticorps est marqué à l'iode ( $^{125}$ I). Deux cent  $\mu$ l d'échantillon ou de standard et 100  $\mu$ l de solution contenant l'anticorps marqué à l'iode étaient placés dans les tubes de réaction et incubés une nuit à température ambiante sous agitation (180 rpm). Les tubes étaient ensuite décantés et rincés 3 fois avec de l'eau déminéralisée. La radioactivité était alors comptée durant 1 min à l'aide d'un compteur  $\gamma$ . La limite de détection de ce radio-immunodosage était de 3 pg/ml.

### 2.4. CALCULS ET ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats ont été exprimés en quantités d'OC, de PTHrP, d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1, de MMP-3 ou de TIMP-1 produites par  $\mu$ g d'ADN. L'activité PAL a été exprimée en nmol de p-nitrophénol libérées par  $\mu$ g d'ADN et par min.

La moyenne et l'écart-type réduit (SEM) ont été calculés pour chaque condition expérimentale. Les moyennes obtenues ont été comparées par le test non paramétrique de Mann-Whitney (description du test à la page 54).

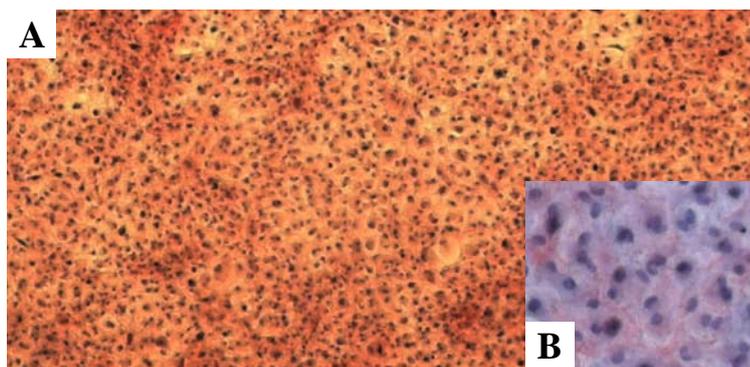
## 3. Résultats

### 3.1. CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES OSTEOBLASTES SOUS-CHONDRAUX

L'ensemble des résultats montrés dans ce paragraphe ont été obtenus avec des cultures d'ostéoblastes NSC de l'os sous-chondral.

#### 3.1.1. Morphologie cellulaire et présence de PAL membranaire

Les cellules présentaient une morphologie cuboïdale (figure 51). La présence de PAL a été révélée par un marquage cytologique au naphthol AS-MX phosphate et au Fast Red. Après 12 jours de culture, la majorité des cellules présentaient un marquage positif à la PAL (coloration rouge des cellules, figure 51).



*Figure 51 : Marquage cytologique de la PAL membranaire au naphthol AS-MX phosphate et Fast Red.*

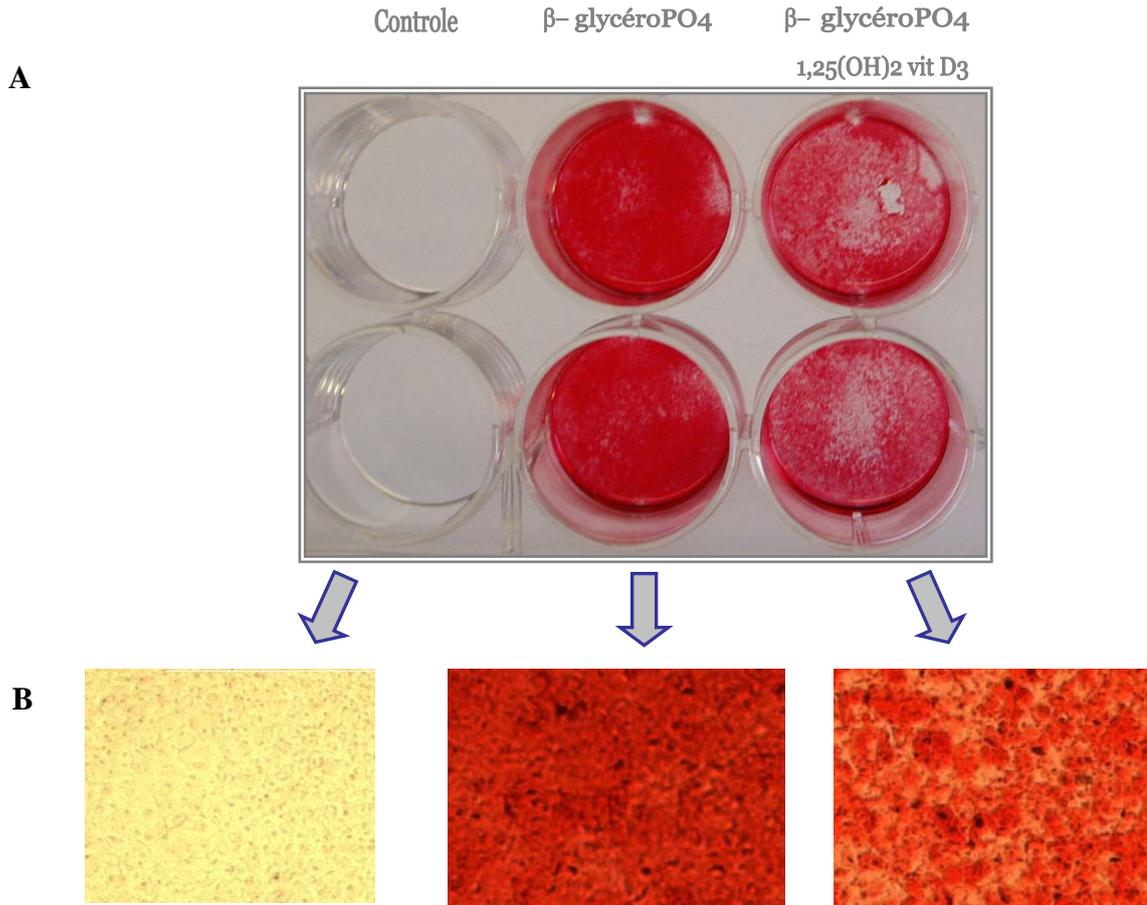
*A : grossissement 5x.*

*B : contre coloration hématoxyline, grossissement 20 x.*

#### 3.1.2. Minéralisation de la matrice

Nous avons recherché la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dans nos cultures d'ostéoblastes par la méthode de marquage à l'Alizarin red. En présence de  $\beta$ -glycérophosphate, la culture d'ostéoblastes se colorait en rouge, indiquant une forte minéralisation de la matrice extracellulaire (figure 52).

L'addition de  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine  $\text{D}_3$  ( $10^{-8}$  M) au milieu de culture réduisait la minéralisation de la matrice (figure 52).



**Figure 52 :** Marquage cytotologique des ostéoblastes à l'Alizarin Red. L'expérience a été réalisée après 15 jours de culture dans un milieu nutritif composé de DMEM enrichi de 2% (v/v) d'UG, de proline (20  $\mu\text{g/ml}$ ) et d'acide ascorbique (50  $\mu\text{g/ml}$ ). De la 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup> M) et/ou du  $\beta$ -glycérophosphate (5 mM) ont été ajoutés au milieu nutritif durant les 3 derniers jours de culture.

A : photographie numérique de la plaque 12 puits.

B : observations microscopiques des puits, grossissement 5 x.

### 3.1.3. Etude de la prolifération cellulaire

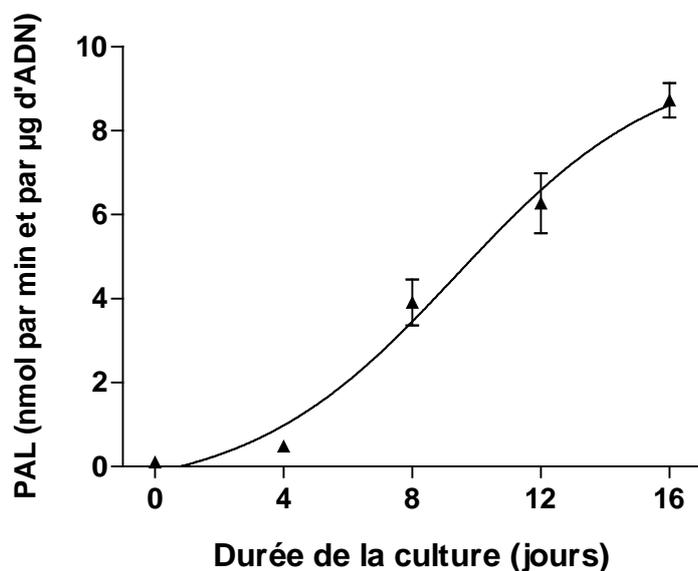
Dans nos conditions de culture, la concentration en ADN restait stable durant au moins 16 jours. La 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-7</sup> M) n'influçait pas la concentration en ADN de nos cultures (tableau 11).

Concentration en 1,25(OH) <sub>2</sub> vitamine D <sub>3</sub>	µg d'ADN / puits
0	3,15 ± 0,22
10 <sup>-9</sup> M	3,23 ± 0,15
10 <sup>-8</sup> M	3,26 ± 0,18
10 <sup>-7</sup> M	3,48 ± 0,21

**Tableau 11 :** Quantités d'ADN contenues dans les cultures au terme de 16 jours de culture dans un milieu nutritif composé de DMEM enrichi de 2% (v/v) d'UG, de proline (20 µg/ml) et d'acide ascorbique (50 µg/ml), et en présence ou non de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub>. Les résultats sont exprimés en µg d'ADN par puits et sont représentés par la moyenne de 2 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=6).

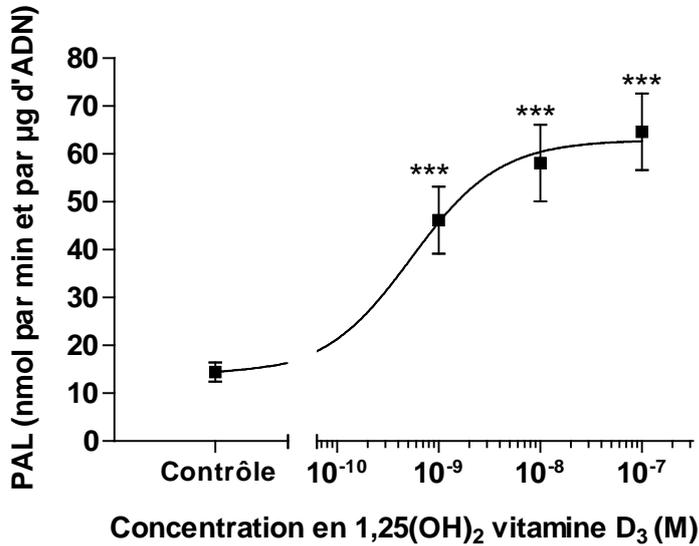
### 3.1.4. Etude de l'activité de type PAL

Dans nos conditions expérimentales, l'activité PAL dans les extraits cellulaires augmentait significativement avec la durée de la culture ( $r = 0,9821$ ,  $p = 0,0029$ , figure 53).



**Figure 53 :** Evolution de l'activité PAL exprimée par les ostéoblastes en fonction de la durée de la culture. Les ostéoblastes ont été cultivés 16 jours dans un milieu nutritif composé de DMEM enrichi de 2% (v/v) d'UG, de proline (20 µg/ml) et d'acide ascorbique (50 µg/ml). Les résultats sont exprimés en nmol de nitrophénol libérée par minute et par µg d'ADN, et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9).

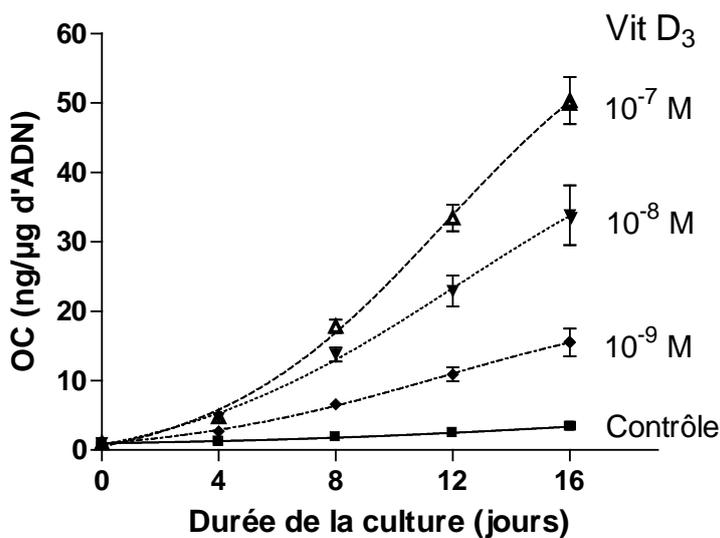
L'activité PAL membranaire était significativement augmentée en présence de concentrations croissantes (entre  $10^{-9}$  et  $10^{-7}$  M) de  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub> ( $p < 0,001$ , figure 54).



**Figure 54** : Effet de la concentration en  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub> sur l'activité PAL, au terme de 16 jours de culture dans un milieu nutritif composé de DMEM enrichi de 2% (v/v) d'UG, de proline (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et d'acide ascorbique (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Les résultats sont exprimés en nmol de nitrophénol libérée par minute et par  $\mu\text{g}$  d'ADN et représentés par la moyenne de 2 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=6$ ).

### 3.1.5. Etude de la production d'OC

Dans les conditions basales, les ostéoblastes produisaient en moyenne, durant les 16 jours de culture, 3,99 ng d'OC par  $\mu\text{g}$  d'ADN (valeur cumulée). La  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub> stimulait fortement la production d'OC ( $p < 0,001$ ). L'effet de la  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub> était corrélé avec la concentration ( $r = 0,9576$  ;  $p < 0,001$  ; figure 55).



**Figure 55** : Effet de la concentration en  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub> sur la cinétique de production de l'OC, durant 16 jours de culture dans un milieu nutritif composé de DMEM enrichi de 2% (v/v) d'UG, de proline (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et d'acide ascorbique (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Les résultats correspondent aux valeurs cumulées et sont exprimés en ng d'OC par  $\mu\text{g}$  d'ADN. Ils sont représentés par la moyenne de 2 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=6$ ).

### 3.2. COMPARAISON DU PHENOTYPE DES OSTEOLASTES DES ZONES SC ET NSC DE L'OS SOUS-CHONDRALE ARTHROSIQUE

Nous avons comparé les synthèses de PAL, d'OC, d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1, de MMP-3, de TIMP-1 et de PTHrP des ostéoblastes issus des zones SC ou NSC.

Les ostéoblastes SC de l'os sous-chondral produisaient significativement plus de PAL (+ 96 %,  $p < 0,001$ ), d'OC (+ 99 %,  $p < 0,001$ ), d'IL-6 (+ 135 %,  $p < 0,001$ ) et de TGF- $\beta$ 1 (+ 41 %,  $p < 0,001$ ) que les ostéoblastes NSC. Par contre, ils produisaient moins de PTHrP (- 65 %,  $p < 0,001$ ). Les productions d'IL-1 $\beta$ , de MMP-3 et de TIMP-1 étaient identiques dans les cultures d'ostéoblastes SC et NSC (tableau 12).

		Ostéoblastes NSC	Ostéoblastes SC
ADN	$\mu\text{g/puits}$	3,1 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,4
PAL	nmol/ $\mu\text{g d'ADN*min}$	9,1 $\pm$ 0,6	17,8 $\pm$ 0,6 ***
OC	pg/ $\mu\text{g d'ADN}$	6808 $\pm$ 301	13507 $\pm$ 411 ***
IL-1 $\beta$	pg/ $\mu\text{g d'ADN}$	4,4 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,7
IL-6	pg/ $\mu\text{g d'ADN}$	595 $\pm$ 35	1397 $\pm$ 114 ***
TGF- $\beta$ 1	pg/ $\mu\text{g d'ADN}$	37,5 $\pm$ 0,5	52,9 $\pm$ 3,4 ***
MMP-3	pg/ $\mu\text{g d'ADN}$	4.108 $\pm$ 702	4.513 $\pm$ 914
TIMP-1	pg/ $\mu\text{g d'ADN}$	784.200 $\pm$ 51.300	821.400 $\pm$ 95.600
PTHrP	pg/ $\mu\text{g d'ADN}$	31,2 $\pm$ 2,1	20,3 $\pm$ 1,6 ***

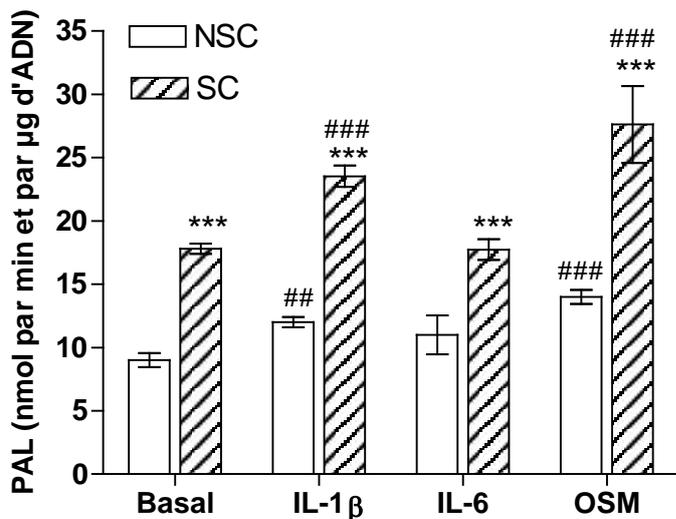
**Tableau 12 :** Production basale de PAL (phosphatase alcaline), d'OC (ostéocalcine), d'IL (interleukine) -1 $\beta$ , d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor), de MMP-3 (matrix metalloproteinase), de TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) et de PTHrP (parathyroid hormone related protein) par les ostéoblastes NSC ou SC de l'os sous-chondral après 72 h de culture dans un milieu de base enrichi par 1% d'ITS+. Les résultats sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.3. ETUDE DES EFFETS DE L'IL-1 $\beta$ , DE L'IL-6 ET DE L'OSM SUR LE METABOLISME DES OSTEOBLASTES SOUS-CHONDRAUX

Les ostéoblastes étaient incubés pendant 72 h avec de l'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), de l'IL-6 (100 ng/ml) avec son récepteur soluble (IL-6sR, 50 ng/ml), ou de l'OSM (10 ng/ml). Dans nos conditions expérimentales, ces facteurs n'influençaient pas de façon significative la concentration en ADN de la culture ou la viabilité cellulaire.

#### 3.3.1. Influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur l'activité PAL

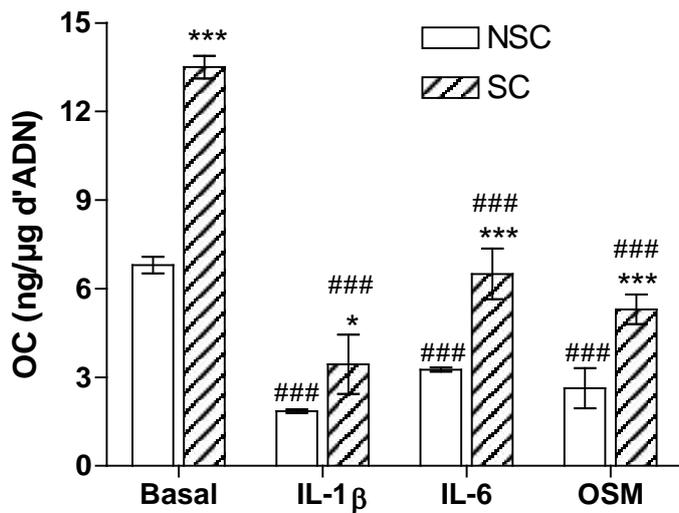
L'IL-1 $\beta$  et l'OSM augmentaient l'activité PAL des ostéoblastes NSC et SC (NSC : IL-1 $\beta$  + 34 %,  $p < 0,01$  et OSM + 57 %,  $p < 0,001$  ; SC : IL-1 $\beta$  + 32 %,  $p < 0,001$  et OSM + 55 %,  $p < 0,001$ ). Par contre, l'IL-6 n'avait pas d'effet significatif sur ce paramètre (figure 56).



**Figure 56** : Activité PAL mesurée dans les extraits cellulaires après 72 h de culture en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en nmol par min et par  $\mu$ g d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). \*\*\* =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ## =  $p < 0,01$  et ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

#### 3.3.2. Influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur la production d'OC

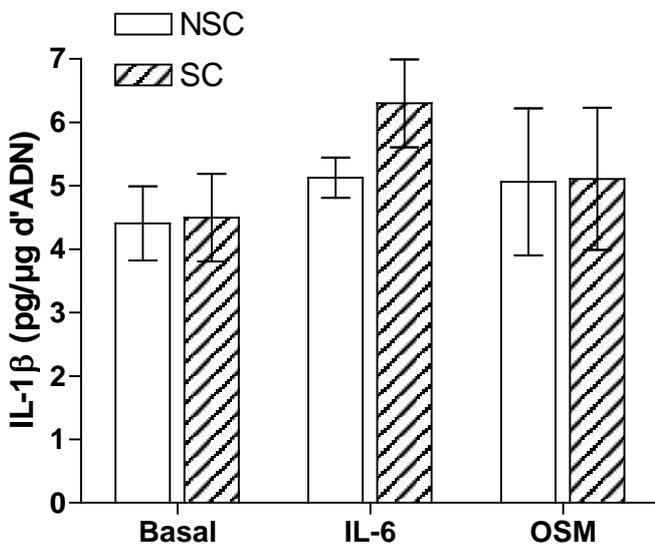
La production d'OC par les ostéoblastes NSC et SC était significativement ( $p < 0,001$ ) diminuée par l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'OSM (NSC : IL-1 $\beta$  - 72 %, IL-6 - 51 % et OSM - 62 % ; SC : IL-1 $\beta$  - 75 %, IL-6 - 52 % et OSM - 61 %) (figure 57).



**Figure 57 :** Production d'OC par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1β (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en ng par µg d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*= p<0,05 et \*\*\* = p<0,001 entre les ostéoblastes NSC et SC, ### = p<0,001 entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

### 3.3.3. Influence de l'IL-6 et de l'OSM sur la production d'IL-1β

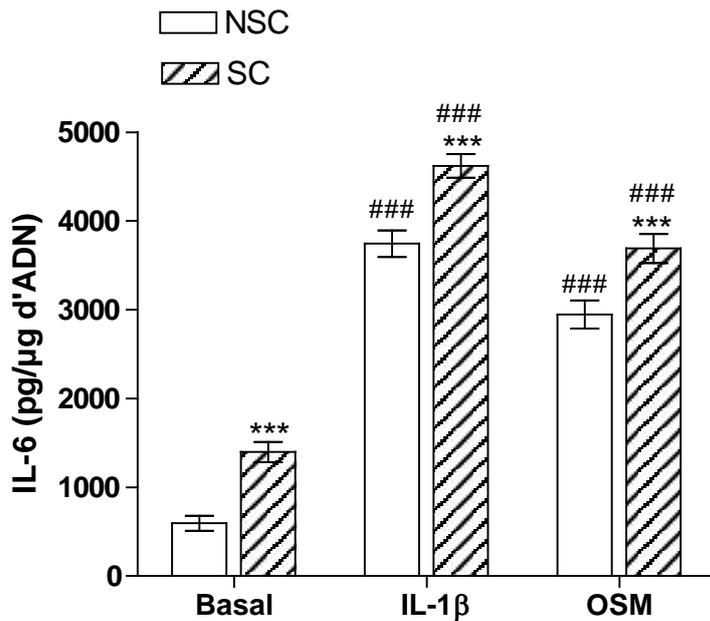
La production d'IL-1β n'était pas significativement modifiée par l'IL-6 ou l'OSM (figure 58).



**Figure 58 :** Production d'IL-1β par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en pg par µg d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). N.D. = non déterminé.

### 3.3.4. Influence de l'IL-1β et de l'OSM sur la production d'IL-6

En présence d'IL-1β (1,7 ng/ml) ou d'OSM (10 ng/ml), la production d'IL-6 par les ostéoblastes NSC et SC était significativement augmentée (p < 0,001, figure 59). Cependant, l'augmentation était significativement (p < 0,001) plus importante dans les cultures d'ostéoblastes NSC que dans celles d'ostéoblastes SC (NSC : IL-1β + 530 % et OSM + 395 % ; SC : IL-1β + 230 % et OSM + 164 %).

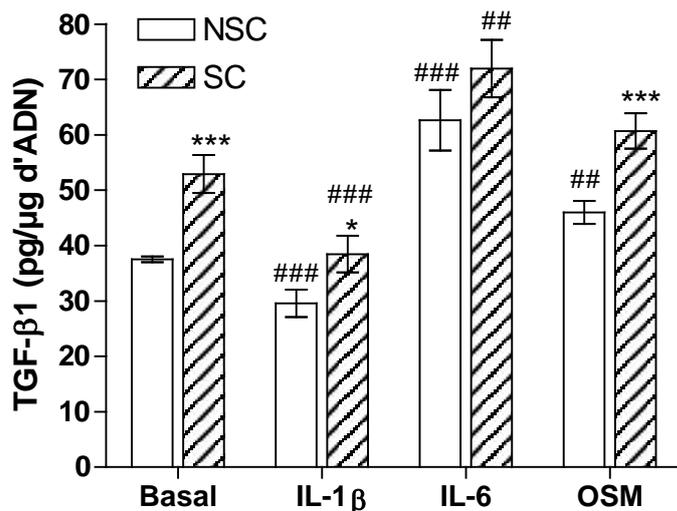


**Figure 59** : Production d'IL-6 par les ostéoblastes durant 72 h de culture en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en pg par  $\mu$ g d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \*\*\* =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

N.D. = non déterminé

### 3.3.5. Influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de TGF- $\beta$ 1

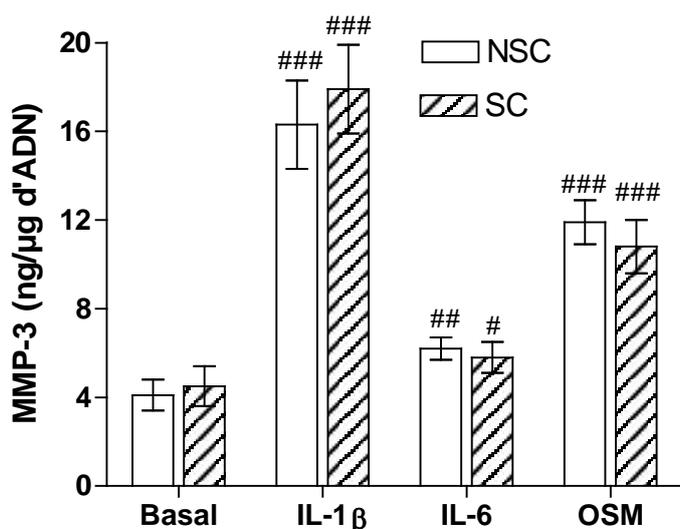
L'IL-1 $\beta$  diminuait de façon significative la production de TGF- $\beta$ 1 ( $p < 0,001$ ) par les ostéoblastes NSC ou SC (NSC : - 21 % ; SC : - 28 %). Par contre, l'IL-6 et l'OSM augmentaient significativement la production de TGF- $\beta$ 1 par les ostéoblastes NSC (+ 67 et + 23 % ;  $p < 0,01$ ), alors que seule l'IL-6 augmentait significativement la production de TGF- $\beta$ 1 par les ostéoblastes SC (+ 36 %,  $p < 0,01$ , figure 60).



**Figure 60** : Production de TGF- $\beta$ 1 par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en pg par  $\mu$ g d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). \* =  $p < 0,05$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ## =  $p < 0,01$  et ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

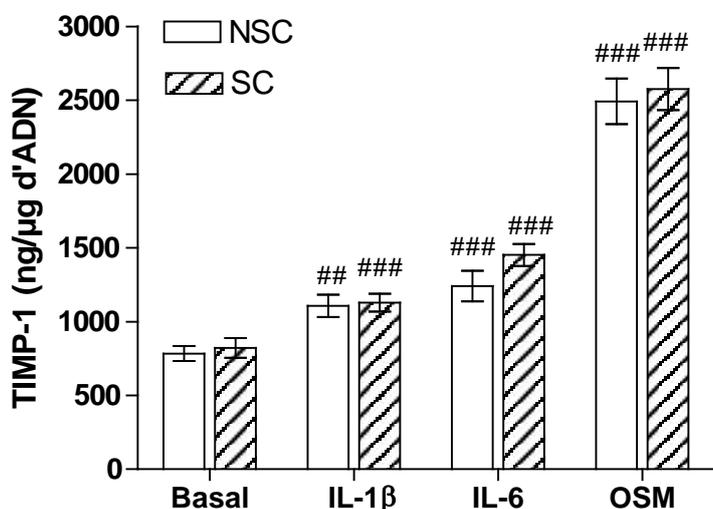
### 3.3.6. Influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur production de MMP-3 et de TIMP-1

Dans nos conditions expérimentales, la production de MMP-3 était significativement augmentée par l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'OSM (NSC : + 298 %, + 51 % et + 190 % et SC : + 298 %, + 29 % et + 140 % respectivement ;  $p < 0,05$ , figure 61). L'amplitude de l'effet était similaire dans les cultures d'ostéoblastes NSC ou SC.



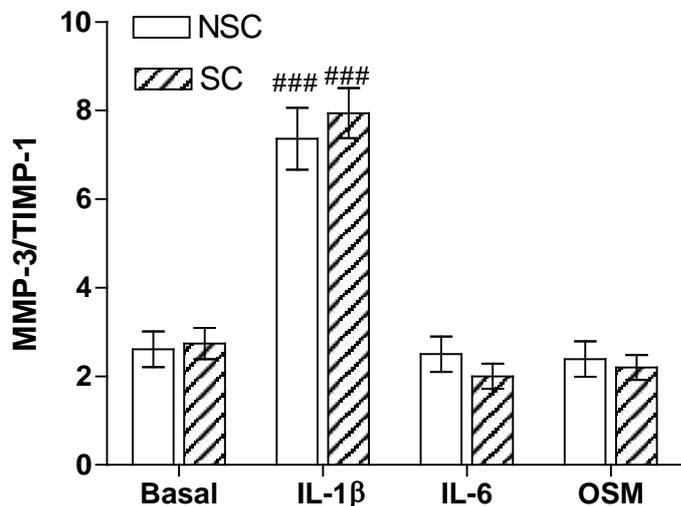
**Figure 61** : Production de MMP-3 par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en ng par  $\mu$ g d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). # =  $p < 0,05$ , ## =  $p < 0,01$  et ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'OSM augmentaient également la production de TIMP-1 par les ostéoblastes NSC et SC. Les effets étaient identiques dans les deux groupes (NSC : + 41 %, + 58 % et + 218 % et SC : + 37 %, + 77 % et + 214 % respectivement,  $p < 0,01$ , figure 62)



**Figure 62** : Production de TIMP-1 par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en ng par  $\mu$ g d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). ## =  $p < 0,01$  et ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

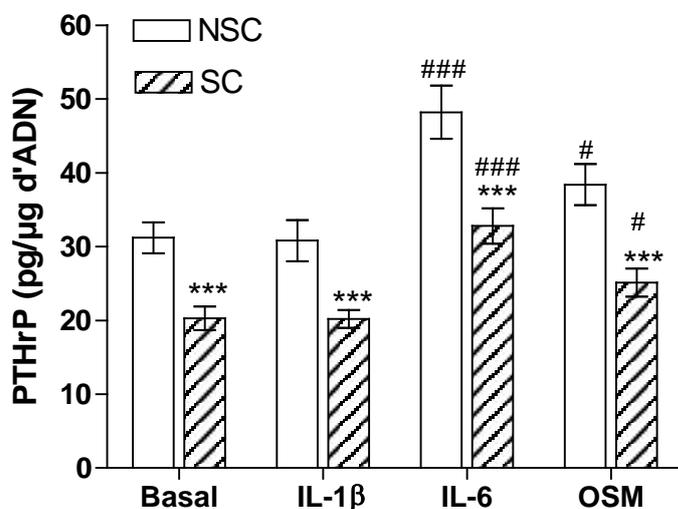
Le rapport MMP-3 / TIMP-1 était modifié uniquement en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml). L'effet était similaire dans les cultures d'ostéoblastes NSC ou SC (NSC : + 182 % et SC : + 190 %,  $p < 0,001$ , figure 63).



**Figure 63 :** Rapport molaire MMP-3 / TIMP-1 observé dans les cultures d'ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en rapport molaire  $\times 1000$  et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

### 3.3.7. Influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur la production de PTHrP

Les ostéoblastes cultivés en présence d'OSM ou d'IL-6 produisaient significativement plus de PTHrP que les ostéoblastes témoins. L'effet de ces cytokines était similaire sur les ostéoblastes NSC et SC (NSC : OSM + 23 %,  $p < 0,05$  et IL-6 + 54 %,  $p < 0,001$  ; SC : OSM + 24 %,  $p < 0,05$  et IL-6 + 62 %,  $p < 0,001$ , figure 64).



**Figure 64 :** Production de PTHrP par les ostéoblastes au terme de 72 h de culture en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$  (1,7 ng/ml), d'IL-6 (100 ng/ml + 50 ng/ml d'IL-6sR) ou d'OSM (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en pg par  $\mu$ g d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). \*\*\* =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, # =  $p < 0,05$  et ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes cultivés dans les conditions basales et ceux stimulés par les cytokines.

### 3.4. ETUDE DES EFFETS DES IAS SUR LE METABOLISME DES OSTEOBLASTES SOUS-CHONDRAUX

Les IAS diminuaient la production d'IL-1 $\beta$  par les ostéoblastes NSC ( $p < 0,001$ ), mais n'avaient pas d'effet sur les productions de PAL, d'OC, d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1.

Par contre, les IAS diminuaient significativement la production de PAL, d'OC et de TGF- $\beta$ 1 par les ostéoblastes SC ( $p < 0,01$ ), mais n'avaient pas d'effet sur les productions d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de PTHrP (tableau 13).

		Basal	IAS (10 $\mu$ g/ml)
ADN	NSC	3,1 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,7
$\mu$ g/puits	SC	3,0 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,6
PAL	NSC	9,1 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 1,1
nmol/ $\mu$ g d'ADN*min	SC	17,8 $\pm$ 0,6	<b>13,1 <math>\pm</math> 0,3 ##</b>
OC	NSC	6808 $\pm$ 302	6013 $\pm$ 854
ng/ $\mu$ g d'ADN	SC	13507 $\pm$ 411	<b>9154 <math>\pm</math> 724 ##</b>
PTHrP	NSC	31,2 $\pm$ 2,1	33,5 $\pm$ 2,4
pg / $\mu$ g d'ADN	SC	20,3 $\pm$ 1,6	22,2 $\pm$ 1,8
IL-1 $\beta$	NSC	4,4 $\pm$ 0,6	<b>2,7 <math>\pm</math> 0,1 ###</b>
pg/ $\mu$ g d'ADN	SC	4,5 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,5
IL-6	NSC	595 $\pm$ 35	533 $\pm$ 19
pg/ $\mu$ g d'ADN	SC	1397 $\pm$ 114	1339 $\pm$ 170
TGF- $\beta$ 1	NSC	37,5 $\pm$ 0,5	34,5 $\pm$ 2,8
pg/ $\mu$ g d'ADN	SC	52,9 $\pm$ 3,4	<b>39,1 <math>\pm</math> 3,3 ##</b>

**Tableau 13** : Effets du mélange d'IAS (10  $\mu$ g/ml) sur les productions de PAL (phosphatase alcaline), d'OC (ostéocalcine), d'IL (interleukine) -1 $\beta$ , d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor), de MMP-3 (matrix metalloproteinase), de TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) et de PTHrP (parathyroid hormone related protein) par les ostéoblastes NSC et SC durant 72 h de culture. Les résultats sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). ## = $p < 0,01$  et ### = $p < 0,001$  entre les ostéoblastes incubés ou non avec les IAS.

## 4. Discussion

### **Le phénotype des ostéoblastes de l'os sous-chondral sclérosé est altéré.**

Dans cette partie de notre travail, nous avons comparé le phénotype des ostéoblastes NSC et SC isolés à partir de la plaque osseuse sous-chondrale de patients arthrosiques. Cette démarche est originale. En effet, les travaux publiés sur ce sujet étudiaient le phénotype des ostéoblastes isolés à partir d'os sous-chondral arthrosique, sans faire la distinction entre les ostéoblastes des zones sclérosées (SC) et non sclérosées (NSC)<sup>10-13, 15, 291</sup>. De plus, dans certains cas, les ostéoblastes étudiés provenaient de l'os sous-chondral trabéculaire<sup>17, 292</sup>, et non de l'os cortical comme c'est le cas dans notre étude. Notre modèle est donc mieux adapté à l'étude des changements métaboliques survenant localement au niveau des zones sclérosées de l'os sous-chondral.

Grâce à ce modèle, nous avons observé que les ostéoblastes SC produisaient beaucoup plus d'OC, de PAL et de TGF- $\beta$ 1, mais moins de PTHrP que les ostéoblastes NSC. Ces résultats complètent ceux obtenus par l'équipe du Professeur Pelletier (tableau 14). Cette équipe a montré que les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques produisaient plus d'uPA, d'IGF-1, et d'HGF, mais moins d'IGFBP que les ostéoblastes normaux<sup>10-13, 15</sup>. Il existe donc au sein de l'os sous-chondral sclérosé un déséquilibre métabolique favorable à la sclérose du tissu. En effet, l'accumulation locale d'IGF-1, de TGF- $\beta$ 1 et d'HGF combinée à l'absence relative de PTHrP favorise la formation et le dépôt de substance ostéoïde. *In vitro*, l'IGF-1, le TGF- $\beta$ 1 et le HGF stimulent la prolifération des ostéoblastes et la synthèse par ces cellules de collagène de type I<sup>293-295</sup>. Selon Pelletier et collaborateurs<sup>12</sup>, l'accumulation d'IGF-1 libre dans l'os sous-chondral résulterait à la fois de l'augmentation de la synthèse d'IGF-1 et de l'augmentation de la synthèse et de l'activité d'uPA. L'uPA est une enzyme capable de dissocier les complexes IGF/IGFBP<sup>296</sup> (figure 65). Parallèlement, l'absence relative de PTHrP au niveau de l'os sclérosé expliquerait la faible résorption de l'os néoformé.

Nous avons également étudié la production de MMP-3, de TIMP-1 et d'IL-1 $\beta$  par les ostéoblastes sous-chondraux. Notons que la production de MMP-3 par les ostéoblastes est relativement faible en comparaison de celle des chondrocytes (75 fois moins de production basale). La production de MMP-3, de TIMP-1 et d'IL-1 $\beta$  était identique dans les cultures d'ostéoblastes SC et NSC, indiquant que ces facteurs ne jouent probablement pas un rôle prépondérant dans la sclérose de l'os. Cependant,

nous devons garder à l'esprit que l'activité biologique de ces facteurs peut-être modifiée, alors que leur synthèse reste constante. Il n'est pas impossible que l'IL-1 $\beta$  puisse jouer un rôle dans le processus de la sclérose. L'activité biologique de cette cytokine est régulée par un antagoniste, l'IL-1Ra, et par un système complexe de récepteurs<sup>99</sup>.

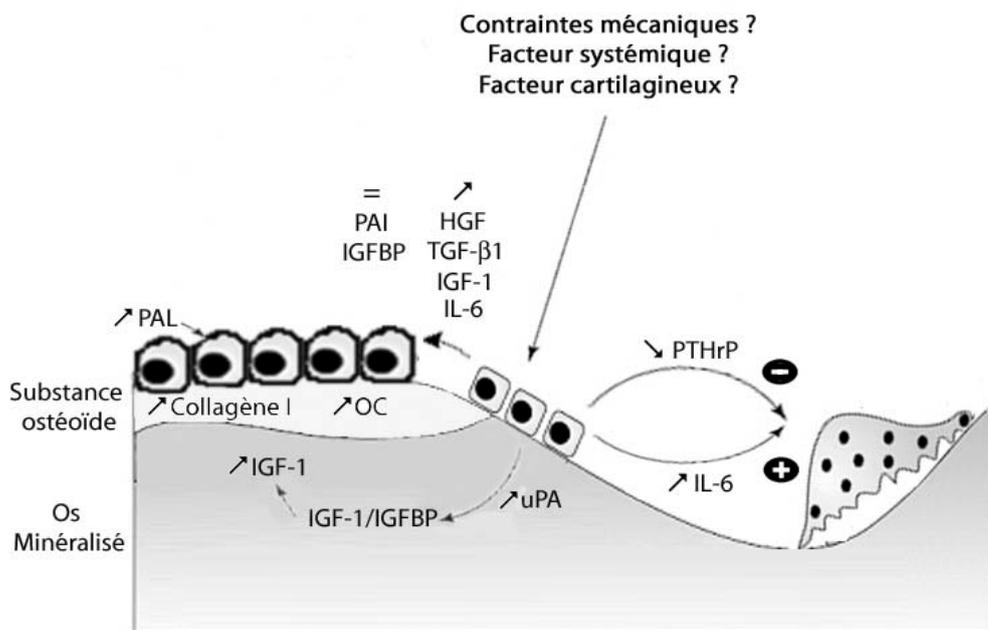
Augmentés	Diminués	Non modifiés
IGF-1	PTHrP	IGFBP
u-PA	PTH-R	PAI
HGF	Type I [( $\alpha$ 1) <sub>2</sub> ] $\alpha$ 2	IL-1 $\beta$
TGF- $\beta$ 1		MMP-3
IL-6		TIMP-1
PAL		
OC		
Type I [( $\alpha$ 1) <sub>3</sub> ]		
MMP-2 et -9		

**Tableau 14 :** Résumé des modifications du phénotype des ostéoblastes sous-chondraux de l'articulation arthrosique. HGF : hepatocyte growth factor, IGF : insulin-like growth factor, IGFBP : IGF binding protein, IL : interleukine, MMP : métalloprotéinase matricielle, OC : ostéocalcine, PAL : phosphatase alcaline, PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène, PTHrP : protéine apparentée à la parathormone, TGF : transforming growth factor, TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinases, uPA : activateur du plasminogène de type urokinase.

A ce jour, l'origine des changements métaboliques observés au niveau de l'os sous-chondral reste méconnue. Néanmoins, quelques hypothèses peuvent être avancées (figure 65). Plusieurs travaux récents suggèrent l'implication des facteurs mécaniques dans le dysfonctionnement des ostéoblastes sous-chondraux. L'application de stimuli mécaniques, comme des pressions anormales exercées chez l'animal<sup>297, 298</sup> ou sur des ostéoblastes cultivés au sein de matrices compressibles<sup>299, 300</sup>, augmente la prolifération des ostéoblastes et la production par ces cellules d'IGF-1, d'ostéopontine, de PAL, d'OC et de collagène de type I. Ces résultats suggèrent que l'application de contraintes mécaniques anormales sur l'articulation peut induire une perturbation métabolique au niveau des ostéoblastes exposés à ces contraintes, et secondairement provoquer la sclérose de l'os sous-chondral. Plusieurs auteurs ont évoqué le rôle possible de facteurs systémiques et/ou génétiques dans la genèse de la sclérose sous-chondrale<sup>301</sup>. En effet, les concentrations sériques de plusieurs facteurs de la régulation du remodelage osseux (IGF-1, vitamine D) sont corrélés avec certains paramètres de l'arthrose, comme la formation d'ostéophytes<sup>301-303</sup>. Cependant, les résultats publiés sont contradictoires et la corrélation de ces marqueurs avec la sclérose sous-chondrale n'a pas encore été démontrée<sup>304-306</sup>. D'un point de vue

génétique, certains auteurs ont étudié la relation entre l'arthrose et les polymorphismes du gène du récepteur à la vitamine D (VDR)<sup>307, 308</sup>. Certains allèles de ce gène viennent d'être associés avec une synthèse accrue d'OC par les ostéoblastes *in vitro*<sup>308, 309</sup>. Toutefois, l'équipe du Professeur Pelletier n'a pas observé de différence significative dans la réponse des ostéoblastes à la vitamine D entre les populations d'ostéoblastes sous-chondraux sains et arthrosiques<sup>13</sup>. L'influence de facteurs systémiques ou génétiques dans la genèse de la sclérose sous-chondrale reste donc hypothétique.

Aussi, nous ne pouvons pas rejeter d'autres explications, comme l'influence de facteurs biochimiques d'origine cartilagineuse sur le métabolisme des ostéoblastes voisins des microfractures. En effet, les chondrocytes produisent de nombreux facteurs (IGF-1, TGF- $\beta$ 1,...) qui stimulent la synthèse de substance ostéoïde<sup>293-295</sup>. La coexistence des deux phénomènes, mécanique et biochimique, est également possible.



**Figure 65 :** Représentation schématique des mécanismes hypothétiques impliqués dans la sclérose de l'os sous-chondral. ↗ = une augmentation de synthèse et ↘ = une inhibition de synthèse. Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques, sous l'influence de facteurs mécaniques et/ou systémiques et/ou cartilagineux, produiraient plus de facteurs de croissance et d'IL-6 que les ostéoblastes normaux. Ces facteurs induiraient la maturation des ostéoblastes et le dépôt accru de substance ostéoïde. HGF : hepatocyte growth factor, IGF : insulin-like growth factor, IGFBP : IGF binding protein, IL : interleukine, MMP : métalloprotéinase matricielle, OC : ostéocalcine, PAL : phosphatase alcaline, PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène, PTHrP : protéine apparentée à la parathormone, TGF : transforming growth factor, uPA : activateur du plasminogène de type urokinase.

## **L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'OSM n'induisent pas l'ensemble des modifications de phénotype observées chez l'ostéoblaste des zones sclérosées.**

Nous avons également recherché si des facteurs biochimiques impliqués dans la pathogénie de l'arthrose et dans le contrôle du remodelage osseux étaient capables d'induire *in vitro*, chez l'ostéoblaste des zones non sclérosées, les caractéristiques phénotypiques des ostéoblastes sclérosés. Dans ce but, nous avons cultivé des ostéoblastes NSC en présence d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'OSM aux concentrations de 1,7 ng/ml, 100 ng/ml et 10 ng/ml. L'effet de l'IL-6 était étudié en présence de 50 ng/ml d'IL-6sR. Ces concentrations ont été choisies parce qu'elles correspondent aux concentrations maximales de ces cytokines mesurées dans le fluide synovial de patients arthrosiques<sup>152, 289, 290</sup>.

Ces cytokines administrées séparément n'étaient pas capables d'induire chez l'ostéoblaste NSC les changements phénotypiques caractéristiques des ostéoblastes SC. Les différences les plus importantes concernaient les synthèses d'OC et de PTHrP. Par rapport aux ostéoblastes NSC, les ostéoblastes SC produisaient plus d'OC et moins de PTHrP. A l'inverse, les ostéoblastes NSC traités par l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou OSM produisaient moins d'OC, mais plus de PTHrP (tableau 15). Ces observations indiquent que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou l'OSM ne sont pas responsables de l'ensemble des changements phénotypiques observés chez l'ostéoblaste SC.

D'autres facteurs, mécaniques ou biochimiques pourraient être impliqués. Parmi les facteurs biochimiques, citons les TGF- $\beta$  et les IGF. Nous avons également testé ces deux facteurs de croissance sur notre modèle (résultats non montrés). Ces facteurs ne modifiaient pas significativement les productions de PAL, OC, d'IL-6 et de PTHrP par les ostéoblastes NSC. Il est donc peu probable que ces facteurs soient responsables des modifications phénotypiques de l'ostéoblaste SC. Enfin, il est important de constater que l'IL-6 et l'OSM exerçaient des effets semblables sur le métabolisme des ostéoblastes. Ces deux cytokines appartiennent à la famille des cytokines gp130. Ces cytokines présentent la caractéristique d'exercer leurs activités biologiques en se fixant à un récepteur contenant une sous-unité gp130. Cette caractéristique commune à l'IL-6 et à l'OSM pourrait expliquer que ces cytokines induisent des effets semblables sur l'ostéoblaste. Par analogie, ces cytokines exercent de nombreuses actions communes sur le chondrocyte, comme l'augmentation de synthèse de TIMP-1 et de MMP-3<sup>282</sup>.

	Ostéoblastes NSC			Ostéoblastes SC vs NSC
	+ IL-1 $\beta$	+ IL-6/IL-6sR	+ OSM	
PAL	↗	↗	↗	↗
OC	↘	↘	↘	↗
IL-6	↗	N.D.	↗	↗
IL-1 $\beta$	N.D.	↔	↔	↔
TGF- $\beta$ 1	↘	↗	↗	↗
MMP-3	↗	↗	↗	↔
TIMP-1	↗	↗	↗	↔
PTHrP	↔	↗	↗	↘

**Tableau 15** : Influence de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des ostéoblastes NSC et comparaison avec les différences phénotypiques des ostéoblastes SC. PAL : phosphatase alcaline, OC : ostéocalcine, IL : interleukine, TGF : transforming growth factor, MMP : métalloprotéinase matricielle, TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinases et PTHrP : protéine apparentée à la parathormone.

Quant à l'IL-1 $\beta$ , elle exerce des effets différents de ceux de l'IL-6 et de l'OSM. L'IL-1 $\beta$  diminue le TGF- $\beta$ 1 alors que l'IL-6 et l'OSM augmentent ce paramètre. Ces résultats sont similaires à ceux observés sur le chondrocyte<sup>282</sup>. De plus, ces résultats renforcent notre conviction que l'IL-1 $\beta$  n'est pas un facteur déterminant de la sclérose de l'os sous-chondral. En effet, les ostéoblastes SC et NSC produisent des quantités identiques d'IL-1 $\beta$ . De plus, l'IL-1 $\beta$  diminue la synthèse de TGF- $\beta$ 1, un facteur impliqué dans la sclérose de l'os. Le TGF- $\beta$ 1 stimule la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes, et augmente la formation de la matrice osseuse. Par ailleurs, il diminue la résorption osseuse et la différenciation des ostéoclastes<sup>310</sup>.

### **Les IAS favorisent le retour à l'homéostasie des ostéoblastes SC.**

Pour la première fois, nous démontrons que les IAS, utilisés en Europe dans le traitement de l'arthrose, inhibent la synthèse de PAL et d'OC par les ostéoblastes SC et diminuent la synthèse de TGF- $\beta$ 1. Nos résultats contribuent à expliquer les effets des IAS observés par l'équipe du Professeur Ghosh sur l'arthrose du genou induite

chez le mouton par ménisectomie. Ces chercheurs ont montré que les IAS diminuaient la sclérose de l'os sous-chondral<sup>233</sup>. Il existe donc plusieurs éléments plaidant en la faveur d'une action des IAS sur l'os sous-chondral.

Ensemble, ces données indiquent que les IAS sont actifs sur les ostéoblastes sous-chondraux SC et qu'ils favorisent le retour à l'homéostasie osseuse. De cette manière, ils pourraient limiter la sclérose de l'os sous-chondral et prévenir la perte du cartilage sus-jacent.

Enfin, nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle des médicaments utilisés dans le traitement de l'ostéoporose puissent également être efficaces dans le traitement de l'arthrose<sup>311</sup>. Dans un modèle d'arthrose induite chez le rat par section du ligament antérieur, l'alendronate inhibait le remodelage de l'os sous-chondral, prévenait l'apparition d'ostéophyte et diminuait l'augmentation de deux marqueurs de la dégradation du cartilage (COMP et le C-télopeptide du collagène de type II)<sup>9</sup>. Ces observations suggèrent que l'alendronate, un inhibiteur de l'ostéorésorption, pourrait protéger le cartilage en agissant sur le métabolisme de l'os sous-chondral. La sclérose de l'os sous-chondral de l'articulation arthrosique est donc une nouvelle cible thérapeutique.

## 1. Introduction

**L**a relation os-cartilage joue un rôle important dans la physiopathologie de l'arthrose. Dans l'articulation arthrosique, les microfractures ostéochondrales sont plus fréquentes<sup>14</sup>. Elles facilitent la communication entre l'os sous-chondral et le cartilage.

Il est donc possible que des médiateurs synthétisés par les ostéoblastes sous-chondraux sous-jacents influencent le métabolisme du cartilage articulaire. Le passage de facteurs biochimiques entre l'os et le cartilage a été récemment démontré par l'équipe du Professeur Pelletier (Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec). En effet, ces chercheurs ont révélé la présence du HGF dans les couches profondes du cartilage arthrosique. Or, les chondrocytes ne produisent pas de HGF mais deux isoformes de ce facteur (HGF/NK1 et HGF/NK2), qui sont des formes tronquées résultant d'un épissage alternatif du gène. Par contre, les ostéoblastes sous-chondraux synthétisent l'HGF. Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques produisent 5 fois plus d'HGF que les ostéoblastes sains<sup>15</sup>. Ces résultats suggèrent le passage d'HGF de l'os sous-chondral vers le cartilage.

D'autre part, des marqueurs du remodelage osseux, dont l'OC et la BSP, ont été trouvés dans le fluide synovial des patients arthrosiques. Les taux de ces marqueurs sont corrélés avec un épitope du kératane sulfate (5D4), un marqueur de la dégradation du cartilage<sup>16</sup>.

Enfin, Westacott et ses collaborateurs ont montré, à l'aide d'un modèle de co-culture ostéoblastes/explants de cartilage, que les ostéoblastes arthrosiques induisaient la dégradation de la matrice cartilagineuse<sup>17</sup>. Ce travail suggérait que les ostéoblastes arthrosiques produisaient des facteurs favorisant la dégradation du cartilage.

Ces éléments étayaient notre hypothèse selon laquelle des facteurs sécrétés par les ostéoblastes pourraient franchir la barrière ostéochondrale et contribuer à la dégradation du cartilage.

Cette partie de notre travail a été consacrée à la mise au point d'un modèle de co-culture mettant en présence d'une part des chondrocytes isolés à partir de cartilage arthrosique et cultivés en billes d'alginate et d'autre part des ostéoblastes provenant des zones SC ou des zones NSC de l'os sous-chondral. Nous avons quantifié l'agrécane dans la bille d'alginate et le milieu de culture. L'agrécane est synthétisée par les chondrocytes mais pas par les ostéoblastes. Cette molécule nous servira d'indicateur de l'influence des ostéoblastes sur le métabolisme des chondrocytes. Nous avons également étudié l'expression par les chondrocytes des gènes codant pour :

- × des molécules spécifiques du phénotype du chondrocyte, comme le collagène de type II ;
- × des métalloprotéinases impliquées dans la dégradation du cartilage (MMP-3 et -13) ;
- × un inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (TIMP-1) ;
- × des molécules impliquées dans la différenciation hypertrophique du chondrocytes (sox9, PTHrP/PTH-R, OSF-1, cbfa-1, PAL, collagènes de type I et X).

Nous avons également étudié l'influence des ostéoblastes pré-incubés avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des chondrocytes arthrosiques en billes d'alginate.

Enfin, nous avons évalué les effets d'un mélange d'IAS sur la communication ostéoblastes-chondrocytes.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1. DESCRIPTION DU MODELE DE CO-CULTURE

Les chondrocytes étaient placés en billes d'alginate comme précédemment décrit (voir chapitre 2, page 47). Ils étaient isolés à partir de cartilage provenant des genoux de 3 hommes (âge moyen : 55 ans). Le cartilage présentait des lésions d'arthrose de stades II et III selon l'échelle proposée par Henrotin<sup>264</sup> et détaillée à la page 46. Les billes d'alginate étaient placées dans des inserts de culture dont le fond était une membrane poreuse (pores d'1 µm, *Falcon, VWR, Bruxelles, Belgique*). Les billes d'alginate étaient maintenues 48 h dans le milieu de culture de base enrichi avec 2 % UG avant d'être placées en co-culture avec des ostéoblastes ou des fibroblastes de peau.

L'os sous-chondral était prélevé au niveau de l'extrémité fémorale de 3 hommes âgés de 48, 57 et 65 ans, et les ostéoblastes isolés comme décrit précédemment (page 92). Les ostéoblastes étaient ensuiteensemencés dans une plaque de culture 12 puits (*Flacon companion plate, VWR, Bruxelles, Belgique*) à la densité de  $10^5$  cellules par ml et par puits et cultivés 12 jours dans du milieu de base contenant 20 µg/ml de proline, 2 mM de glutamine, 50 µg/ml d'acide ascorbique,  $10^{-8}$  M de  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D<sub>3</sub>, et 2 % (v/v) d'UG. Les ostéoblastes étaient ensuite rincés avec du PBS et incubés pendant 3 jours soit avec de l'IL-1β (1,7 ng/ml), de l'IL-6 (100 ng/ml) avec son récepteur (IL-6sR, 50 ng/ml), de l'OSM (10 ng/ml) ou le mélange d'IAS (sous la forme d'un mélange composé de 1/3 d'insaponifiable d'avocat et de 2/3 d'insaponifiable de soja, 10 µg/ml). Les IAS étaient préalablement solubilisés dans du THF. Une quantité équivalente de THF [0,1 % (v/v) final] était ajoutée au milieu de culture des puits témoins. Le milieu d'incubation était composé du milieu de base contenant 1 % (v/v) d'ITS+, 20 µg/ml de proline, 2 mM de glutamine et 50 µg/ml d'acide ascorbique.

Après plusieurs rinçages avec du PBS, les chondrocytes en billes d'alginate étaient cultivés simultanément avec des fibroblastes de peau (co-culture témoin, don du Docteur Charly Lambert, Laboratoire de biologie des tissus conjonctifs, Université de Liège), ou des ostéoblastes sous-chondraux NSC ou SC en monocouche. Un nombre équivalent de chondrocytes, d'ostéoblastes ou de fibroblastes (soit environ 500.000 cellules par puits) était placé en co-culture dans 2 ml de milieu de base auquel étaient

ajoutés 20 µg/ml de proline, 2 mM de glutamine, 50 µg/ml d'acide ascorbique, 1 % d'ITS+, et en présence ou non de 5 µg/ml d'anticorps monoclonal produit chez la souris et neutralisant l'IL-6 humaine (*R&D Systems, Abington, Angleterre*).

En parallèle, des ostéoblastes, des chondrocytes et des fibroblastes étaient cultivés seuls (mono-cultures) dans les mêmes conditions. Pour chaque prélèvement, 6 puits ont été utilisés par condition expérimentale (figure 66).

Au terme de 4 jours de co-culture ou de mono-culture, les milieux de culture étaient prélevés et conservés à -20°C. Les chondrocytes étaient récupérés après dépolymérisation des billes d'alginate en respectant le protocole décrit (page 48). Les ostéoblastes et les fibroblastes étaient ensuite détachés du support de culture par l'addition de 500 µl d'une solution de trypsine 0,125 %, EDTA 0,5 mM (voir le protocole détaillé page 92). Dans le cas des cellules destinées à la biologie moléculaire, les culots cellulaires étaient, après 3 rinçages avec du PBS, homogénéisés dans 175 µl de tampon de lyse (4,5 M hydrochloride de guanidine ; 50 mM Tris-HCl ; 30 % Triton X-100 ; pH 6,6) et conservés à -70°C.

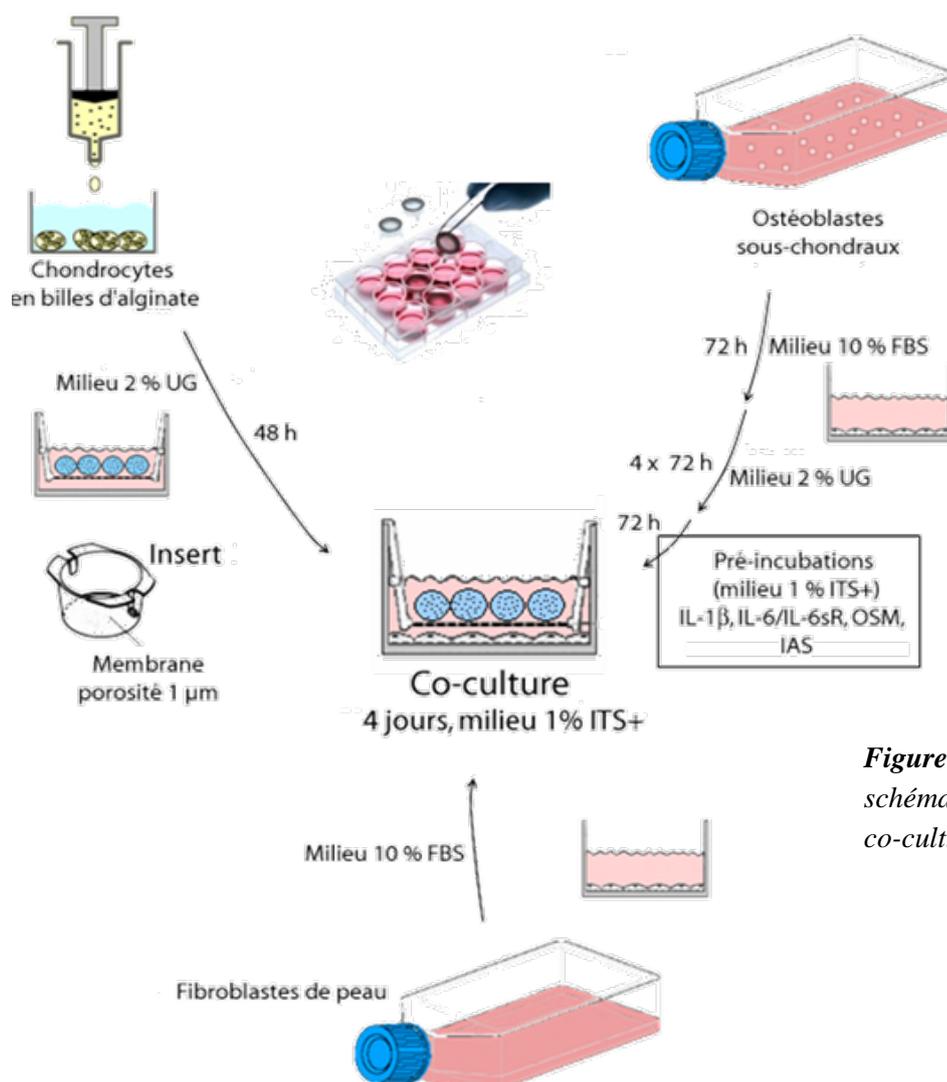


Figure 66 : Représentation schématique du modèle de co-culture.

## 2.2. DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'ANALYSE BIOCHIMIQUES

### 2.2.1. Dosage de l'ADN

L'ADN cellulaire a été quantifié selon la technique de Labarca et Paigen<sup>265</sup>. Cette technique a été décrite précédemment (page 51).

### 2.2.2. Dosage de la PAL

L'activité PAL a été quantifiée dans les extraits cellulaires. La technique est basée sur la capacité enzymatique de la PAL d'hydrolyser le p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol et en phosphate inorganique. Cette technique a été décrite précédemment (page 95).

### 2.2.3. Dosage de la LDH

Le taux de mortalité cellulaire a été évalué par la mesure de la LDH libérée dans le milieu de culture. Cette technique a été détaillée précédemment (page 51).

### 2.2.4. Dosage ELISA de l'OC

L'OC a été quantifiée dans les milieux de culture à l'aide d'un dosage ELISA commercialisé par Biosource Europe (*Fleurus, Belgique*). Les différentes étapes de ce dosage ont été décrites précédemment (page 96).

### 2.2.5. Dosage EASIA de l'agrécane

L'agrécane a été dosé par une méthode EASIA dans le surnageant de culture et dans les fractions FRM et CM de la bille d'alginate. Ce dosage a été décrit précédemment (page 52).

### 2.2.6. Etude par RT-PCR quantitative en temps réel de l'expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, PTHrP, PTH-R, OSF-1, CBFA1, PAL, COL1 et COL10 par les chondrocytes

× *Extraction des ARN totaux des chondrocytes*

Les ARN totaux d'environ 10<sup>6</sup> chondrocytes ont été isolés en utilisant une méthode de la firme Roche (« *High Pure RNA Isolation Kit* », *Bruxelles, Belgique*). Dans cette méthode, l'extrait nucléaire était filtré à travers une colonne de fibre de verre, présentant une haute affinité pour les acides nucléiques (ADN et ARN). L'ADN était ensuite éliminé par l'action d'une solution de DNase I (180 U pendant 15 minutes à

température ambiante) (*Roche, Bruxelles, Belgique*). La colonne était alors abondamment rincée et les ARN recueillis par l'éluion avec 100 µl d'eau (*Eau RNase free, Roche, Bruxelles, Belgique*) et conservés à -70°C.

La quantité d'ARN était estimée en mesurant l'absorbance à 260 nm. Le degré de pureté était déterminé par le calcul du rapport d'absorbance 260/280 nm.

× *Vérification de l'intégrité des ARN*

La préparation d'ARN était soumise à une électrophorèse en gel d'agarose 1 %. Le tampon de migration était composé de 40 mM Tris-acétate, 10 mM EDTA, 20 mM d'acide acétique glacial, pH 8,4 et de bromure d'éthidium (0,7 µg/ml). Cinq µl de la préparation d'ARN étaient déposés dans chaque puits. La migration était réalisée à voltage constant (70 Volts) durant 45 min. Enfin, les bandes d'ARN étaient visualisées en exposant le gel à un rayonnement ultraviolet.

× *Transcription inverse (RT)*

Les ARNm étaient convertis en ADN complémentaires (ADNc) par l'action de la transcriptase inverse du virus murin *Moloney leukemia* (M-MLV).

Deux µg d'ARN totaux étaient chauffés 5 min à 65°C en présence d'inhibiteur de ARNases (*RNaseOUT*, 40 U, *Invitrogen, Merelbeke, Belgique*) afin de détruire les structures secondaires. Ils étaient ensuite incubés pendant 1 h à 37°C dans un volume final de 30 µl contenant le tampon de réaction (*Invitrogen, Merelbeke, Belgique*), 10 mM de DTT (Dithiothreitol, *Sigma Aldrich, Bornem, Belgique*), 1 mM d'une solution contenant les quatre désoxyribonucléotides dATP, dTTP, dGTP, dCTP (dNTP), 500 ng d'amorce oligo(dT)<sub>15</sub> (*Roche, Bruxelles, Belgique*) et 140 U de transcriptase inverse de M-MLV (*Invitrogen, Merelbeke, Belgique*). Cette réaction était arrêtée en chauffant la préparation à 95°C pendant 5 min.

× *Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)*

L'amplification des ADNc en temps réel a été effectuée dans un thermocycleur combiné avec un spectrofluorimètre (*LightCycler, Roche, Bruxelles, Belgique*). Les réactions de polymérisation étaient réalisées en utilisant le kit « *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I* » (*Roche, Bruxelles, Belgique*). Le SYBR Green I est un fluorochrome se liant spécifiquement aux ADN doubles brins (ADNdb). A

chaque phase de synthèse de l'ADN, le produit d'amplification de la réaction de polymérisation en chaîne peut être quantifié par une lecture de fluorescence.

Le mélange réactionnel (MR) fourni dans le kit était constitué d'une solution 10 x concentrée contenant un tampon de réaction, un mélange de dNTP, le fluorochrome SYBR Green I et l'enzyme Faststart Taq DNA polymérase. Le réactif était préparé en ajoutant 3 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,5 µM d'amorces sens et anti-sens, et en ajustant le volume avec de l'eau déminéralisée. Les séquences des amorces utilisées sont reprises dans le tableau 16. A 18 µl de réactif sont ajoutés 2 µl d'échantillon ou de standard. Après une étape initiale de dénaturation (95°C, 10 min), 40 cycles de dénaturation/hybridation/élongation étaient réalisés :

- Dénaturation : 15 secondes à 95°C
- Hybridation : 5 secondes à une température suivant un gradient de 68°C vers 58°C avec un incrément de 0,5°C par cycle durant les 20 premiers cycles, suivi de 20 cycles à 58°C
- Elongation : 15 secondes à 72°C

La fluorescence des ADNdb était mesurée à la fin de chaque étape d'élongation.

Pour chaque amplification, une courbe standard (valeurs comprises entre 10<sup>6</sup> copies et 10 copies) était réalisée à partir d'ADNc purifiés codant pour le gène d'intérêt.

Afin de standardiser les nombres de copies d'ADNc dans les différents échantillons à analyser, un gène de référence, stable dans nos conditions expérimentales, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), était amplifié. L'expression standardisée d'un gène a été calculée par le rapport entre le nombre de copies de ce gène et le nombre de copies de GAPDH.

La spécificité de l'amplification était vérifiée par la vérification de la température de dénaturation. Le fluorochrome détecte tous les ADNdb incluant les éventuels produits non spécifiques. En fin d'amplification, une courbe de dénaturation était obtenue en chauffant progressivement les échantillons de 65°C jusqu'à 95°C à raison de 0,1°C/sec. La fluorescence était mesurée en continu durant cette lente montée en température. La dénaturation de l'ADNdb en ADN simple brin se détecte par une perte rapide de la fluorescence. Elle apparaît à une température spécifique dite de dénaturation. Cette température est dépendante du contenu en GC, de la longueur et

de la séquence du produit d'amplification. Nous avons également vérifié la taille des fragments amplifiés sur électrophorèse en gel d'agarose 1,7 %.

× *Choix des amorces*

Pour chaque gène d'intérêt, les amorces ont été construites de façon à cibler spécifiquement le messager du gène étudié à partir des séquences disponibles sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. A partir de l'ADNc, un couple d'amorces d'environ 16 à 20 bases encadrant une zone de 300 à 600 pb du gène, était défini à l'aide du logiciel *LigthCycler Probe Design* (Roche, Bruxelles, Belgique). La spécificité des amorces (sites de fixation sur la matrice, formation de dimères, longueur et nombres de fragments amplifiés et température optimale d'hybridation ou Tm) était évaluée grâce à ce logiciel et à l'algorithme BLAST de la banque génomique (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Il était vérifié que chacun des amplicons incluait au moins un intron afin d'exclure toute contamination génomique. La position des introns est obtenue dans la banque EID (*The Exon Intron Database of Eucaryotic Organisms*). Les couples d'amorces étaient commandés chez Invitrogen (*Merelbeke, Belgique*).

### 2.3. CALCULS ET ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats ont été exprimés en quantité d'agrécan par µg d'ADN contenue dans les différents compartiments de la culture (surnageant, FRM et CM) ou en nombre de copies d'ARNm des gènes étudiés rapporté à celui de GAPDH.

La moyenne et l'écart-type réduit (SEM) ont été calculés pour chaque condition de culture. Les moyennes obtenues ont été comparées par le test de Mann-Whitney. Ce test statistique a été décrit à la page 55.

ADNc à amplifier		Séquence des amorces
h GAPDH	sens	5'-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3'
	anti-sens	5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3'
h AGG	sens	5'-GCACCATGCCTTCTGCTTCCGAG-3'
	anti-sens	5'-CTCCACTGCCTGTGAAGTCACCAC-3'
h COL2A1	sens	5'-TGCTGCCCAGATGGCTGGAGGA-3'
	anti-sens	5'-TGCCTTGAAATCCTTGAGGCC-3'
h COL1A1	sens	5'-AGTTCGAGTATGGCGG-3'
	anti-sens	5'-CAGTGACGCTGTAGGT-3'
h COL10	sens	5'-GGGAGTGCCATCATCG-3'
	anti-sens	5'-GAGGCTTCACATACGTTT-3'
h SOX9	sens	5'-ACAACCCGTCTACACACAGC-3'
	anti-sens	5'-ACGATTCTCCATCATCCTCC-3'
h MMP-3	sens	5'-ATGAGGTACGAGCTGG-3'
	anti-sens	5'-TCACGCTCAAGTTCCC-3'
h MMP-13	sens	5'-CAACGGACCCATACAG-3'
	anti-sens	5'-ACAGACCATGTGTCCC-3'
h TIMP-1	sens	5'-TTCCGACCTCGTCATCAG-3'
	anti-sens	5'-TGAGAAACTCCTCGCT-3'
h PTHrP	sens	5'-CGGAGACTGGTTCAGC-3'
	anti-sens	5'-GTGTGGATTTCTGCGATCA-3'
h PTH-R	sens	5'-ACCATACACCGAGGTC-3'
	anti-sens	5'-CGTGCCTTTTCGCTTGA-3'
h PAL	sens	5'-GCTGTAAGGACATCGCC-3'
	anti-sens	5'-AGTGCTTGTATCTCGGT-3'

**Tableau 16** : Séquences des amorces utilisées.

### 3. Résultats

#### 3.1. INFLUENCE DES OSTEOBLASTES SOUS-CHONDRAUX SUR LE METABOLISME DES CHONDROCYTES EN CO-CULTURE

##### 3.1.1. Etude du contenu en ADN et de la viabilité cellulaire

Le contenu en ADN des cultures d'ostéoblastes et de chondrocytes restait stable pendant les 4 jours de co-culture. A la lecture du tableau 17, il apparaît également qu'à la fin de la co-culture, le contenu en ADN était identique dans les cultures d'ostéoblastes et de chondrocytes, indiquant qu'un nombre semblable de cellules de chaque type ont été co-cultivées. Nous avons également observé que la culture simultanée d'ostéoblastes et de chondrocytes n'influçait pas significativement la viabilité de ces cellules. En effet, le nombre de chondrocytes et d'ostéoblastes incorporant le bleu trypan était identique à celui observé lorsque ces cellules étaient cultivées séparément. De même, la quantité de LDH libérée dans le surnageant de la co-culture n'était pas supérieure à la somme des LDH mesurées dans les surnageants des mono-cultures d'ostéoblastes et de chondrocytes (résultats non illustrés).

Enfin, signalons que la quantité d'ADN contenue dans les cultures de fibroblastes de peau n'était pas modifiée par la présence des chondrocytes et, inversement, que la quantité d'ADN des chondrocytes n'était pas influçée par les fibroblastes.

		Types de cellules			
		Chondrocytes	Ostéoblastes NSC	Ostéoblastes SC	Fibroblastes de peau
Conditions de culture	Mono-culture	3,4 ± 0,2	3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,4	2,9 ± 0,4
	Co-culture chondrocytes/ostéoblastes	3,5 ± 0,4	3,2 ± 0,3	/	/
	Co-culture chondrocytes/ostéoblastes	3,4 ± 0,2	/	3,3 ± 0,4	/
	Co-culture chondrocytes/fibroblastes	3,3 ± 0,3	/	/	3,1 ± 0,2

**Tableau 17 :** Contenu en ADN en µg par puits après 4 jours de culture. Les résultats sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9).

### 3.1.2. Etude de la synthèse d'agrécan

Lorsque les chondrocytes en billes d'alginate étaient cultivés simultanément avec des ostéoblastes SC, le contenu en agrécane des billes d'alginate était diminué de  $27 \pm 7 \%$  ( $p < 0,001$ ). Par contre, les ostéoblastes NSC et les fibroblastes de peau ne modifiaient pas significativement la quantité d'agrécan des billes d'alginate (tableau 18). Cette diminution était plus importante dans la matrice péri-cellulaire (fraction CM :  $-45 \%$ ,  $p < 0,01$ ) que dans la matrice interterritoriale (FRM :  $-20 \%$ ,  $p < 0,05$ ). La quantité d'agrécan dans le milieu de culture (S) n'était pas significativement modifiée en co-culture.

	Distribution de l'agrécan (ng/ $\mu$ g d'ADN)				
	FRM	CM	S	Total (FRM + CM + S)	FRM/CM/S (%)
Chondrocytes en mono-culture	6.235 $\pm$ 91	2.212 $\pm$ 32	24 $\pm$ 4	8.471 $\pm$ 127	73,6/ 26,1/ 0,3
Co-culture chondrocytes/ostéoblastes NSC	5.798 $\pm$ 313	1.625 $\pm$ 169 *	26 $\pm$ 3	7.449 $\pm$ 485	77,8/ 21,8/ 0,4
Co-culture chondrocytes/ostéoblastes SC	4.963 $\pm$ 301 *	1.236 $\pm$ 191 **	23 $\pm$ 3	6.222 $\pm$ 495 ***	79,8/ 19,9/ 0,3
Co-culture chondrocytes/fibroblastes	6.215 $\pm$ 602	2.184 $\pm$ 205	19 $\pm$ 2	8.418 $\pm$ 809	73,8/ 26,0/ 0,2

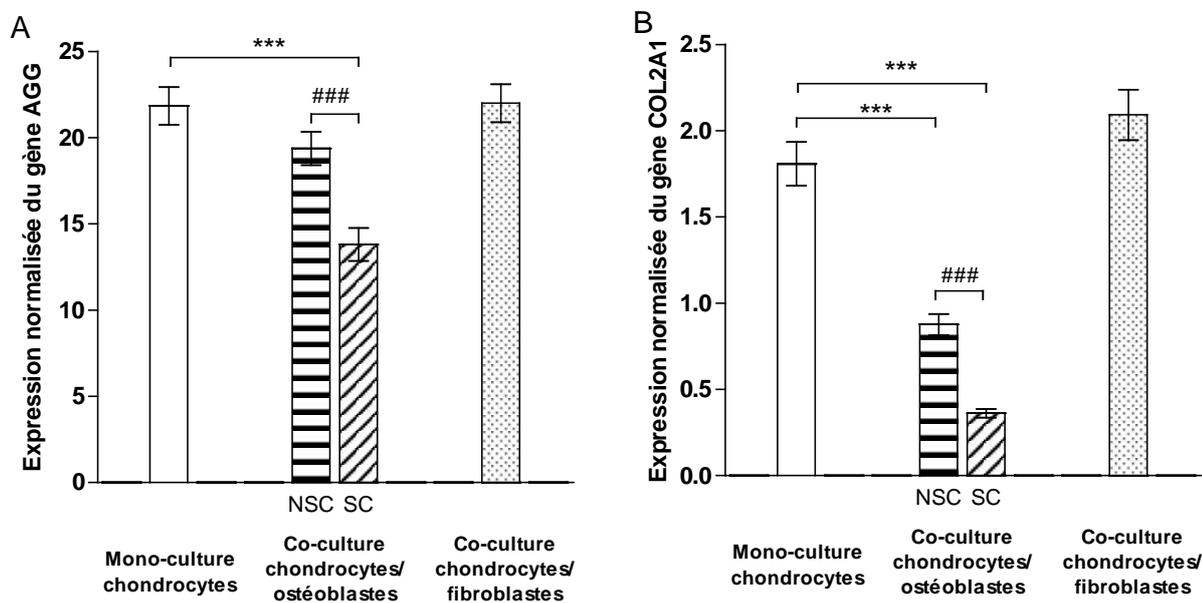
**Tableau 18** : Concentration en agrécane des différents compartiments de la culture en billes d'alginate après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes NSC ou SC, ou de fibroblastes de peau. FRM = matrice interterritoriale, CM = matrice associée aux cellules, S = surnageant. Les résultats sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). Les différences statistiques entre le groupe mono-culture et les groupes co-cultures sont représentées par \* pour  $p < 0,05$  et par \*\*\* pour  $p < 0,001$ .

### 3.1.3. Etude de l'expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, CBFA1, COL1, COL10 et PAL par les chondrocytes

#### A. Expression des gènes des protéines matricielles (AGG et COL2)

La concentration en ARNm codant pour l'agrécan n'était pas modifiée par les ostéoblastes NSC, mais significativement diminuée par les ostéoblastes SC ( $p < 0,001$ , figure 67A). Par contre, en présence d'ostéoblastes, l'expression par les chondrocytes du gène codant pour le collagène de type II (COL2) était significativement diminuée ( $p < 0,001$ , figure 67B). Cependant, la diminution était significativement plus importante en présence d'ostéoblastes SC que d'ostéoblastes NSC (SC : - 78 % vs NSC : - 52 %,  $p < 0,001$ ).

La présence de fibroblastes de peau n'influçait pas significativement l'expression de ces gènes par les chondrocytes (figure 67).



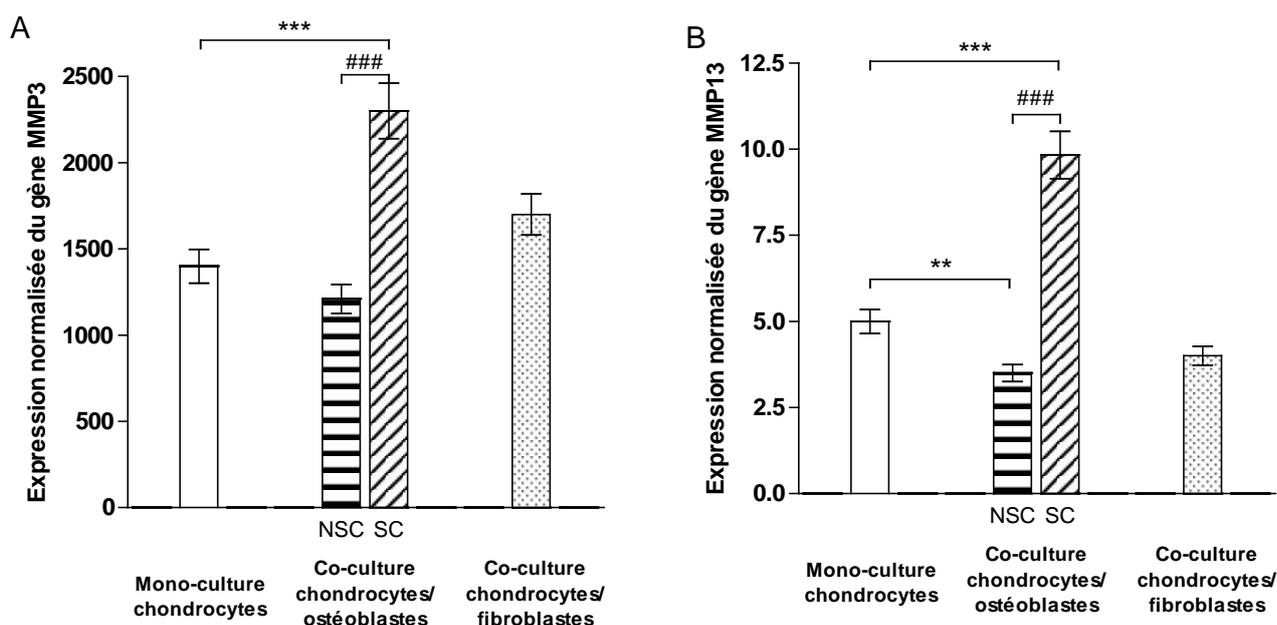
**Figure 67 :** Expression du gène AGG (A) et COL2 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes NSC ou SC. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). Les différences statistiques sont représentées par \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC.

## B. Expression des gènes des enzymes de la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-3 et MMP-13) et de leur inhibiteur (TIMP-1)

L'expression par les chondrocytes des gènes codant pour MMP-3 et MMP-13 était respectivement 1,65 et 2 fois plus élevée en co-culture avec des ostéoblastes SC que dans la mono-culture de chondrocytes ( $p < 0,001$ , figure 68). Les ostéoblastes NSC n'influençaient pas l'expression de MMP-3 mais diminuaient celle de MMP-13 ( $p < 0,01$ ).

L'expression du gène codant pour TIMP-1 n'était pas influencée par la présence d'ostéoblastes (expression par les chondrocytes en mono-culture :  $184 \pm 9$  copies par 100 copies du gène GAPDH vs  $195 \pm 10$  pour les chondrocytes cultivés avec des ostéoblastes NSC et  $201 \pm 10$  avec des ostéoblastes SC).

La présence de fibroblastes de peau n'influençait pas significativement l'expression de ces gènes par les chondrocytes (figure 68).



**Figure 68 :** Expression du gène MMP-3 (A) et MMP-13 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes NSC ou SC. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple ( $n=9$ ). Les différences statistiques sont représentées par \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC.

### **C. Expression des gènes de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL)**

En présence d'ostéoblastes, l'expression par les chondrocytes du gène codant pour *sox9* était significativement diminuée ( $p < 0,001$ , tableau 19). Cependant, la diminution était significativement plus importante en présence d'ostéoblastes SC que d'ostéoblastes NSC (SC : -62 % vs NSC : -28 %,  $p < 0,001$ ).

Quand les chondrocytes étaient co-cultivés avec des ostéoblastes sous-chondraux, le taux d'ARNm codant pour OSF-1 était significativement augmenté. De nouveau, l'augmentation était significativement plus importante en présence d'ostéoblastes SC que d'ostéoblastes NSC (SC : +170 % vs NSC : +35 %,  $p < 0,01$ ).

L'expression du gène PTHrP par les chondrocytes était multipliée par 21 en présence d'ostéoblastes NSC ( $p < 0,001$ ). A l'inverse, la concentration d'ARNm codant pour le PTHrP était diminuée de 75 % en présence d'ostéoblastes SC ( $p < 0,001$ ). En parallèle, l'expression de PTH-R par les chondrocytes était augmentée de 23 % en co-culture avec des ostéoblastes NSC ( $p < 0,05$ ), mais diminuée de 37 % en co-culture avec des ostéoblastes SC ( $p < 0,001$ ).

Enfin, notons que la présence de fibroblastes de peau n'influait pas significativement l'expression des différents gènes étudiés dans ce travail et que les gènes codant pour le collagène de type I, de type X, la PAL, et *cbfa-1* n'étaient pas détectables dans nos conditions expérimentales.

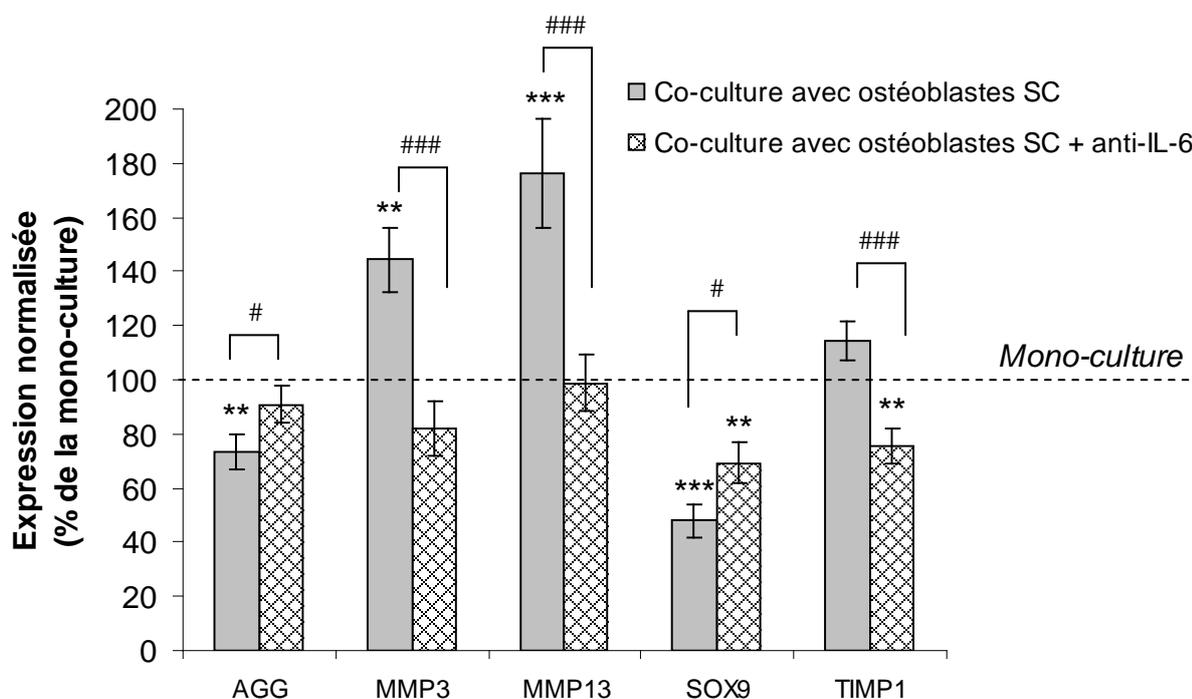
Gènes étudiés  (nombre de copies x 100 / nombre de copies de GAPDH)	Conditions de culture des chondrocytes			
	Mono-culture	Co-culture Ostéoblastes NSC	Co-culture Ostéoblastes SC	Co-culture Fibroblastes
COL1	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
COL10	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
SOX9	14,25 ± 0,71	<b>10,11 ± 0,51<sup>***</sup></b>	<b>5,40 ± 0,27<sup>***, ###</sup></b>	14,06 ± 0,70
CBFA1	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
PTHrP	0,60 ± 0,01	<b>10,11 ± 0,64<sup>***</sup></b>	<b>0,14 ± 0,01<sup>***, ###</sup></b>	0,35 ± 0,02
PTH-R	1,98 ± 0,17	<b>2,43 ± 0,21<sup>*</sup></b>	<b>1,25 ± 0,11<sup>***, ###</sup></b>	2,00 ± 0,15
OSF-1	2,30 ± 0,24	<b>3,10 ± 0,28<sup>*</sup></b>	<b>6,20 ± 0,34<sup>***, ###</sup></b>	1,99 ± 0,17
PAL	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

**Tableau 19** : Effet de la co-culture sur l'expression de COL1, COL10, SOX9, CBFA1, PTHrP, PTH-R, OSF-1 et PAL par le chondrocyte après 4 jours de culture. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \* = p<0,05 ; \*\* = p<0,01 et \*\*\* = p<0,001 entre la co-culture et la mono-culture; ### = p<0,001 entre les ostéoblastes NSC et SC.

### 3.2. INFLUENCE D'UN ANTICORPS ANTI-IL-6 SUR LES EFFETS DES OSTEOBLASTES SC SUR LE METABOLISME DES CHONDROCYTES

Nous avons recherché l'influence de l'IL-6 dans les effets des ostéoblastes SC sur le métabolisme des chondrocytes. Dans ce but, nous avons ajouté au milieu nutritif de la co-culture un anticorps monoclonal neutralisant l'activité biologique de l'IL-6 humaine.

Nous avons observé que la neutralisation de l'IL-6 empêchait les effets des ostéoblastes SC sur l'expression par les chondrocytes des gènes AGG, MMP-3 et MMP-13. De plus, elle diminuait l'inhibition de SOX9 induite par les ostéoblastes SC. Par contre, l'anticorps anti-IL-6 provoquait une diminution de l'expression du gène codant pour TIMP-1 (25 % par rapport à la mono-culture,  $p < 0,01$ , figure 69).



**Figure 69 :** Expression des gènes AGG, MMP-3, MMP-13, SOX9 et TIMP-1 par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes SC. La co-culture se déroulait en présence ou non d'anticorps anti-IL-6 (5 µg/ml). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la mono-culture (le nombre de copies des gènes étudiés avaient préalablement été normalisé par rapport au gène GAPDH) et sont représentés par la moyenne de 2 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=6). Les différences statistiques sont représentées par \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture et # =  $p < 0,01$  et ### =  $p < 0,001$  entre la co-culture réalisée avec ou sans anticorps anti-IL-6.

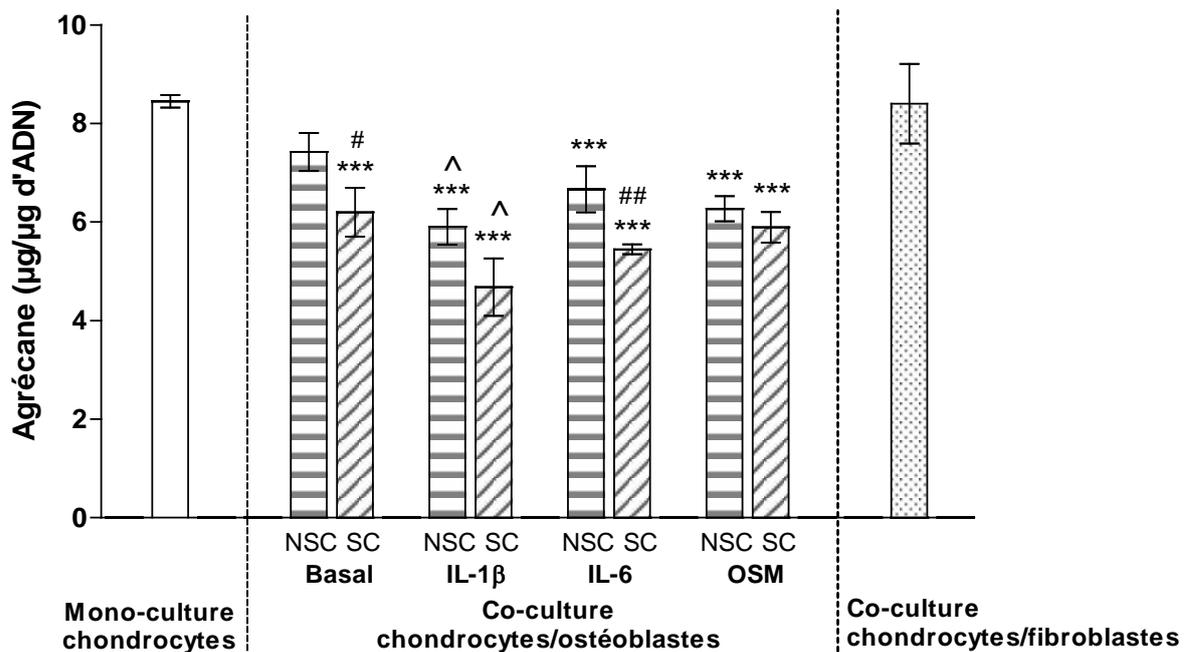
### 3.3. EFFET DE LA PRE-INCUBATION DES OSTEOBLASTES AVEC DE L'IL-1 $\beta$ , DE L'IL-6 OU DE L'OSM SUR LE METABOLISME DES CHONDROCYTES.

#### 3.3.1. Etude du contenu en ADN et de la viabilité cellulaire

La pré-incubation des ostéoblastes avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM n'influait ni le contenu en ADN, ni la viabilité des ostéoblastes et des chondrocytes en co-culture.

#### 3.3.2. Etude de la synthèse en agrécane

En co-culture, les ostéoblastes NSC n'influaient pas la synthèse en agrécane des chondrocytes, alors que les ostéoblastes SC diminuaient cette production. Lorsque les ostéoblastes NSC étaient pré-incubés (3 jours) avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM avant d'être placés en co-culture, ils induisaient une diminution significative de la synthèse d'agrécane par les chondrocytes ( $p < 0,001$ , figure 70). L'amplitude de l'effet était identique à celle obtenue avec des ostéoblastes SC.



**Figure 70 :** Production totale d'agrécane par les chondrocytes en billes d'alginate après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 1,7 ng/ml d'IL-1 $\beta$ , 100 ng d'IL-6 et 50 ng d'IL-6sR ou 10 ng/ml d'OSM. Les résultats sont exprimés en µg d'agrécane par µg d'ADN et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, # =  $p < 0,05$  et ## =  $p < 0,01$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^ =  $p < 0,05$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec une cytokine.

### **3.3.3. Etude de l'expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, CBFA1, COL1, COL10 et PAL par les chondrocytes**

#### **A. Expression des gènes des protéines matricielles (AGG et COL2)**

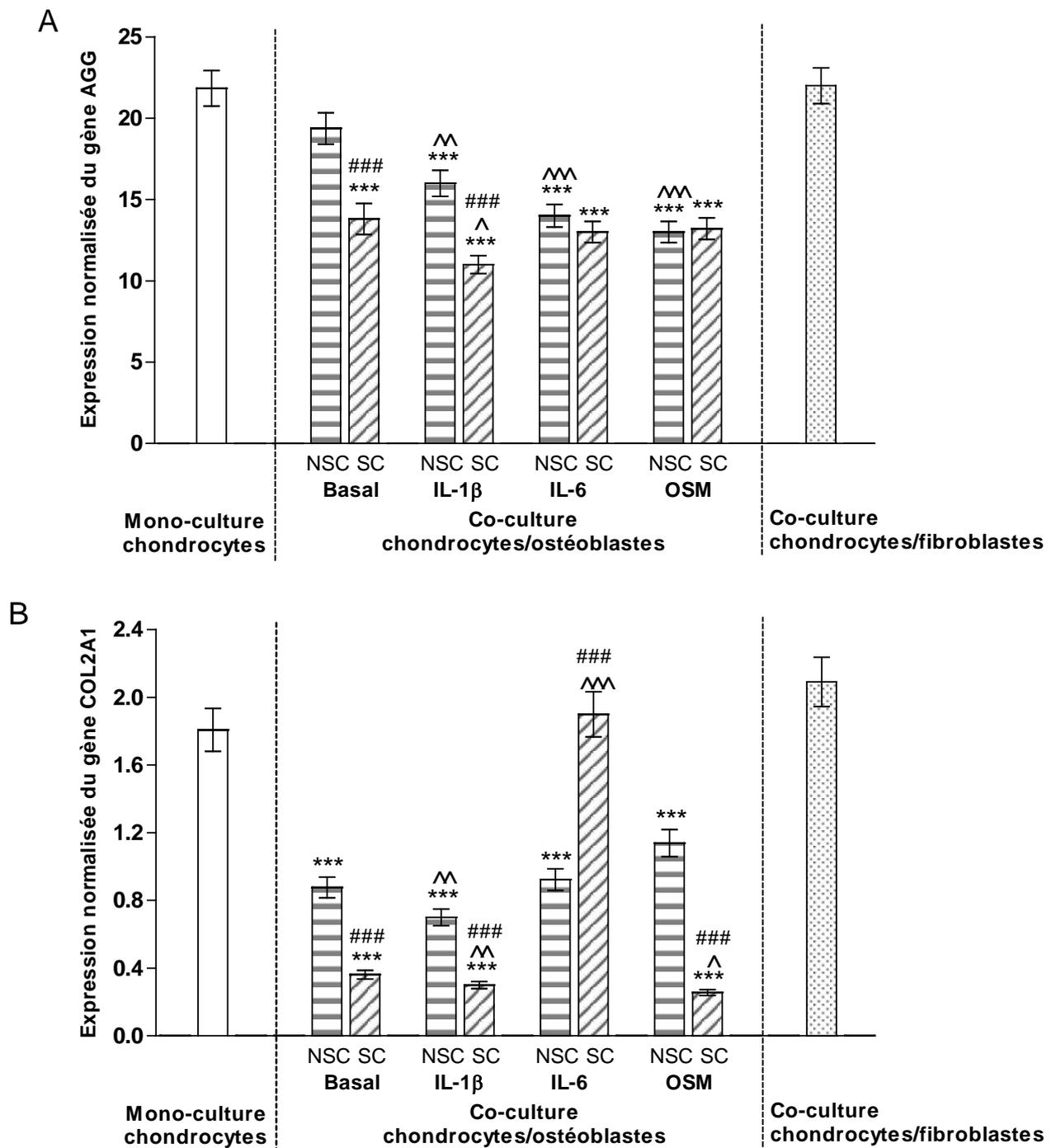
En co-culture, les ostéoblastes SC inhibaient l'expression des gènes AGG et COL2 par les chondrocytes ( $p < 0,001$ ). Les ostéoblastes NSC réduisaient également l'expression du gène COL2 ( $p < 0,001$ ), mais cette diminution était significativement moins importante que celle induite par les ostéoblastes SC ( $p < 0,001$ ). Ces effets étaient accentués lorsque les ostéoblastes étaient pré-incubés avec de l'IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ , figures 71A et B). A l'inverse, la pré-incubation des ostéoblastes avec de l'IL-6 prévenait complètement l'inhibition induite par les ostéoblastes SC sur le gène COL2 ( $p < 0,001$ , figure 71B), mais pas celle induite par les ostéoblastes NSC. L'OSM accentuait l'inhibition induite par les ostéoblastes SC sur l'expression du gène COL2 ( $p < 0,05$ ), mais pas celle induite par les ostéoblastes NSC (figure 71B).

#### **B. Expression des gènes des enzymes de la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-3 et MMP-13) et de leur inhibiteur (TIMP-1)**

En co-culture, les ostéoblastes NSC ne modifiaient pas l'expression des gènes MMP-3, MMP-13 et TIMP-1 par les chondrocytes. Par contre, lorsqu'ils étaient incubés 3 jours avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM avant d'être placés en co-culture, les ostéoblastes NSC augmentaient significativement l'expression des gènes MMP-3 et MMP-13 par les chondrocytes ( $p < 0,001$ , figure 72).

De même, la pré-incubation des ostéoblastes SC avec l'IL-1 $\beta$  augmentait de façon significative leur effet stimulant sur l'expression des gènes MMP-3 et MMP-13 ( $p < 0,001$ , figure 72). Une pré-incubation des ostéoblastes SC avec de l'IL-6 ou de l'OSM provoquait un effet similaire sur l'expression de la MMP-13. Par contre, aucun effet n'était observé sur l'expression de MMP-3.

Enfin, l'incubation préalable des ostéoblastes avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM ne modifiait pas significativement l'expression de TIMP-1 par les chondrocytes.



**Figure 71 :** Expression du gène AGG (A) et COL2 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 1,7 ng/ml d'IL-1 $\beta$ , 100 ng d'IL-6 et 50 ng d'IL-6sR ou 10 ng/ml d'OSM. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et sont représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^ =  $p < 0,05$ ; ^ =  $p < 0,01$  et ^^ =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec une cytokine.



### **C. Expression des gènes de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL)**

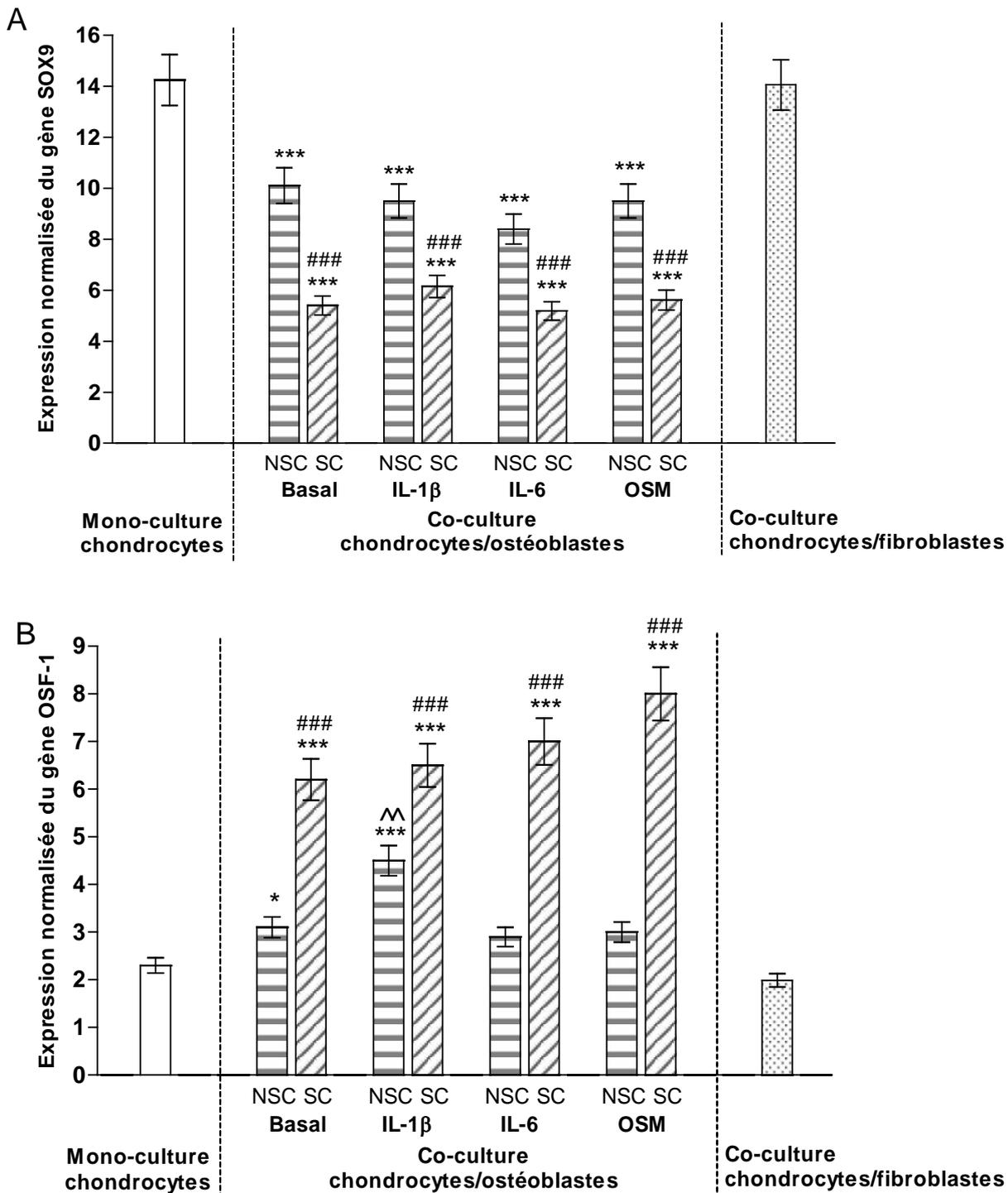
En co-culture, l'expression de SOX9 par les chondrocytes était inhibée par les ostéoblastes NSC et SC. La pré-incubation des ostéoblastes NSC et SC par l'IL-1 $\beta$ , ou l'OSM ne modifiait pas significativement cet effet (figure 73A).

Dans les conditions basales, les ostéoblastes SC stimulaient très significativement l'expression du gène OSF-1, alors que les ostéoblastes NSC n'avaient pas d'effet significatif. Lorsqu'ils étaient pré-incubés avec de l'IL-1 $\beta$ , les ostéoblastes NSC induisaient une augmentation significative de l'expression du gène OSF-1 ( $p < 0,01$ ). Cependant, l'effet était significativement inférieur à celui observé avec les ostéoblastes SC ( $p < 0,001$ ). L'IL-6 et l'OSM étaient sans effet sur ce paramètre (figure 73B).

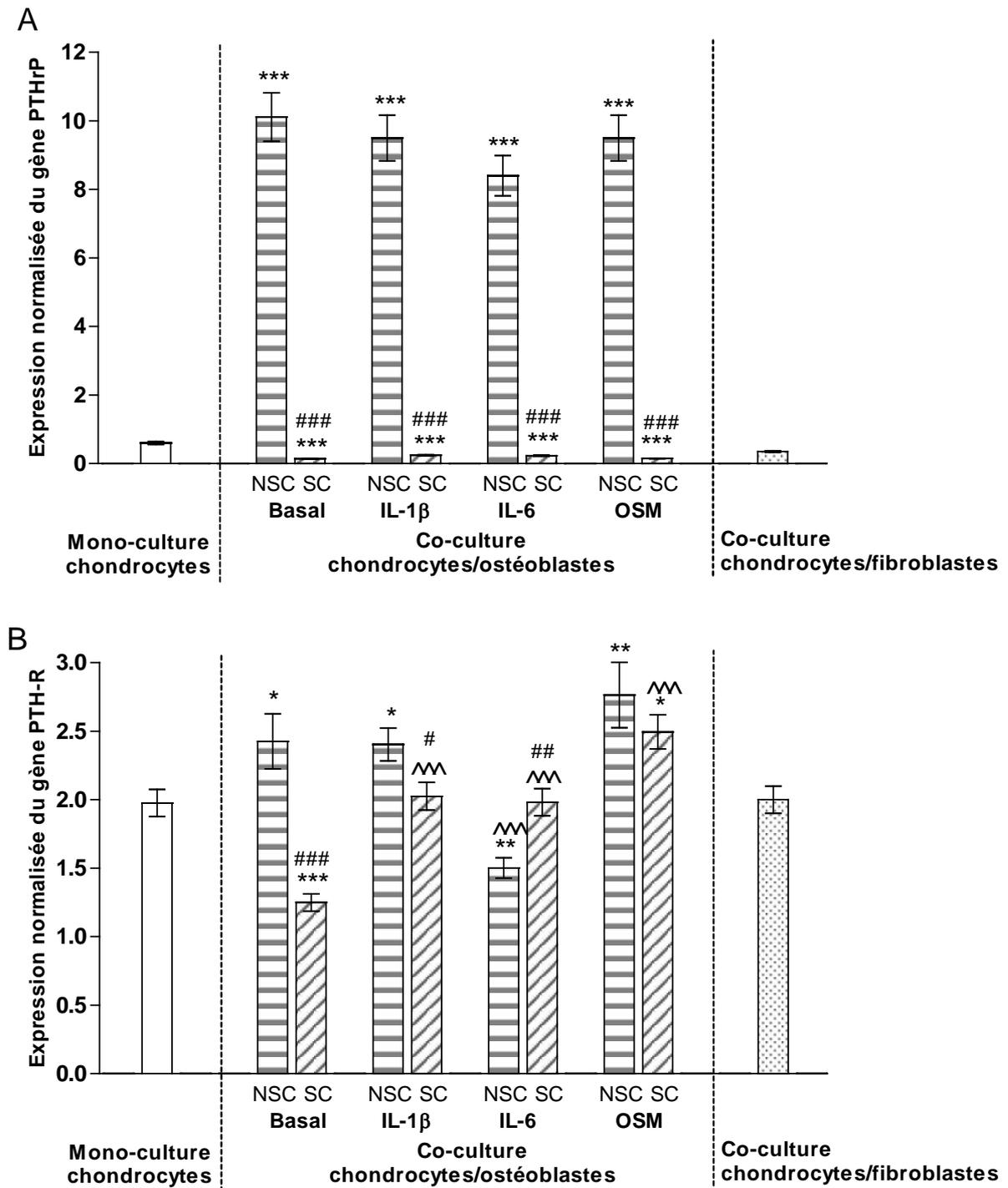
Pour rappel, les ostéoblastes NSC stimulaient l'expression du gène PTHrP par les chondrocytes, tandis que les ostéoblastes SC exerçaient un effet inhibiteur sur ce gène. La pré-incubation des ostéoblastes avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM ne modifiait pas ces effets (figure 74A).

Parallèlement, les ostéoblastes NSC augmentaient l'expression du récepteur pour la PTH (PTH-R), alors que les ostéoblastes SC inhibaient l'expression de ce gène. Lorsqu'ils étaient pré-incubés avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM, les ostéoblastes SC n'exerçaient plus leur effet inhibiteur sur l'expression de PTH-R par les chondrocytes ( $p < 0,001$ , figure 74B). Par contre, une pré-incubation des ostéoblastes NSC avec de l'IL-6 provoquait une inhibition du gène PTH-R ( $p < 0,001$ , figure 74B).

Après 4 jours de co-culture avec des ostéoblastes, les chondrocytes arthrosiques n'exprimaient pas les gènes codant pour cbfa-1, PAL, les collagènes de type I ou de type X. La pré-incubation des ostéoblastes avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM n'induisait pas l'expression de ces gènes par les chondrocytes.



**Figure 73 :** Expression du gène SOX9 (A) et OSF-1 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 1,7 ng/ml d'IL-1 $\beta$ , 100 ng d'IL-6 et 50 ng d'IL-6sR ou 10 ng/ml d'OSM. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \* =  $p < 0,05$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^ =  $p < 0,01$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec une cytokine.



**Figure 74 :** Expression du gène PTHrP (A) et PTH-R (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 1,7 ng/ml d'IL-1 $\beta$ , 100 ng d'IL-6 et 50 ng d'IL-6sR ou 10 ng/ml d'OSM. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes  $\pm$  SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, # =  $p < 0,05$  ; ## =  $p < 0,01$  et ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^^ =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec une cytokine.

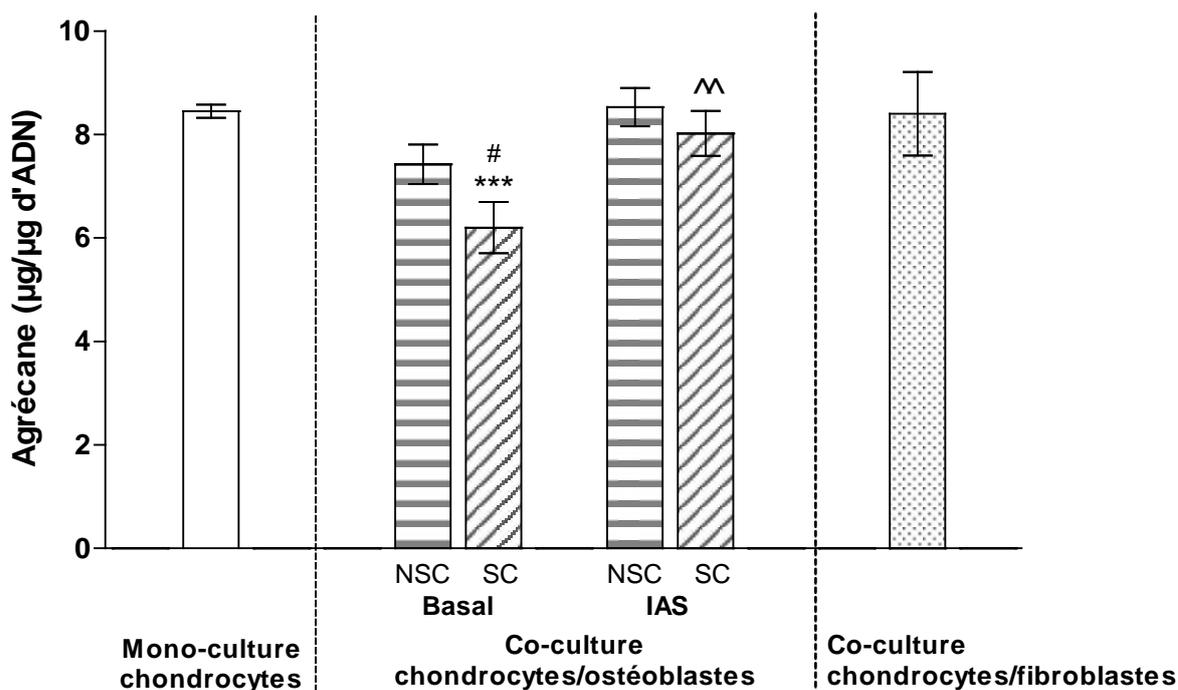
### 3.4. INFLUENCE DE LA PRE-INCUBATION DES OSTEOBLASTES AVEC UN MELANGE D'IAS SUR LE METABOLISME DES CHONDROCYTES

#### 3.4.1. Etude du contenu en ADN et de la viabilité cellulaire

La pré-incubation des ostéoblastes avec les IAS (10 µg/ml) n'influçait ni le contenu en ADN ni la viabilité des ostéoblastes et des chondrocytes en co-culture.

#### 3.4.2. Etude de la synthèse d'agrécane

Alors que les ostéoblastes SC inhibaient fortement le contenu en agrécane des billes d'alginate, les ostéoblastes pré-incubés avec le mélange IAS n'avaient aucun effet sur ce paramètre ( $p < 0,01$ , figure 75).



**Figure 75 :** Production totale d'agrécane par les chondrocytes en billes d'alginate après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 10 µg/ml d'IAS. Les résultats sont exprimés en µg d'agrécane par µg d'ADN et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, # =  $p < 0,05$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^ =  $p < 0,01$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec les IAS.

### **3.4.3. Etude de l'expression des gènes AGG, COL2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1, SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, CBFA1, COL1, COL10 et PAL par les chondrocytes**

#### **A. Expression des gènes des protéines matricielles (AGG et COL2)**

Les ostéoblastes SC inhibaient fortement l'expression des gènes AGG et COL2 par les chondrocytes. Par contre, les ostéoblastes pré-incubés avec le mélange IAS n'avaient plus d'influence sur l'expression du gène AGG ( $p < 0,001$ , figure 76A). De plus, les ostéoblastes NSC ou SC pré-incubés avec les IAS stimulaient l'expression du gène COL2 ( $p < 0,001$ , figure 76B).

#### **B. Expression des gènes des enzymes de la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-3 et MMP-13) et de leur inhibiteur (TIMP-1)**

En co-culture, les ostéoblastes NSC et SC augmentaient très significativement l'expression des gènes MMP-3 et MMP-13 ( $p < 0,001$ ), mais n'avaient pas d'effet sur l'expression de TIMP-1. La pré-incubation des ostéoblastes avec les IAS ne modifiait pas significativement ces réponses (figure 77).

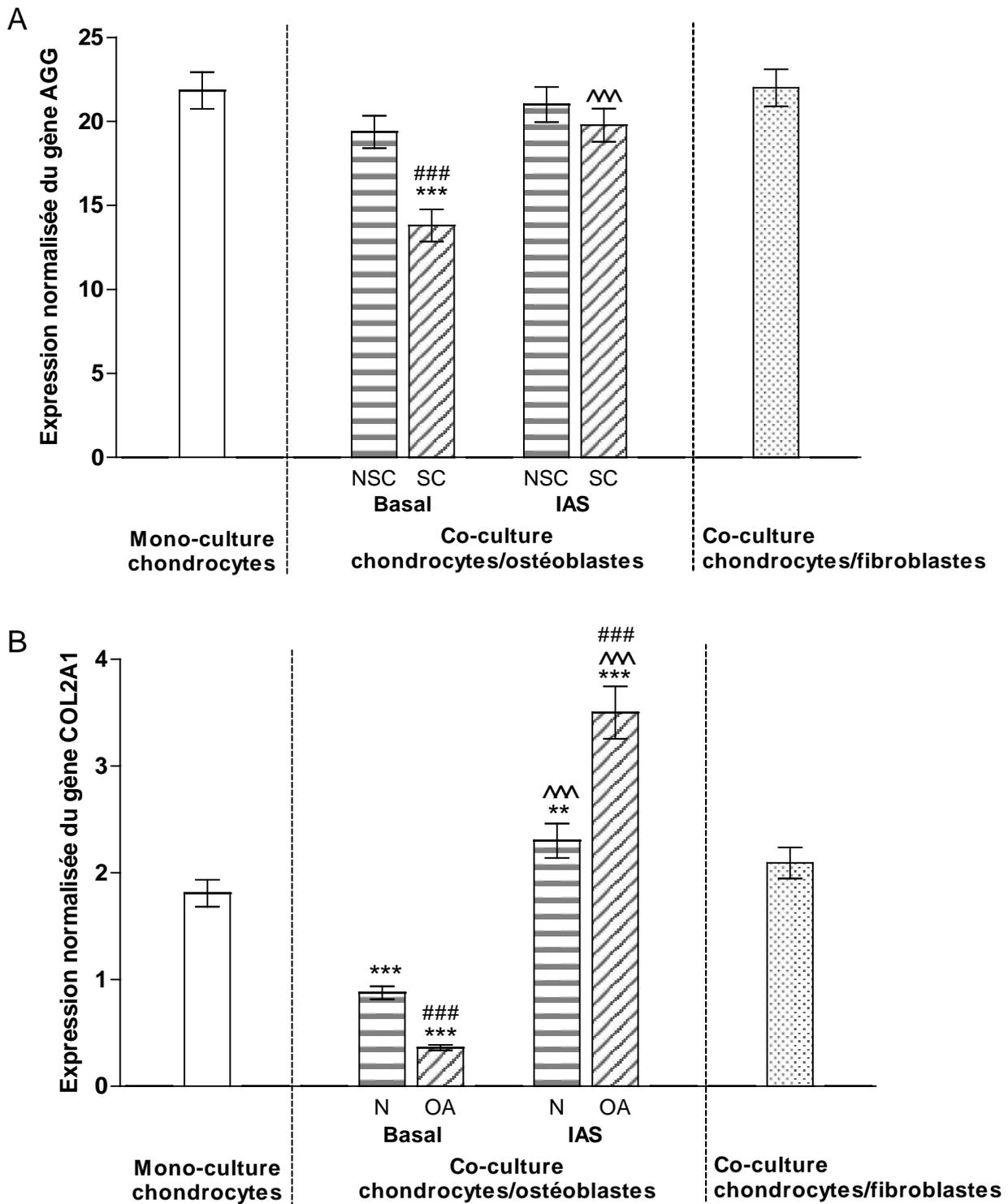
#### **C. Expression des gènes de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (SOX9, OSF-1, PTHrP, PTH-R, COL1, COL10, CBFA1 et PAL)**

Les ostéoblastes induisaient une inhibition de l'expression du gène SOX9 par les chondrocytes ( $p < 0,001$ ). La pré-incubation des ostéoblastes avec IAS ne modifiait pas significativement cet effet (figure 78A).

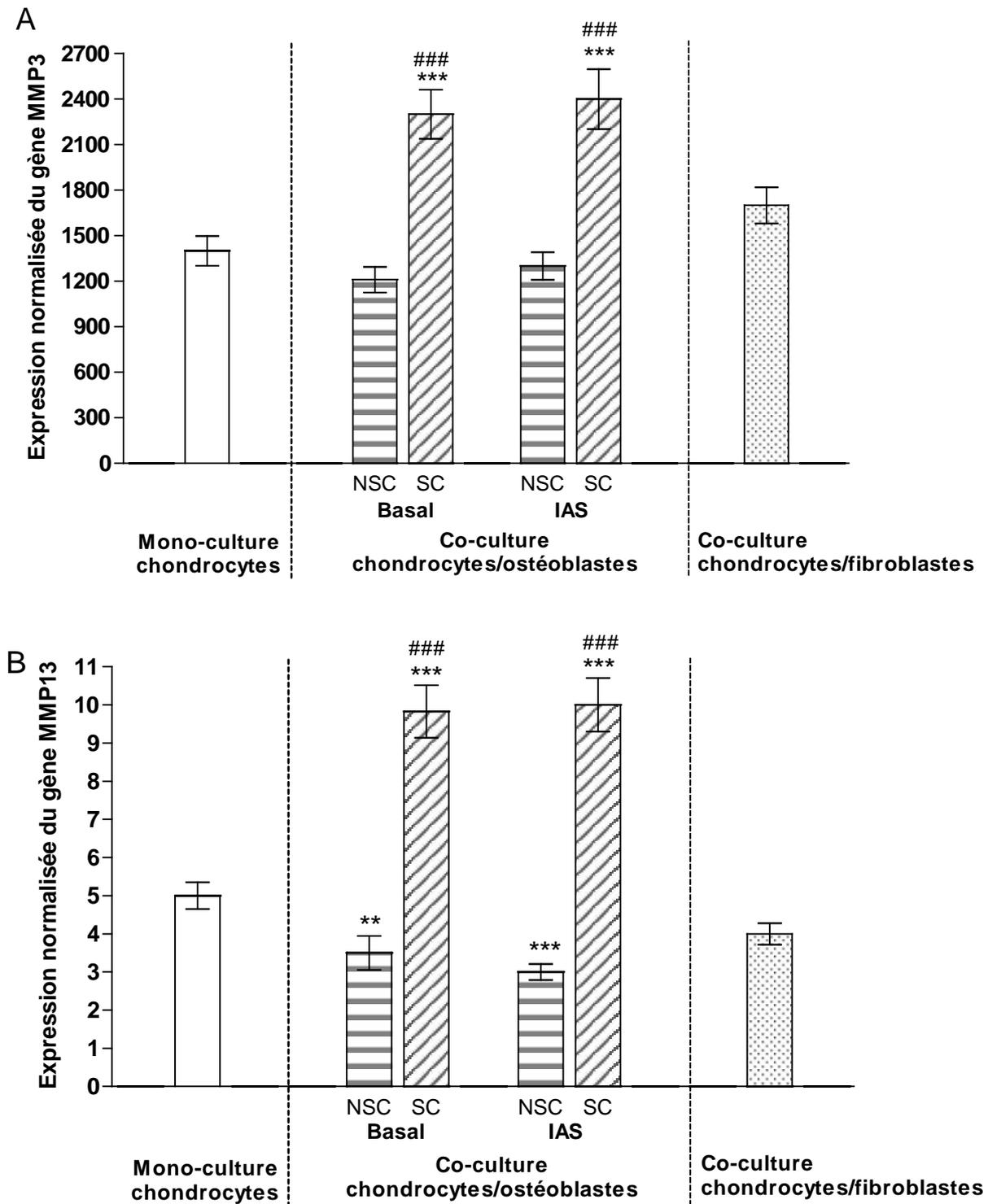
En co-culture avec des ostéoblastes SC, les chondrocytes exprimaient significativement plus le gène codant pour l'OSF-1 que lorsqu'ils étaient cultivés en mono-culture ou en présence d'ostéoblastes NSC ou de fibroblastes ( $p < 0,001$ ). Cet effet était significativement diminué lorsque les ostéoblastes SC étaient préalablement incubés avec le mélange d'IAS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $p < 0,001$ , figure 78B)

En co-culture, les ostéoblastes SC inhibaient l'expression du gène PTHrP par les chondrocytes ( $p < 0,001$ ). Cet effet était totalement modifié par le traitement des ostéoblastes avec le mélange IAS. En effet, une pré-incubation des ostéoblastes pendant 3 jours avec les IAS stimulait significativement l'expression du gène PTHrP par les chondrocytes ( $p < 0,001$ , figure 79A). Par contre, la pré-incubation des ostéoblastes avec les IAS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ne modifiait pas significativement l'expression de PTH-R par les chondrocytes (figure 79B).

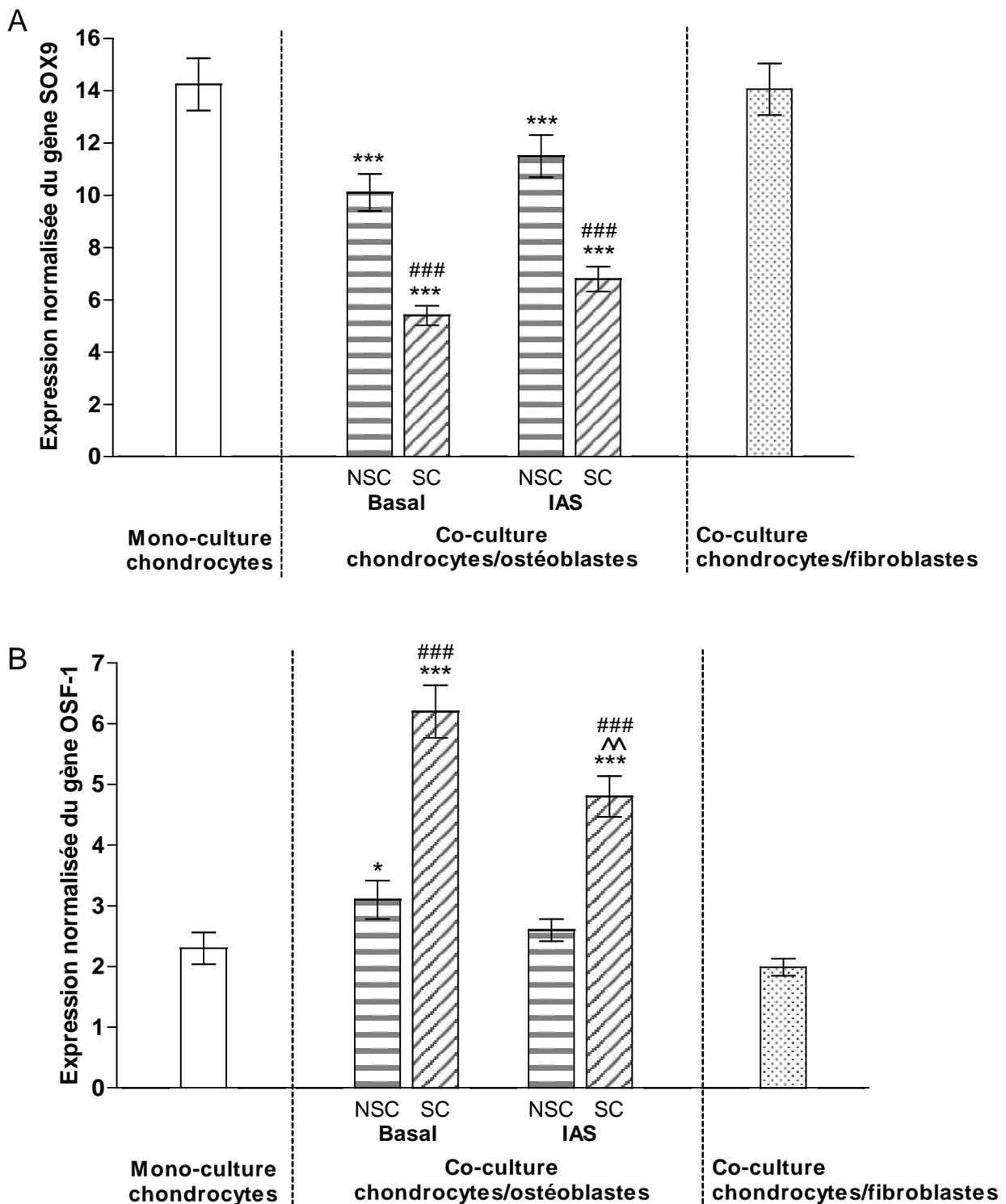
Après de 4 jours de co-culture avec des ostéoblastes NSC ou SC, les chondrocytes n'exprimaient pas les gènes CBFA1, PAL, COL1 ou COL10. Une pré-incubation des ostéoblastes avec le mélange d'IAS n'induisait pas l'expression de ces gènes. Ils demeuraient indétectables par nos méthodes d'analyses.



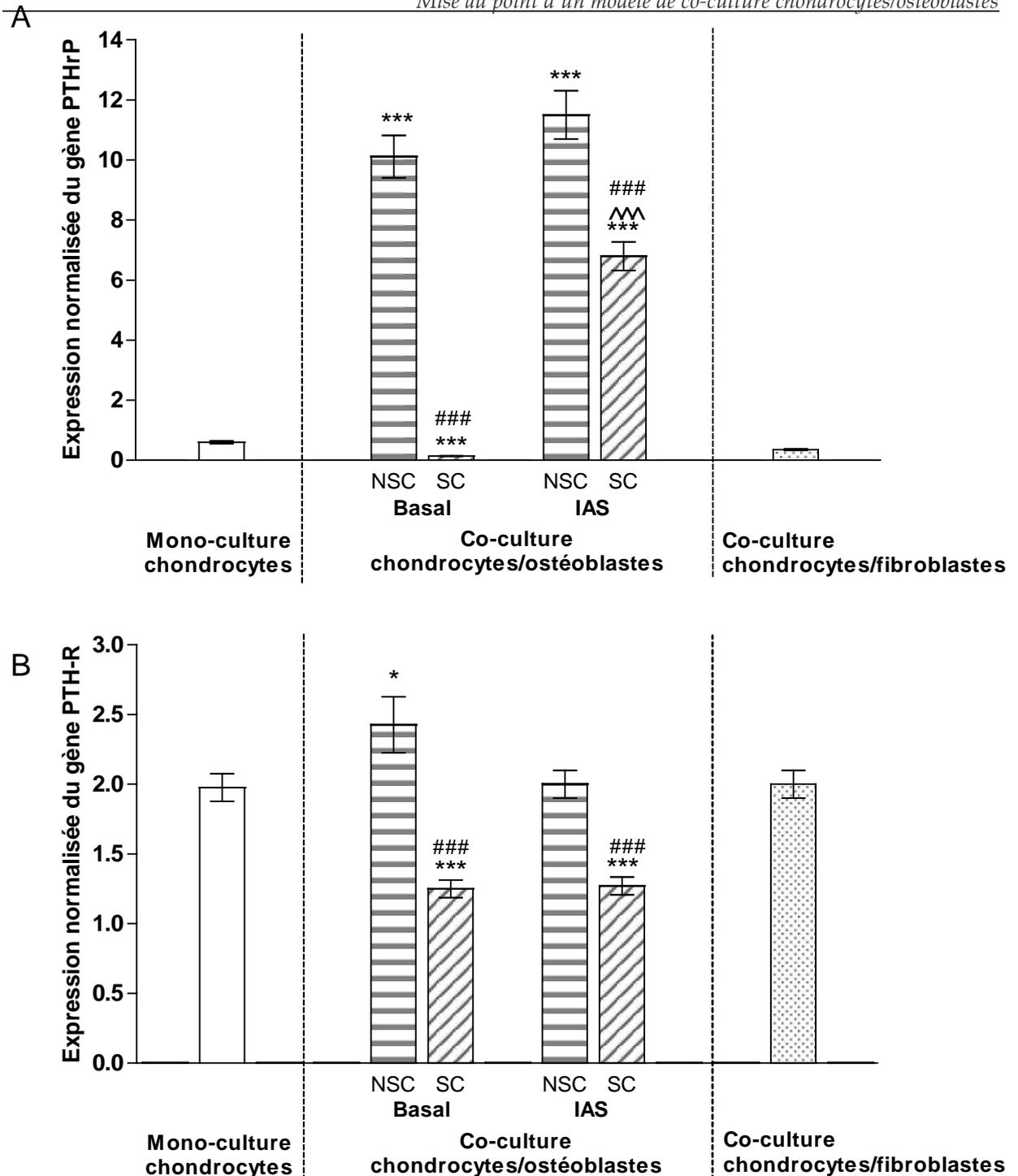
**Figure 76 :** Expression du gène AGG (A) et COL2 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 10 µg/ml d'IAS. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^^ =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec les IAS.



**Figure 77 :** Expression du gène MMP-3 (A) et MMP-13 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 10 µg/ml d'IAS. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \*\* =  $p < 0,01$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^^ =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec les IAS.



**Figure 78 :** Expression du gène SOX9 (A) et OSF-1 (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 10 µg/ml d'IAS. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \* =  $p < 0,05$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^^ =  $p < 0,01$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec les IAS.



**Figure 79 :** Expression du gène PTHrP (A) et PTH-R (B) par les chondrocytes après 4 jours de culture en l'absence (mono-culture) ou en présence (co-culture) d'ostéoblastes pré-incubés ou non (basal) durant 72 h avec 10 µg/ml d'IAS. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène étudié par rapport au gène GAPDH et représentés par la moyenne de 3 cultures indépendantes ± SEM. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple (n=9). Les différences statistiques sont représentées par \* =  $p < 0,05$  et \*\*\* =  $p < 0,001$  entre la co-culture et la mono-culture, ### =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes NSC et SC, ^^^ =  $p < 0,001$  entre les ostéoblastes non traités et traités avec les IAS.

## 4. Discussion

Plusieurs travaux récents ont évoqué le rôle joué par les ostéoblastes dans la physiopathologie de l'arthrose, et plus particulièrement dans la dégradation du cartilage<sup>12, 17, 220, 312</sup>. Non seulement les ostéoblastes seraient impliqués dans la sclérose de l'os sous-chondral et donc dans l'altération des propriétés mécaniques de ce tissu mais également, par le biais de facteurs biochimiques solubles, dans l'initiation et la progression des changements structuraux observés dans le cartilage arthrosique. Plusieurs éléments plaident en faveur de cette hypothèse :

- 1) La présence de microfractures ostéochondrales permettant des échanges entre l'os sous-chondral et le cartilage<sup>14</sup>.
- 2) La présence d'HGF dans la couche profonde du cartilage. L'HGF n'est pas synthétisée par les chondrocytes mais bien par les ostéoblastes<sup>15</sup>. Cette observation indique que des protéines d'origine osseuse sont capables de franchir la barrière ostéochondrale.
- 3) La présence d'OC dans le fluide synovial des patients arthrosiques<sup>16</sup>.
- 4) La sécrétion par les ostéoblastes de facteurs impliqués dans la genèse des changements structuraux observés au niveau du cartilage arthrosique (TGF- $\beta$ 1, HGF, IGF-1, IL-6)<sup>9, 282, 313-315</sup>.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons développé un modèle de co-culture original dans lequel des ostéoblastes humains isolés à partir de l'os sous-chondral SC et des chondrocytes arthrosiques étaient cultivés simultanément dans le même environnement, mais sans être en contact. Cette méthodologie nous a permis d'observer les faits suivants :

### **Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques induisent un déséquilibre métabolique chez le chondrocyte.**

Précédemment, Westacott et collaborateurs ont démontré que les ostéoblastes, isolés à partir d'os trabéculaire arthrosique, étaient capables de dégrader des explants de cartilage en co-culture<sup>17</sup>. Un événement clé de la dégradation du cartilage est la synthèse et l'activation des métalloprotéinases. Nos travaux ont montré que les ostéoblastes SC stimulaient l'expression par les chondrocytes des gènes codant pour la MMP-3 et la MMP-13 ainsi que la sécrétion de MMP-3. De plus, les ostéoblastes SC diminuaient le contenu en agrécane des billes d'alginate. Les effets observés semblent

être liés au phénotype particulier des ostéoblastes SC, comme l'indique l'absence d'effet des ostéoblastes NSC ou des fibroblastes sur ces paramètres. Dans l'arthrose, MMP-3 et MMP-13 jouent un rôle important dans la dégradation du cartilage. La MMP-3 dégrade les molécules d'agrécan tandis que la MMP-13 clive préférentiellement le collagène de type II<sup>316, 317</sup>. L'augmentation de ces facteurs conjugués à la diminution de production de protéines matricielles (agrécan et collagène de type II) crée, au sein du cartilage, un déséquilibre métabolique important qui est favorable à la dégradation de la matrice cartilagineuse.

L'utilisation d'un anticorps neutralisant l'activité biologique de l'IL-6 nous a permis de montrer l'importance de ce facteur dans la relation pathophysiologique ostéochondrale. En effet, la neutralisation de l'activité biologique de l'IL-6 inhibe les effets des ostéoblastes SC sur l'expression des gènes codant pour l'agrécan, MMP-3, MMP-13 et sox9. Cette cytokine est produite en quantité plus élevée par les ostéoblastes SC que par les ostéoblastes NSC. De plus, nous avons démontré que l'IL-6 en présence de son récepteur soluble IL-6sR stimulait la production de MMP-3 et inhibait la synthèse d'agrécan par les chondrocytes cultivés en billes d'alginate<sup>282</sup>. Il est donc évident que l'IL-6 joue un rôle important dans la dégradation du cartilage induite par les ostéoblastes SC. Par contre, la neutralisation de l'IL-6 induit une diminution de l'expression du gène codant pour TIMP-1. Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré que l'IL-6/IL-6sR augmentait la synthèse de TIMP-1 par les chondrocytes<sup>282</sup>.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres facteurs contribuent également à ces effets. L'IL-1 $\beta$  est un candidat potentiel. *In vitro*, il inhibe la synthèse d'agrécan et stimule la production des MMP. Cependant, dans nos conditions expérimentales, les ostéoblastes NSC et SC produisent des quantités similaires d'IL-1 $\beta$ , indiquant que les effets des ostéoblastes SC sur les chondrocytes ne résultent probablement pas d'une production accrue de cette cytokine. L'HGF pourrait également jouer un rôle dans ce processus physiopathologique. Trois protéines peuvent être produites par épissage alternatif du gène codant pour l'HGF : l'HGF, HGF/NK1 et HGF/NK2. Ces 3 isoformes sont présentes dans la couche profonde du cartilage articulaire, et la présence d'HGF est augmentée dans le cartilage arthrosique<sup>15</sup>, suggérant un rôle pour ce facteur dans la pathogénie de l'arthrose. Une étude récente a montré que les chondrocytes produisent HGF/NK1 et HGF/NK2 mais

pas HGF<sup>15</sup>. Par contre, l'HGF est sécrété par les ostéoblastes sous-chondraux, et sa production est multipliée par 5 dans l'arthrose<sup>15</sup>. Ces observations suggèrent que l'HGF présent au sein du cartilage est d'origine osseuse. *In vitro*, le facteur de croissance HGF est un inducteur connu de l'expression de la MMP-13 par les chondrocytes arthrosiques<sup>318</sup>. L'expression de MMP-13 par les chondrocytes est également augmentée par le TGF- $\beta$ 1<sup>315</sup>, un médiateur lui aussi produit en grande quantité par les ostéoblastes SC. Cependant, à ce jour, il est impossible de dire lequel de ces facteurs est impliqué dans l'axe physiopathologique ostéochondral. Il est possible que l'IL-6 n'agisse pas seule et que les effets des ostéoblastes SC sur le métabolisme des chondrocytes résultent de l'action conjuguée de plusieurs médiateurs. Enfin, nous ne pouvons pas éliminer la possibilité que ces médiateurs agissent en synergie avec des médiateurs produits par les chondrocytes arthrosiques eux-mêmes (IL-1 $\beta$ , \*NO, PGE<sub>2</sub>, ...). Par exemple, des synergies entre l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 ont été démontrées dans un modèle de dégradation d'explant de cartilage *in vitro*<sup>139</sup>.

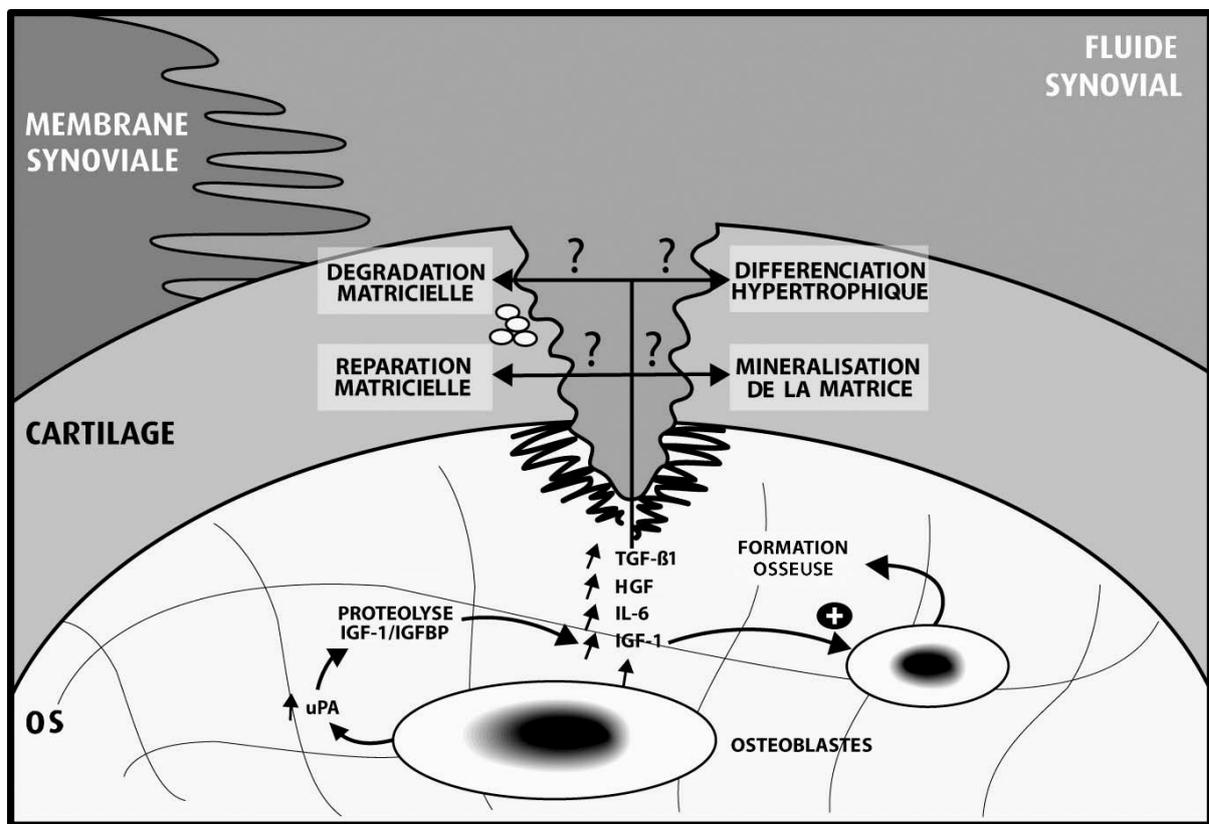
### **Les ostéoblastes sous-chondraux initient la différenciation hypertrophique des chondrocytes arthrosiques humains.**

Au cours de l'arthrose, les chondrocytes subissent des modifications de leur phénotype caractérisées par la synthèse des collagènes interstitiels de type I et III<sup>319, 320</sup>, de versican<sup>321</sup>, du collagène de type IIA<sup>322</sup> et par l'expression de molécules spécifiques des chondrocytes hypertrophiques (collagène de type X)<sup>323, 324</sup>. Actuellement, les circonstances qui conduisent à ces changements ne sont pas connues. Notre travail avait pour but d'étudier l'influence des ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes (figure 80).

Nous avons observé qu'en co-culture, les ostéoblastes SC induisaient une diminution de l'expression des gènes COL2, SOX9 et PTHrP/PTH-R, et une augmentation de l'expression d'OSF-1 par les chondrocytes.

Dans le cartilage arthrosique, les chondrocytes organisés en « *clusters* » produisent de l'OSF-1, alors que les chondrocytes normaux n'exprimaient pas ce facteur<sup>325</sup>. L'OSF-1 est un facteur essentiellement exprimé durant l'ostéogenèse et absent du cartilage articulaire adulte. La production d'OSF-1 par les chondrocytes arthrosiques est donc un signe de leur différenciation hypertrophique. Dans notre modèle de co-culture, le niveau d'ARNm codant pour l'OSF-1 dans les chondrocytes était augmenté

de 170 % par les ostéoblastes SC et de seulement 35 % par les ostéoblastes NSC. *In vitro*, l'OSF-1 stimule la production de collagène de type I et II ainsi que de biglycan par les chondrocytes<sup>25, 326</sup>. Il est donc probable que ce facteur favorise la formation de fibrocartilage au niveau des lésions arthrosiques. De plus, nous émettons l'hypothèse que ce facteur participe à la boucle physiopathologique ostéocondrale en agissant, via les microfractures, sur les ostéoblastes sous-chondraux et par conséquent en favorisant la sclérose de l'os sous-chondral. *In vitro*, l'OSF-1 favorise le recrutement des précurseurs ostéoblastiques<sup>327</sup>, ainsi que leur différenciation en ostéoblastes matures. Ce facteur augmente la synthèse de la PAL et d'OC par les ostéoblastes<sup>37</sup>.



**Figure 80 :** Représentation schématique et hypothétique de l'implication de l'os sous-chondral dans les changements structuraux observés au sein du cartilage arthrosiques. Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques libèrent localement une quantité importante de transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 1, d'hepatocyte growth factor (HGF), d'interleukine-6 (IL-6) et d'insulin-like growth factor (IGF)-1. Ces médiateurs pourraient atteindre le cartilage par les microfractures ostéocondrales. Ils pourraient alors agir sur les chondrocytes en favorisant leur différenciation hypertrophique, en altérant les capacités de réparation de la matrice et en augmentant la dégradation de la matrice ou sa minéralisation. IGFBP : IGF binding protein, uPA : activateur du plasminogène de type urokinase.

Parallèlement à l'augmentation d'OSF-1, les ostéoblastes SC diminuaient l'expression des gènes SOX9 et COL2 par les chondrocytes. Pendant l'ossification

endochondrale, les chondrocytes prolifératifs expriment ces deux gènes. L'expression de ces facteurs s'interrompt lorsque les chondrocytes deviennent hypertrophiques et entrent dans leur phase terminale de différenciation<sup>328</sup>. Sox9 est un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes caractéristiques du phénotype chondrocytaire, tels que ceux de l'agrécan et du collagène de type II. Récemment, il a été démontré que l'expression du gène SOX9 était diminuée dans le cartilage arthrosique<sup>329</sup>. L'inhibition de ces gènes peut donc être interprétée comme un signe de la dédifférenciation des chondrocytes arthrosiques.

Un des résultats les plus intéressants de notre étude est la diminution de l'expression par les chondrocytes des gènes codant pour PTHrP et son récepteur induite par les ostéoblastes SC. A l'inverse, les ostéoblastes NSC augmentaient l'expression de ces deux gènes. Au cours de l'ossification endochondrale, PTHrP empêche la différenciation hypertrophique des chondrocytes<sup>330</sup>. Nous pouvons déduire de ces observations qu'en inhibant la synthèse de PTHrP par les chondrocytes, les ostéoblastes SC favorisent la différenciation hypertrophique des chondrocytes.

L'ensemble des modifications phénotypiques observées chez les chondrocytes arthrosiques en co-culture avec des ostéoblastes SC, c'est-à-dire une diminution de l'expression de PTHrP, de COL2 et de SOX9 et une augmentation d'OSF-1, suggère que les ostéoblastes SC sont capables, via des médiateurs biochimiques, d'initier la différenciation hypertrophique des chondrocytes.

Cependant, dans nos conditions expérimentales, les chondrocytes n'expriment pas le gène COL10. Ce collagène est exprimé spécifiquement par les chondrocytes hypertrophiques<sup>331</sup>. Nous ne pouvons donc pas conclure qu'en présence d'ostéoblastes SC, les chondrocytes se différencient en chondrocytes hypertrophiques. Nous pouvons tenter d'expliquer ces résultats par les particularités de nos conditions expérimentales. Il est possible que l'absence de production du collagène de type X soit liée à la culture des chondrocytes en billes d'alginate. En effet, l'équipe de Binette n'a pas identifié de collagène de type X après 5 mois de culture de chondrocytes en billes d'alginate<sup>255</sup>. D'autres auteurs ont observé une synthèse du collagène de type X après 17 jours de culture en billes d'alginate en présence de TGF- $\beta$ 3 ou de BMP-2<sup>332, 333</sup>. Dans notre modèle de co-culture, les chondrocytes sont cultivés seulement 4 jours en présence des ostéoblastes. Cette période de culture est probablement trop courte pour

permettre un processus complet de différenciation. De plus, le milieu de culture utilisé pour la co-culture ne contient pas de facteur de croissance régulant la différenciation cellulaire. L'ensemble de ces éléments pourrait également expliquer nos résultats.

**Certains effets des ostéoblastes SC sur le métabolisme du chondrocytes peuvent être reproduits par la pré-incubation des ostéoblastes NSC avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM.**

Nous avons évalué les effets de 3 cytokines, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'OSM, sur le comportement des ostéoblastes en co-culture. Ces cytokines jouent un rôle important dans la pathogénie de l'arthrose et pourraient être impliquées dans les modifications phénotypiques des ostéoblastes sous-chondraux. Les ostéoblastes NSC pré-incubés avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM inhibaient la synthèse d'agrécan et stimulaient l'expression des MMP par les chondrocytes de la même manière que les ostéoblastes SC.

Après une pré-incubation avec de l'IL-1 $\beta$ , les ostéoblastes NSC augmentaient davantage l'expression du gène codant pour l'OSF-1 par les chondrocytes, mais cette expression restait inférieure à celle observée en présence d'ostéoblastes SC.

Par contre, les ostéoblastes NSC pré-incubés avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM ne modifiaient pas l'expression de SOX9 ou PTHrP par les chondrocytes, alors que les ostéoblastes SC inhibaient l'expression de ces gènes.

Ces données expérimentales suggèrent que le traitement des ostéoblastes par ces cytokines ne reproduit pas tous les changements phénotypiques observés chez les chondrocytes en co-culture avec des ostéoblastes SC. Dans le chapitre III, nous avons rapporté que les ostéoblastes NSC incubés avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM n'acquerraient pas toutes les caractéristiques du phénotype des ostéoblastes SC. Il s'agit probablement d'une explication des effets observés en co-culture.

## **Les IAS préviennent des dérèglements du métabolisme des chondrocytes induits par les ostéoblastes sous-chondraux SC.**

Les IAS sont couramment utilisés en Europe dans le traitement de l'arthrose. Récemment, les effets des IAS, administrés pendant 2 ans, sur les changements structuraux du cartilage ont été étudiés sur une cohorte de 163 patients souffrant d'arthrose de la hanche. Les IAS retardaient la progression du pincement de l'interligne articulaire mesuré sur radiographie, uniquement chez les patients souffrant de coxarthrose sévère (interligne inférieure à 2,8 mm à l'inclusion)<sup>237</sup>. Cette étude suggère que les IAS sont capables d'interférer avec les changements structuraux du cartilage arthrosique. Plusieurs travaux *in vitro* ont montré que les IAS étaient actifs sur les chondrocytes arthrosiques<sup>231, 232, 285</sup>. Ils stimulent la production d'agrécan et de TGF- $\beta$ 1 et inhibent celle de PGE<sub>2</sub> et d'IL-6.

Notre travail propose un nouveau mécanisme d'action des IAS. Pour la première fois, nous démontrons que les IAS agissent au niveau de l'axe pathophysiologique ostéochondral. Nous montrons en effet que les IAS préviennent l'effet inhibiteur des ostéoblastes SC sur l'expression par les chondrocytes de l'agrécan et de PTHrP. Par contre, les IAS n'ont pas d'effet sur l'expression des autres gènes étudiés, comme par exemple les MMP. Ces résultats suggèrent que les IAS peuvent protéger le cartilage en agissant sur l'os sous-chondral. Cette découverte contribue à la compréhension des mécanismes d'action de ce médicament.

L'arthrose est une maladie caractérisée par la perte progressive du cartilage articulaire. Ce tissu s'amincit, s'érode et se minéralise. Cependant, le cartilage n'est pas le seul tissu de l'articulation à présenter des modifications structurelles et fonctionnelles. Par exemple, l'os sous-chondral se sclérose<sup>2</sup>. Cette modification structurelle modifie profondément sa capacité à amortir les contraintes mécaniques. Il est donc logique de penser que le durcissement de l'os sous-chondral provoque une augmentation des contraintes mécaniques exercées sur le cartilage.

La contribution de l'os sous-chondral au développement des lésions cartilagineuses n'est pas seulement mécanique, mais également biochimique. En effet, des travaux récents ont montré que le phénotype des ostéoblastes de l'os sous-chondral était modifié en regard des lésions du cartilage. En comparaison avec des ostéoblastes normaux, les ostéoblastes arthrosiques produisent plus d'OC, de PAL, d'IGF-1, de TGF- $\beta$ 1, d'HGF, d'uPA et d'IL-6<sup>10-13</sup>. Par ailleurs, des microfractures ostéocondrales traversent la jonction os-cartilage. Le nombre de microfractures augmente avec la sévérité de l'arthrose<sup>14</sup>. Il existe donc une communication entre l'os et le cartilage, qui s'intensifie dans les conditions pathologiques.

Notre travail est basé sur l'hypothèse que des médiateurs solubles sécrétés par les ostéoblastes de l'os sous-chondral influenceraient le métabolisme des chondrocytes sus-jacents et contribueraient ainsi à la dégradation du cartilage. Cette hypothèse repose sur les quatre observations suivantes :

- × Les ostéoblastes arthrosiques ont un phénotype altéré<sup>10-13</sup>.
- × Des molécules produites par les ostéoblastes (HGF, OC) sont présentes dans la matrice cartilagineuse ou dans le fluide synovial. Leur concentration est augmentée dans le cartilage arthrosique<sup>15, 16</sup>.
- × Dans l'articulation arthrosique, des microfractures ostéocondrales établissent une communication entre l'os sous-chondral et le cartilage<sup>14</sup>.
- × Une étude de Westacott a montré que des ostéoblastes arthrosiques induisaient en co-culture la dégradation d'explants de cartilage<sup>17</sup>.

Les objectifs de notre travail étaient les suivants :

- 1) caractériser le phénotype des ostéoblastes des zones sclérosées de l'os sous-chondral ;

- 2) étudier l'influence du phénotype des ostéoblastes des zones sclérosées sur le métabolisme des chondrocytes ;
- 3) rechercher les effets de 3 cytokines (l'IL-1, l'IL-6 et l'OSM) et d'un mélange d'IAS sur l'axe physiopathologique ostéocondral.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons mis au point un modèle original de co-culture dans lequel des chondrocytes arthrosiques en billes d'alginate étaient cultivés en présence d'ostéoblastes provenant des régions SC ou des régions NSC de l'os sous-chondral.

**Le modèle de culture des chondrocytes en billes d'alginate est pertinent pour l'étude de la formation de la matrice cartilagineuse.**

Lorsqu'ils sont cultivés en monocouche, les chondrocytes perdent rapidement leurs caractéristiques morphologiques et synthétiques spécifiques, et se comportent comme des fibroblastes indifférenciés. Dans ces conditions, il est difficile de donner une interprétation réaliste des effets observés, tant le comportement du chondrocyte, cellule hautement spécialisée, est éloigné de celui du fibroblaste. Un objectif important de la culture des chondrocytes est de conserver stable leur phénotype cartilagineux durant une longue période. Dans ce but, les chondrocytes peuvent être cultivés en suspension sous agitation constante, dans des boîtes de culture à faible adhésion cellulaire, ou encore dans des matrices synthétiques ou naturelles. Dans ce travail, nous avons choisi de valider un modèle de culture de chondrocytes humains arthrosiques en billes d'alginate. L'alginate est un polysaccharide linéaire qui en présence de cations divalents comme le calcium se gélifie pour former une matrice poreuse autour des chondrocytes. Dans ces conditions, les chondrocytes synthétisent des constituants matriciels qui se répartissent dans des compartiments appelés par les Anglo-saxons « Cell-associated Matrix – CM » et « Further Removed Matrix – FRM ». Ces compartiments correspondent respectivement à la matrice péricellulaire et territoriale et à la matrice interterritoriale du cartilage *in vivo*. Les connaissances du comportement du chondrocyte dans ces conditions de culture restent lacunaires. Il ressort de notre travail les observations suivantes :

- Les chondrocytes humains conservent leur phénotype cartilagineux après 12 jours de culture en billes d'alginate. Ils ont une forme arrondie et sont localisés

dans des logettes formées au sein de la matrice. Ils se multiplient peu et synthétisent du collagène de type II et de l'agrécan, deux molécules spécifiques du cartilage.

- Une matrice extracellulaire s'organise autour des chondrocytes. La presque totalité (98 %) des molécules d'agrécan synthétisées par le chondrocyte reste immobilisée au sein de la bille d'alginate. Une partie des molécules d'agrécan néo-synthétisées migre de la matrice péricellulaire et territoriale vers la matrice interterritoriale.
- La production basale de MMP-3 par les chondrocytes arthrosiques augmente avec la durée de la culture, alors que la production de TIMP-1 diminue. Il en résulte un accroissement du rapport MMP-3/TIMP-1 avec la durée de la culture. Au terme de douze jours de culture, le rapport molaire MMP-3/TIMP-1 est égal à 22, signifiant un large excès de MMP-3 par rapport à TIMP-1. Cette situation est favorable à la chondrolyse.

Ce modèle est donc pertinent pour étudier l'effet de cytokines, facteurs de croissance ou médicaments sur la formation de la matrice cartilagineuse.

**Le phénotype des ostéoblastes SC est modifié. L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou l'OSM ne semblent pas responsables de ces changements.**

Nous avons comparé le phénotype des ostéoblastes NSC et SC issus de la plaque osseuse sous-chondrale de patients arthrosiques. Cette démarche est originale. En effet, les travaux publiés à ce jour utilisaient des ostéoblastes isolés de plaques sous-chondrales arthrosiques sans faire de distinction entre les zones SC et NSC<sup>10-13, 15, 291</sup>. La population d'ostéoblastes arthrosiques utilisée était donc hétérogène, formée d'ostéoblastes des zones NSC et SC. Nous avons observé que les ostéoblastes SC avaient un phénotype différent de celui des ostéoblastes NSC. Ils produisaient plus d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1, d'OC et de PAL, mais moins de PTHrP. Ces modifications pourraient contribuer à la formation de la sclérose sous-chondrale. En effet, ces facteurs sont impliqués dans le contrôle du remodelage osseux.

Nous avons ensuite recherché si les ostéoblastes NSC incubés 3 jours avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'OSM exprimaient le phénotype particulier des ostéoblastes SC. Bien que ces 3 cytokines modifiaient les productions des ostéoblastes NSC, elles

n'induisaient pas l'ensemble des caractéristiques des ostéoblastes SC. Les principales différences concernaient la synthèse d'OC et de PTHrP. Par rapport aux ostéoblastes NSC, les ostéoblastes SC produisaient plus d'OC mais moins de PTHrP. A l'inverse, les ostéoblastes NSC traités par l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou l'OSM produisaient moins d'OC mais plus de PTHrP.

Nous envisageons d'améliorer nos connaissances sur les facteurs stimulant ces changements phénotypiques au sein des ostéoblastes sous-chondraux. Des stimuli mécaniques ou d'autres facteurs biochimiques provenant des chondrocytes arthrosiques seront évalués (par exemple l'IL-8, l'OSF-1...). Nous chercherons d'autres modifications dans le phénotype des ostéoblastes SC, en étudiant notamment l'expression des gènes codant pour les IGF, les BMP, l'HGF et les TGF- $\beta$ , mais également la synthèse du collagène de type I. La matrice osseuse de la plaque sous-chondrale sclérosée étant faiblement minéralisée, nous nous intéresserons également à l'expression et/ou à l'activité de molécules impliquées dans la formation des cristaux d'hydroxyapatite (comme ank, TG2, les NTPPPH...) et dans l'incorporation de ces cristaux dans la matrice ostéoïde (l'ostéonectine, l'ostéopontine, la BSP... ).

### **Les ostéoblastes SC induisent d'importants déséquilibres métaboliques chez le chondrocyte.**

Précédemment, Westacott et collaborateurs ont démontré que des ostéoblastes, isolés à partir d'os trabéculaire arthrosique, induisaient la dégradation d'explants de cartilage en co-culture<sup>17</sup>. Un événement clé de la dégradation du cartilage est la synthèse et l'activation des métalloprotéinases. Nos travaux ont montré que les ostéoblastes SC stimulaient l'expression par les chondrocytes des gènes codant pour la MMP-3 et la MMP-13, et la sécrétion de MMP-3. De plus, les ostéoblastes SC diminuaient le contenu en agrécane des billes d'alginate, ainsi que l'expression du gène codant pour cette molécule. Comme l'indique l'absence d'effet des ostéoblastes NSC ou des fibroblastes, ces effets semblent liés au phénotype particulier des ostéoblastes SC. Dans l'arthrose, MMP-3 et MMP-13 jouent un rôle important dans la dégradation du cartilage. La MMP-3 dégrade les molécules d'agrécane tandis que la MMP-13 clive le collagène de type II. L'augmentation de ces facteurs conjugués avec la diminution de production de protéines matricielles comme l'agrécane et le

collagène de type II provoque un déséquilibre métabolique important au sein du cartilage.

La suite de notre recherche sera principalement axée sur l'identification des médiateurs ostéoblastiques responsables de ces changements métaboliques. Dans ce but, nous effectuerons les co-cultures ostéoblastes/chondrocytes en présence d'anticorps neutralisant l'activité biologique de divers facteurs tels que les TGF- $\beta$  ou l'HGF, ou d'inhibiteurs de la synthèse de PGE<sub>2</sub> (anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou de NO (L-NMMA).

Nous avons également montré que les ostéoblastes SC diminuaient l'expression par les chondrocytes de SOX9 et de PTHrP, mais augmentaient l'expression d'OSF-1. Ces changements pourraient initier la différenciation hypertrophique des chondrocytes. L'expression d'OSF-1 par les chondrocytes témoigne de ce changement de phénotype. En effet, cette molécule n'est pas exprimée par les chondrocytes normaux. Par contre, le chondrocyte hypertrophique exprime ce facteur au niveau du cartilage de croissance. OSF-1 peut donc être considéré comme un marqueur de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Cependant, dans nos conditions expérimentales, les chondrocytes n'expriment pas COL10. Ce collagène est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques au stade terminal de leur différenciation. Il est donc possible que nos conditions de culture ne soient pas optimales pour l'étude du processus de différenciation hypertrophique des chondrocytes.

Nous envisageons de prolonger notre période d'observation au-delà de 4 jours et d'orienter notre recherche sur un modèle de culture à plus long terme. Le modèle de culture des chondrocytes en billes d'alginate permet de maintenir en culture les chondrocytes durant plusieurs semaines. Pour les ostéoblastes, par contre, c'est plus délicat, en particulier dans nos conditions de co-culture sans sérum. C'est la raison pour laquelle nous envisageons de constituer un « pool » de milieux de culture, conditionné par les ostéoblastes NSC ou SC. Nous envisageons alors de cultiver nos chondrocytes en billes d'alginate pendant de longues périodes en présence de ce milieu conditionné par les ostéoblastes. Cette méthode nous permettra d'étudier le processus de différenciation hypertrophique sur une plus longue période. Nous nous intéresserons également à la minéralisation de la matrice cartilagineuse, et à l'influence des ostéoblastes sur ce processus physiopathologique. Dans ce but, nous étudierons l'expression par les chondrocytes des molécules ank, PAL, TG2 et NTPPPH.

## **L'IL-6 et l'OSM jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de l'arthrose.**

*In vitro*, l'IL-1 $\beta$  est considérée comme la cytokine avec l'activité biologique la plus importante sur le métabolisme du cartilage. Elle favorise la production d'enzymes protéolytiques et inhibe la production des constituants matriciels. Des travaux récents ont montré le rôle important joué par l'IL-6 et l'OSM sur l'activité biologique de l'IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  seule est incapable d'induire la dégradation du réseau de collagène de type II, alors que l'addition simultanée d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 ou d'OSM induit cet effet<sup>139-141</sup>. Ces résultats indiquent clairement que l'IL-6 et l'OSM jouent un rôle primordial dans la dégradation du cartilage.

Dans ce travail, nous décrivons pour la première fois les effets de l'IL-6 et de l'OSM sur le métabolisme des chondrocytes humains cultivés en billes d'alginate. L'OSM, mais pas l'IL-6, inhibe de manière concentration-dépendante la synthèse d'agrécane. L'IL-6 s'oppose à l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse de TGF- $\beta$ 1, alors que l'OSM n'a pas d'action sur ce paramètre. A l'inverse, l'OSM contrecarre l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse de TIMP-1, alors que l'IL-6 est sans effet.

De plus, nos travaux suggèrent que ces cytokines contribuent à la sclérose de l'os sous-chondral par leurs effets sur les ostéoblastes, comme l'augmentation de la synthèse du TGF- $\beta$ 1. L'accumulation locale de ce facteur au niveau de l'os sous-chondral pourrait favoriser la sclérose de ce tissu.

Enfin, l'IL-6 semble jouer un rôle déterminant dans les effets délétères exercés par les ostéoblastes SC sur le métabolisme des chondrocytes. Nous avons montré que l'addition d'anticorps neutralisant l'activité biologique de l'IL-6 bloque totalement les effets des ostéoblastes SC sur la synthèse d'agrécane et des MMP. Ces résultats indiquent que l'IL-6 est un médiateur majeur des effets des ostéoblastes SC sur le cartilage sus-jacent.

## **Les IAS sont actifs sur 3 axes physiopathologiques de l'arthrose.**

Les IAS sont couramment utilisés en Europe dans le traitement de l'arthrose. Récemment, les effets des IAS sur les changements structuraux du cartilage ont été étudiés sur une cohorte de 163 patients souffrant d'arthrose de la hanche. Au terme de deux ans de traitement, les IAS retardaient la progression du pincement de

l'interligne articulaire mesuré sur radiographie, uniquement chez les patients souffrant de coxarthrose sévère (interligne inférieure à 2,45 mm à l'inclusion)<sup>237</sup>. Cette étude suggère que les IAS sont capables d'interférer avec les changements structuraux du cartilage arthrosique.

Plusieurs travaux *in vitro* ont montré que les IAS étaient actifs sur les chondrocytes arthrosiques<sup>231, 232, 285</sup>. Nous avons démontré que les IAS augmentent la production d'agrécan, un composant majeur de la matrice cartilagineuse. De plus, ils favorisent la restauration de la synthèse d'agrécan après un traitement par l'IL-1 $\beta$ . Nous avons également observé que l'effet des IAS sur la production d'agrécan est différé et n'apparaît qu'après une période d'incubation de 6 jours. Cette observation suggère que cet effet pourrait être secondaire à la sécrétion par les chondrocytes d'un médiateur intermédiaire. Le TGF- $\beta$ 1 pourrait exercer ce rôle. En effet, nous avons démontré que les IAS augmentent la synthèse de TGF- $\beta$ 1 par les chondrocytes. D'autre part, les IAS diminuent la production de MMP-3 par les chondrocytes arthrosiques et s'opposent partiellement à l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse de TIMP-1.

L'originalité de notre travail réside essentiellement dans l'étude des effets des IAS sur le métabolisme des ostéoblastes. Pour la première fois, nous démontrons que les IAS inhibent la synthèse de PAL et d'OC par les ostéoblastes SC, deux marqueurs de la formation osseuse, et diminuent la synthèse de TGF- $\beta$ 1, un facteur de croissance qui joue un rôle clé dans la formation osseuse<sup>334</sup>. Ces résultats montrent clairement que les IAS sont actifs sur les ostéoblastes et qu'ils favorisent le retour à l'homéostasie de plusieurs facteurs favorables à la sclérose du tissu osseux.

Notre travail a également révélé une nouvelle voie d'action des IAS. Nous démontrons que les IAS agissent également sur l'axe physiopathologique ostéochondral. Dans nos conditions expérimentales, les IAS préviennent l'effet inhibiteur des ostéoblastes SC sur l'expression par les chondrocytes d'agrécan et de PTHrP. Par contre, les IAS n'ont pas d'effet sur l'expression des autres gènes étudiés comme par exemple les MMP.

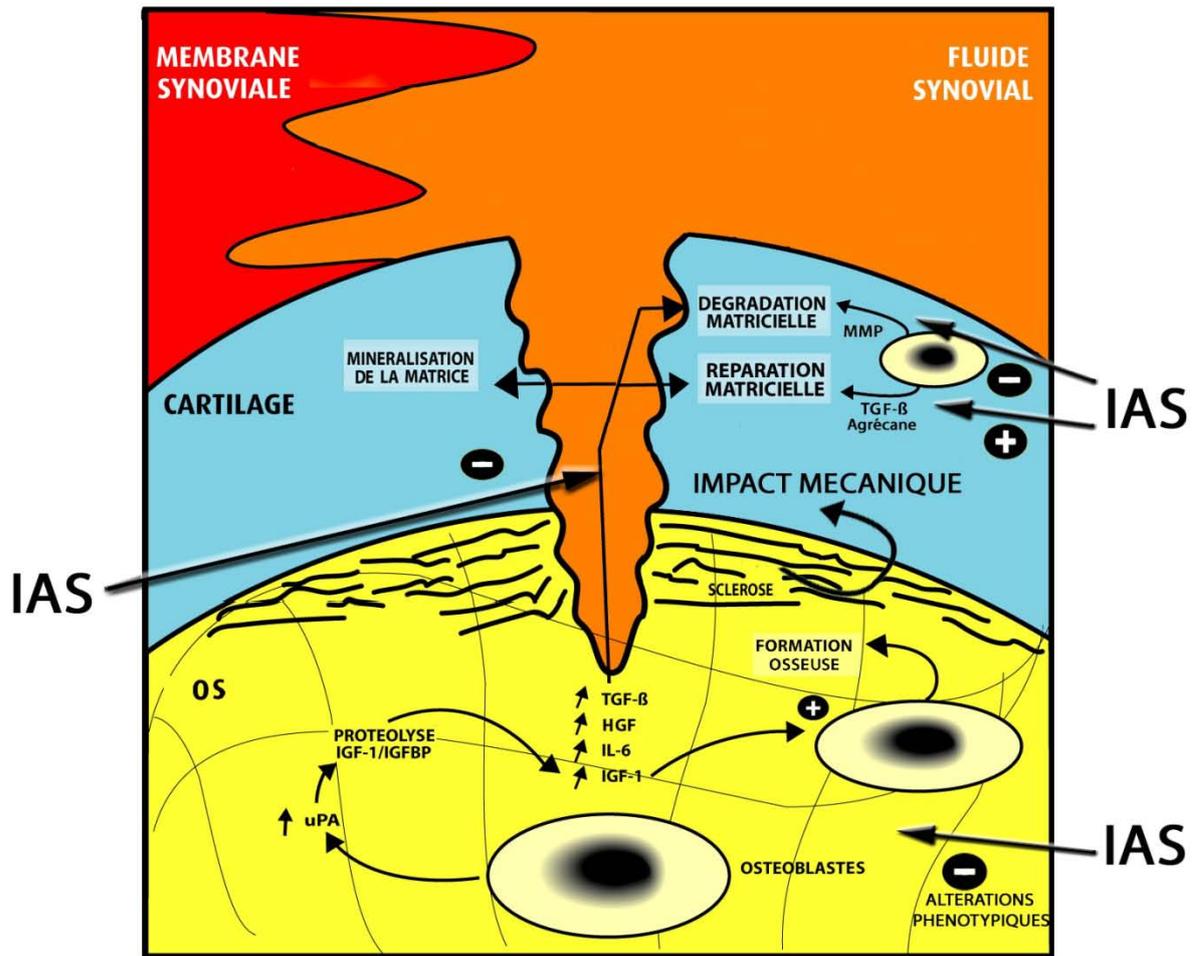
Nous pouvons conclure de ces résultats que les IAS (figure 81) :

- diminuent la synthèse par les chondrocytes de certains facteurs cataboliques qui contribuent à l'initiation et au développement des lésions du cartilage dans l'arthrose ;
- diminuent la synthèse par les ostéoblastes sous-chondraux SC de facteurs favorisant la sclérose sous-chondrale ;
- préviennent les effets délétères des ostéoblastes SC sur le cartilage.

Ces observations permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action de ce médicament en clinique humaine et apportent une série d'éléments nouveaux plaidant en faveur d'une action structurale de cette drogue sur le cartilage.

Nous souhaitons poursuivre nos recherches sur les mécanismes d'action de ce médicament. Nous étudierons ses effets sur la différenciation hypertrophique des chondrocytes et sur la minéralisation du cartilage.

Enfin, ces résultats nous encouragent à rechercher de nouvelles molécules capables de prévenir ou de ralentir la sclérose de l'os sous-chondral. Nous porterons une attention particulière aux médicaments utilisés dans le traitement de l'ostéoporose. Récemment, une étude a démontré que l'alendronate, un inhibiteur puissant de la résorption osseuse, possède des effets structuraux bénéfiques sur les articulations arthrosiques, protégeant le cartilage de la détérioration et prévenant la formation des ostéophytes<sup>9</sup>. Nous envisageons de tester sur nos modèles de culture des biphosphonates et le ranelate de strontium. Le ranelate de strontium est un médicament actuellement à l'étude dans le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique<sup>335</sup>. Des études *in vitro* réalisées au sein de notre laboratoire ont montré que cette molécule stimulait la synthèse d'agrecane par les chondrocytes humains<sup>336</sup>. *In vitro*, le ranelate de strontium favorise également la formation de la matrice osseuse<sup>337</sup>. Il n'est pas impossible que ce médicament présente des effets particuliers sur les ostéoblastes SC et régularise leur activité synthétique.



**Figure 81 :** Représentation schématique des mécanismes d'action des IAS sur la physiopathologie de l'arthrose. Les IAS diminuent les altérations phénotypiques des ostéoblastes sous-chondraux responsables de la sclérose. Ils diminuent également l'impact biochimique de ces ostéoblastes altérés sur le métabolisme des chondrocytes. Enfin, ils agissent également de manière directe sur le métabolisme des chondrocytes en favorisant la réparation matricielle et en diminuant sa dégradation. TGF-β1 : transforming growth factor, HGF : hepatocyte growth factor, IL-6 : interleukine-6, IGF-1 : insulin-like growth factor, uPA : activateur du plasminogène de type urokinase.



1. **REGINSTER J.Y. & KHALTAEV N.G.**  
*Introduction and WHO perspective on the global burden of musculoskeletal conditions.*  
Rheumatology (Oxford) 2002. 41 Supp 1: 1-2.
2. **RADIN E.L., PAUL I.L. & TOLKOFF M.J.**  
*Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease.*  
Arthritis Rheum 1970. 13: 400-5.
3. **DEDRICK D.K., GOLDSTEIN S.A., BRANDT K.D., O'CONNOR B.L., GOULET R.W. & ALBRECHT M.**  
*A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months.*  
Arthritis Rheum 1993. 36: 1460-7.
4. **BOBINAC D., SPANJOL J., ZORICIC S. & MARIC I.**  
*Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans.*  
Bone 2003. 32: 284-90.
5. **RADIN E.L. & ROSE R.M.**  
*Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage.*  
Clin Orthop 1986: 34-40.
6. **WATSON P.J., HALL L.D., MALCOLM A. & TYLER J.A.**  
*Degenerative joint disease in the guinea pig. Use of magnetic resonance imaging to monitor progression of bone pathology.*  
Arthritis Rheum 1996. 39: 1327-37.
7. **CARLSON C.S., LOESER R.F., PURSER C.B., GARDIN J.F. & JEROME C.P.**  
*Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease.*  
J Bone Miner Res 1996. 11: 1209-17.
8. **DING M., ODGAARD A. & HVID I.**  
*Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis.*  
J Bone Joint Surg Br 2003. 85: 906-12.
9. **HAYAMI T., PICKARSKI M., WESOLOWSKI G.A., MCLANE J., BONE A., DESTEFANO J., RODAN G.A. & DUONG LE T.**  
*The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model.*  
Arthritis Rheum 2004. 50: 1193-206.
10. **MASSICOTTE F., LAJEUNESSE D., BENDERDOUR M., PELLETIER J.P., HILAL G., DUVAL N. & MARTEL-PELLETIER J.**  
*Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients.*  
Osteoarthritis Cartilage 2002. 10: 491-500.
11. **HILAL G., MASSICOTTE F., MARTEL-PELLETIER J., FERNANDES J.C., PELLETIER J.P. & LAJEUNESSE D.**  
*Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts.*  
J Bone Miner Res 2001. 16: 713-21.
12. **HILAL G., MARTEL-PELLETIER J., PELLETIER J.P., DUVAL N. & LAJEUNESSE D.**  
*Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts.*  
Arthritis Rheum 1999. 42: 2112-22.
13. **HILAL G., MARTEL-PELLETIER J., PELLETIER J.P., RANGER P. & LAJEUNESSE D.**  
*Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis.*  
Arthritis Rheum 1998. 41: 891-9.
14. **SOKOLOFF L.**  
*Microcracks in the calcified layer of articular cartilage.*  
Arch Pathol Lab Med 1993. 117: 191-5.

15. **GUEVREMONT M., MARTEL-PELLETIER J., MASSICOTTE F., TARDIF G., PELLETIER J.P., RANGER P., LAJEUNESSE D. & REBOUL P.**  
*Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage.*  
J Bone Miner Res 2003. 18: 1073-81.
16. **SHARIF M., GEORGE E. & DIEPPE P.A.**  
*Correlation between synovial fluid markers of cartilage and bone turnover and scintigraphic scan abnormalities in osteoarthritis of the knee.*  
Arthritis Rheum 1995. 38: 78-81.
17. **WESTACOTT C.I., WEBB G.R., WARNOCK M.G., SIMS J.V. & ELSON C.J.**  
*Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone.*  
Arthritis Rheum 1997. 40: 1282-91.
18. **BALLOCK R.T. & O'KEEFE R.J.**  
*Physiology and pathophysiology of the growth plate.*  
Birth Defects Res Part C Embryo Today 2003. 69: 123-43.
19. **MALLEIN-GERIN F. & VAN DER REST M.**  
*La culture du chondrocytes : outils d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage.*  
Médecine/sciences 1996. 12: 1087-96.
20. **SHUKUNAMI C., IYAMA K., INOUE H. & HIRAKI Y.**  
*Spatiotemporal pattern of the mouse chondromodulin-I gene expression and its regulatory role in vascular invasion into cartilage during endochondral bone formation.*  
Int J Dev Biol 1999. 43: 39-49.
21. **TCHETINA E., MWALE F. & POOLE A.R.**  
*Distinct phases of coordinated early and late gene expression in growth plate chondrocytes in relationship to cell proliferation, matrix assembly, remodeling, and cell differentiation.*  
J Bone Miner Res 2003. 18: 844-51.
22. **TERKELTAUB R.A., JOHNSON K., ROHNOW D., GOOMER R., BURTON D. & DEFTOS L.J.**  
*Bone morphogenetic proteins and bFGF exert opposing regulatory effects on PTHrP expression and inorganic pyrophosphate elaboration in immortalized murine endochondral hypertrophic chondrocytes (MCT cells).*  
J Bone Miner Res 1998. 13: 931-41.
23. **OGAWA T., SHIMOKAWA H., FUKADA K., SUZUKI S., SHIBATA S., OHYA K. & KURODA T.**  
*Localization and inhibitory effect of basic fibroblast growth factor on chondrogenesis in cultured mouse mandibular condyle.*  
J Bone Miner Metab 2003. 21: 145-53.
24. **PETERSEN W. & RAFII M.**  
*Immunolocalization of the angiogenetic factor pleiotrophin (PTN) in the growth plate of mice.*  
Arch Orthop Trauma Surg 2001. 121: 414-6.
25. **TAPP H., HERNANDEZ D.J., NEAME P.J. & KOOB T.J.**  
*Pleiotrophin inhibits chondrocyte proliferation and stimulates proteoglycan synthesis in mature bovine cartilage.*  
Matrix Biol 1999. 18: 543-56.
26. **BUXTON P.G., HALL B., ARCHER C.W. & FRANCIS-WEST P.**  
*Secondary chondrocyte-derived Ihh stimulates proliferation of periosteal cells during chick development.*  
Development 2003. 130: 4729-39.
27. **VORTKAMP A., LEE K., LANSKE B., SEGRE G.V., KRONENBERG H.M. & TABIN C.J.**  
*Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein.*  
Science 1996. 273: 613-22.
28. **ALVAREZ J., SOHN P., ZENG X., DOETSCHMAN T., ROBBINS D.J. & SERRA R.**  
*TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression.*  
Development 2002. 129: 1913-24.
29. **HAAIJMAN A., KARPERIEN M., LANSKE B., HENDRIKS J., LOWIK C.W., BRONCKERS A.L. & BURGER E.H.**

- Inhibition of terminal chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein 7 (OP-1) in vitro depends on the periarticular region but is independent of parathyroid hormone-related peptide.*  
Bone 1999. 25: 397-404.
30. **HUANG W., CHUNG U.I., KRONENBERG H.M. & DE CROMBRUGGHE B.**  
*The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 2001. 98: 160-5.
31. **JOHNSON K.A. & TERKELTAUB R.A.**  
*External GTP-bound transglutaminase 2 is a molecular switch for chondrocyte hypertrophic differentiation and calcification.*  
J Biol Chem 2005.
32. **JOHNSON K.A., VAN ETTEN D., NANDA N., GRAHAM R.M. & TERKELTAUB R.A.**  
*Distinct transglutaminase 2-independent and transglutaminase 2-dependent pathways mediate articular chondrocyte hypertrophy.*  
J Biol Chem 2003. 278: 18824-32.
33. **KIRSCH T.**  
*Annexins - their role in cartilage mineralization.*  
Front Biosci 2005. 10: 576-81.
34. **WANG W., XU J., DU B. & KIRSCH T.**  
*Role of the progressive ankylosis gene (ank) in cartilage mineralization.*  
Mol Cell Biol 2005. 25: 312-23.
35. **JOHNSON K., PRITZKER K., GODING J. & TERKELTAUB R.**  
*The nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase isozyme PC-1 directly promotes cartilage calcification through chondrocyte apoptosis and increased calcium precipitation by mineralizing vesicles.*  
J Rheumatol 2001. 28: 2681-91.
36. **LI G., CUI Y., MCILMURRAY L., ALLEN W. & WANG H.**  
*rhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells.*  
J Orthop Res 2005. 23: 680-85.
37. **YANG X., TARE R.S., PARTRIDGE K.A., ROACH H.I., CLARKE N.M., HOWDLE S.M., SHAKESHEFF K.M. & OREFFO R.O.**  
*Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering.*  
J Bone Miner Res 2003. 18: 47-57.
38. **WHITE A. & WALLIS G.**  
*Endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralisation.*  
Curr Biol 2001. 11: R589-91.
39. **CHEVALIER X.**  
*[Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage].*  
Presse Med 1998. 27: 75-80.
40. **THONAR E.J.M.A., MASUDA K., MANICOURT D.H. & KUETTNER K.E.**  
*Structure and function of normal human adult articular cartilage.*  
Dans "Osteoarthritis, clinical and experimental aspects", édité par Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. & Henrotin Y.  
Springer 1999, Berlin, p. 1-19.
41. **JAY G.D., TANTRAVAHU U., BRITT D.E., BARRACH H.J. & CHA C.J.**  
*Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25.*  
J Orthop Res 2001. 19: 677-87.
42. **TESHIMA R., ONO M., YAMASHITA Y., HIRAKAWA H., NAWATA K. & MORIO Y.**  
*Immunohistochemical collagen analysis of the most superficial layer in adult articular cartilage.*  
J Orthop Sci 2004. 9: 270-3.
43. **VENN M.F.**  
*Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation.*  
Ann Rheum Dis 1979. 38: 57-62.

44. **HEINEN E.**  
*Les tissus cartilagineux.*  
Dans "*Histologie humaine - Tome I*". 1997, Liège: 56-62.
45. **VAN DER REST M. & MAYNE R.**  
*Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen.*  
J Biol Chem 1988. 263: 1615-8.
46. **EYRE D.**  
*Collagen of articular cartilage.*  
Arthritis Res 2002. 4: 30-5.
47. **HEINEGARD D. & OLDBERG A.**  
*Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules.*  
Faseb J 1989. 3: 2042-51.
48. **HARDINGHAM T.E. & FOSANG A.J.**  
*The structure of aggrecan and its turnover in cartilage.*  
J Rheumatol Suppl 1995. 43: 86-90.
49. **KUETTNER K. & THONAR E.J.**  
*Osteoarthritis and related disorders: cartilage integrity and homeostasis.*  
Dans "*Rheumatology, 2nd ed.*" édité par Klippel J.H. & Dieppe P.  
Mosby International 1998, London, p. 861-16.
50. **CHAVASSIEUX P. & MEUNIER P.**  
*Histologie et cytologie de l'os normal.*  
Dans "*Encycl Méd Chir, Appareil locomoteur*", édité par Editions Scientifiques et Médicales  
Elsevier SAS 2003, Paris, p. 6.
51. **BOYLE W.J., SIMONET W.S. & LACEY D.L.**  
*Osteoclast differentiation and activation.*  
Nature 2003. 423: 337-42.
52. **GARNER S.C., ANDERSON J.J.B. & AMBROSE W.W.**  
*Skeletal tissues and mineralization.*  
Dans "*Calcium and phosphorus in health and disease*", édité par Anderson J.J.B. & Garner S.C.  
CRC Press 1996, Boca Raton, p. 97-117.
53. **ANDERSON H.C.**  
*Mechanism of mineral formation in bone.*  
Lab Invest 1989. 60: 320-30.
54. **EL-MAADAWY S., KAARTINEN M.T., SCHINKE T., MURSHED M., KARSENTY G. & MCKEE M.D.**  
*Cartilage formation and calcification in arteries of mice lacking matrix Gla protein.*  
Connect Tissue Res 2003. 44 Suppl 1: 272-8.
55. **TERMINE J.D., KLEINMAN H.K., WHITSON S.W., CONN K.M., MCGARVEY M.L. & MARTIN G.R.**  
*Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen.*  
Cell 1981. 26: 99-105.
56. **FISHER L.W., WHITSON S.W., AVIOLI L.V. & TERMINE J.D.**  
*Matrix sialoprotein of developing bone.*  
J Biol Chem 1983. 258: 12723-7.
57. **FISHER L.W., TERMINE J.D., DEJTER S.W., JR., WHITSON S.W., YANAGISHITA M., KIMURA J.H., HASCALL V.C., KLEINMAN H.K., HASSELL J.R. & NILSSON B.**  
*Proteoglycans of developing bone.*  
J Biol Chem 1983. 258: 6588-94.
58. **FROST H.M.**  
*Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem.*  
Anat Rec 1990. 226: 403-13.
59. **CHAMBERS T.J. & FULLER K.**  
*Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact.*  
J Cell Sci 1985. 76: 155-65.
60. **CHAMBERS T.J.**  
*The cellular basis of bone resorption.*

- Clin Orthop Relat Res 1980: 283-93.
61. **MULLER-GERBL M.**  
*The subchondral bone plate.*  
Adv Anat Embryol Cell Biol 1998. 141: III-XI, 1-134.
  62. **IMHOF H., SULZBACHER I., GRAMPP S., CZERNY C., YOUSSEFZADEH S. & KAINBERGER F.**  
*Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit.*  
Invest Radiol 2000. 35: 581-8.
  63. **BROWN T.D., RADIN E.L., MARTIN R.B. & BURR D.B.**  
*Finite element studies of some juxtarticular stress changes due to localized subchondral stiffening.*  
J Biomech 1984. 17: 11-24.
  64. **HOSHINO A. & WALLACE W.A.**  
*Impact-absorbing properties of the human knee.*  
J Bone Joint Surg Br 1987. 69: 807-11.
  65. **RADIN E.L., PAUL I.L. & LOWY M.**  
*A comparison of the dynamic force transmitting properties of subchondral bone and articular cartilage.*  
J Bone Joint Surg Am 1970. 52: 444-56.
  66. **DUNCAN H., JUNDT J., RIDDLE J.M., PITCHFORD W. & CHRISTOPHERSON T.**  
*The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study.*  
J Bone Joint Surg Am 1987. 69: 1212-20.
  67. **MILZ S. & PUTZ R.**  
*Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau.*  
J Anat 1994. 185 ( Pt 1): 103-10.
  68. **COOPER C., MCALINDON T., SNOW S., VINES K., YOUNG P., KIRWAN J. & DIEPPE P.**  
*Mechanical and constitutional risk factors for symptomatic knee osteoarthritis: differences between medial tibiofemoral and patellofemoral disease.*  
J Rheumatol 1994. 21: 307-13.
  69. **DOUGADOS M., GUEGUEN A., NGUYEN M., THIESCE A., LISTRAT V., JACOB L., NAKACHE J.P., GABRIEL K.R., LEQUESNE M. & AMOR B.**  
*Longitudinal radiologic evaluation of osteoarthritis of the knee.*  
J Rheumatol 1992. 19: 378-84.
  70. **BUCKLAND-WRIGHT J.C., MACFARLANE D.G., LYNCH J.A. & JASANI M.K.**  
*Quantitative microfocal radiography detects changes in OA knee joint space width in patients in placebo controlled trial of NSAID therapy.*  
J Rheumatol 1995. 22: 937-43.
  71. **BLUTEAU G., CONROZIER T., MATHIEU P., VIGNON E., HERBAGE D. & MALLEIN-GERIN F.**  
*Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis.*  
Biochim Biophys Acta 2001. 1526: 147-58.
  72. **CHUBINSKAYA S., KUETTNER K.E. & COLE A.A.**  
*Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints.*  
Lab Invest 1999. 79: 1669-77.
  73. **OKADA Y., SHINMEI M., TANAKA O., NAKA K., KIMURA A., NAKANISHI I., BAYLISS M.T., IWATA K. & NAGASE H.**  
*Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium.*  
Lab Invest 1992. 66: 680-90.
  74. **AIGNER T., ZIEN A., GEHSITZ A., GEBHARD P.M. & MCKENNA L.**  
*Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology.*  
Arthritis Rheum 2001. 44: 2777-89.
  75. **OHTA S., IMAI K., YAMASHITA K., MATSUMOTO T., AZUMANO I. & OKADA Y.**  
*Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage.*  
Lab Invest 1998. 78: 79-87.
  76. **FREEMONT A.J., HAMPSON V., TILMAN R., GOUPILLE P., TAIWO Y. & HOYLAND J.A.**  
*Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific.*  
Ann Rheum Dis 1997. 56: 542-9.

77. **MAKOWSKI G.S. & RAMSBY M.L.**  
*Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection.*  
Clin Chim Acta 2003. 329: 77-81.
78. **IMAI K., OHTA S., MATSUMOTO T., FUJIMOTO N., SATO H., SEIKI M. & OKADA Y.**  
*Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage.*  
Am J Pathol 1997. 151: 245-56.
79. **HENROTIN Y., SANCHEZ C. & REGINSTER J.Y.**  
*The inhibition of matrix metalloproteinases to treat osteoarthritis: reality and new perspectives.*  
Expert Opin Ther Patents 2002. 12: 29-43.
80. **JOHNSON L., DYER R. & HUPE D.**  
*Matrix metalloproteinases.*  
Curr Opin Chem Biol 1998. 2: 466-71.
81. **HENROTIN Y., DEBY-DUPONT G. & REGINSTER J.Y.**  
*[Biochemical mediators of inflammation].*  
Rev Med Liege 2001. 56: 433-42.
82. **BREW K., DINAKARPANDIAN D. & NAGASE H.**  
*Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.*  
Biochim Biophys Acta 2000. 1477: 267-83.
83. **SU S., DEHNADE F. & ZAFARULLAH M.**  
*Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by transforming growth factor-beta and dexamethasone in bovine and human articular chondrocytes.*  
DNA Cell Biol 1996. 15: 1039-48.
84. **SU S., GROVER J., ROUGHLEY P.J., DIBATTISTA J.A., MARTEL-PELLETIER J., PELLETIER J.P. & ZAFARULLAH M.**  
*Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints.*  
Rheumatol Int 1999. 18: 183-91.
85. **ZAFARULLAH M., SU S., MARTEL-PELLETIER J., DIBATTISTA J.A., COSTELLO B.G., STETLER-STEVENSON W.G. & PELLETIER J.P.**  
*Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes.*  
J Cell Biochem 1996. 60: 211-7.
86. **ZAFARULLAH M., PELLETIER J.P., CLOUTIER J.M. & MARTEL-PELLETIER J.**  
*Elevated metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA in human osteoarthritic synovia.*  
J Rheumatol 1993. 20: 693-7.
87. **HUANG W., LI W.Q., DEHNADE F. & ZAFARULLAH M.**  
*Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage.*  
J Cell Biochem 2002. 85: 295-303.
88. **MARTEL-PELLETIER J., MCCOLLUM R., FUJIMOTO N., OBATA K., CLOUTIER J.M. & PELLETIER J.P.**  
*Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.*  
Lab Invest 1994. 70: 807-15.
89. **AMOUR A., KNIGHT C.G., WEBSTER A., SLOCOMBE P.M., STEPHENS P.E., KNAUPER V., DOCHERTY A.J. & MURPHY G.**  
*The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3.*  
FEBS Lett 2000. 473: 275-9.
90. **BERNARDO M.M. & FRIDMAN R.**  
*TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1-MMP.*  
Biochem J 2003. 374: 739-45.
91. **YU W.H., YU S., MENG Q., BREW K. & WOESSNER J.F., JR.**

- TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix.*  
J Biol Chem 2000. 275: 31226-32.
92. **AMOUR A., SLOCOMBE P.M., WEBSTER A., BUTLER M., KNIGHT C.G., SMITH B.J., STEPHENS P.E., SHELLEY C., HUTTON M., KNAUPER V., DOCHERTY A.J. & MURPHY G.**  
*TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3.*  
FEBS Lett 1998. 435: 39-44.
93. **HASHIMOTO G., AOKI T., NAKAMURA H., TANZAWA K. & OKADA Y.**  
*Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (-1, 2, 3 and 4).*  
FEBS Lett 2001. 494: 192-5.
94. **KASHIWAGI M., TORTORELLA M., NAGASE H. & BREW K.**  
*TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5).*  
J Biol Chem 2001. 276: 12501-4.
95. **CELIKER M.Y., RAMAMURTHY N., XU J.W., WANG M., JIANG Y., GREENWALD R. & SHI Y.E.**  
*Inhibition of adjuvant-induced arthritis by systemic tissue inhibitor of metalloproteinases 4 gene delivery.*  
Arthritis Rheum 2002. 46: 3361-8.
96. **OLEKSYSZYN J. & AUGUSTINE A.J.**  
*Plasminogen modulation of IL-1-stimulated degradation in bovine and human articular cartilage explants. The role of the endogenous inhibitors: PAI-1, alpha 2-antiplasmin, alpha 1-PI, alpha 2-macroglobulin and TIMP.*  
Inflamm Res 1996. 45: 464-72.
97. **VAN DEN BERG W.B., VAN DER KRAAN P.M. & VAN BREUNINGEN H.M.**  
*Role of growth factors and cartilage repair.*  
Dans "Osteoarthritis, clinical and experimental aspects", édité par Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. & Henrotin Y.  
Springer 1999, Berlin, p. 188-209.
98. **GOLDRING M.B.**  
*Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines.*  
Curr Rheumatol Rep 2000. 2: 459-65.
99. **DAYER J.M. & AREND W.P.**  
*Cytokines and growth factors.*  
Dans "Textbook of rheumatology", édité par Kelley W.N., Harris E.D., Ruddy S. & Sledge C.B.  
Saunders company 1997, Philadelphie, p. 267-285.
100. **AREND W.P.**  
*Interleukin-1 receptor antagonist.*  
Adv Immunol 1993. 54: 167-227.
101. **GOLDRING M.B.**  
*The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models.*  
Connect Tissue Res 1999. 40: 1-11.
102. **FLANNERY C.R., LITTLE C.B., CATERSON B. & HUGHES C.E.**  
*Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes.*  
Matrix Biol 1999. 18: 225-37.
103. **TYLER J., BIRD J.L.E. & GILLER T.**  
*Interleukin-1 inhibits the production of types II, IX and XI procollagen mRNA in cartilage.*  
Ann N Y Acad Sci 1990. 580: 512-513.
104. **MENGSHOL J.A., VINCENTI M.P., COON C.I., BARCHOWSKY A. & BRINCKERHOFF C.E.**  
*Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3.*  
Arthritis Rheum 2000. 43: 801-11.
105. **PRATTA M.A., SCHERLE P.A., YANG G., LIU R.Q. & NEWTON R.C.**  
*Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein.*  
Arthritis Rheum 2003. 48: 119-33.
106. **MARTEL-PELLETIER J., ZAFARULLAH M., KODAMA S. & PELLETIER J.P.**

- In vitro effects of interleukin 1 on the synthesis of metalloproteases, TIMP, plasminogen activators and inhibitors in human articular cartilage.*  
 J Rheumatol Suppl 1991. 27: 80-4.
107. **OLLIVIERE F., GUBLER U., TOWLE C.A., LAURENCIN C. & TREADWELL B.V.**  
*Expression of IL-1 genes in human and bovine chondrocytes: a mechanism for autocrine control of cartilage matrix degradation.*  
 Biochem Biophys Res Commun 1986. 141: 904-11.
108. **MARTEL-PELLETIER J., MCCOLLUM R., DIBATTISTA J., FAURE M.P., CHIN J.A., FOURNIER S., SARFATI M. & PELLETIER J.P.**  
*The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function.*  
 Arthritis Rheum 1992. 35: 530-40.
109. **PUJOL J.P. & LOYAU G.**  
*Interleukin-1 and osteoarthritis.*  
 Life Sci 1987. 41: 1187-98.
110. **BUTTLE D.J., HANDLEY C.J., ILIC M.Z., SAKLATVALA J., MURATA M. & BARRETT A.J.**  
*Inhibition of cartilage proteoglycan release by a specific inactivator of cathepsin B and an inhibitor of matrix metalloproteinases. Evidence for two converging pathways of chondrocyte-mediated proteoglycan degradation.*  
 Arthritis Rheum 1993. 36: 1709-17.
111. **LOTZ M., BLANCO F.J., VON KEMPIS J., DUDLER J., MAIER R., VILLIGER P.M. & GENG Y.**  
*Cytokine regulation of chondrocyte functions.*  
 J Rheumatol Suppl 1995. 43: 104-8.
112. **TIKU M.L., LIESCH J.B. & ROBERTSON F.M.**  
*Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines.*  
 J Immunol 1990. 145: 690-6.
113. **LEIZER T., CLARRIS B.J., ASH P.E., VAN DAMME J., SAKLATVALA J. & HAMILTON J.A.**  
*Interleukin-1 beta and interleukin-1 alpha stimulate the plasminogen activator activity and prostaglandin E2 levels of human synovial cells.*  
 Arthritis Rheum 1987. 30: 562-6.
114. **THOMAS B., THIRION S., HUMBERT L., TAN L., GOLDRING M.B., BEREZIAT G. & BERENBAUM F.**  
*Differentiation regulates interleukin-1beta-induced cyclo-oxygenase-2 in human articular chondrocytes: role of p38 mitogen-activated protein kinase.*  
 Biochem J 2002. 362: 367-73.
115. **DEMOOR-FOSSARD M., REDINI F., BOITTIN M. & PUJOL J.P.**  
*Expression of decorin and biglycan by rabbit articular chondrocytes. Effects of cytokines and phenotypic modulation.*  
 Biochim Biophys Acta 1998. 1398: 179-91.
116. **VILLIGER P.M., KUSARI A.B., TEN DIJKE P. & LOTZ M.**  
*IL-1 beta and IL-6 selectively induce transforming growth factor-beta isoforms in human articular chondrocytes.*  
 J Immunol 1993. 151: 3337-44.
117. **MATHY-HARTERT M., DEBY-DUPONT G.P., REGINSTER J.Y., AYACHE N., PUJOL J.P. & HENROTIN Y.E.**  
*Regulation by reactive oxygen species of interleukin-1beta, nitric oxide and prostaglandin E(2) production by human chondrocytes.*  
 Osteoarthritis Cartilage 2002. 10: 547-55.
118. **MASSAAD C., PARADON M., JACQUES C., SALVAT C., BEREZIAT G., BERENBAUM F. & OLIVIER J.L.**  
*Induction of secreted type IIA phospholipase A2 gene transcription by interleukin-1beta. Role of C/EBP factors.*  
 J Biol Chem 2000. 275: 22686-94.
119. **HENROTIN Y.E., DE GROOTE D.D., LABASSE A.H., GASPAR S.E., ZHENG S.X., GEENEN V.G. & REGINSTER J.Y.**  
*Effects of exogenous IL-1 beta, TNF alpha, IL-6, IL-8 and LIF on cytokine production by human articular chondrocytes.*

- Osteoarthritis Cartilage 1996. 4: 163-73.
120. **RICKARD D.J., GOWEN M. & MACDONALD B.R.**  
*Proliferative responses to estradiol, IL-1 alpha and TGF beta by cells expressing alkaline phosphatase in human osteoblast-like cell cultures.*  
Calcif Tissue Int 1993. 52: 227-33.
121. **TAKAOKA Y., NIWA S. & NAGAI H.**  
*Interleukin-1beta induces interleukin-6 production through the production of prostaglandin E(2) in human osteoblasts, MG-63 cells.*  
J Biochem (Tokyo) 1999. 126: 553-8.
122. **EVANS D.B., BUNNING R.A. & RUSSELL R.G.**  
*The effects of recombinant human interleukin-1 beta on cellular proliferation and the production of prostaglandin E2, plasminogen activator, osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone.*  
Biochem Biophys Res Commun 1990. 166: 208-16.
123.  **TSAI J.A., RONG H., TORRING O., MATSUSHITA H. & BUCHT E.**  
*Interleukin-1beta upregulates PTHrP-mRNA expression and protein production and decreases TGF-beta in normal human osteoblast-like cells.*  
Calcif Tissue Int 2000. 66: 363-9.
124. **GUERNE P.A., DESGEORGES A., JASPAR J.M., RELIC B., PETER R., HOFFMEYER P. & DAYER J.M.**  
*Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone.*  
Matrix Biol 1999. 18: 253-60.
125. **NOMA T., MIZUTA T., ROSEN A., HIRANO T., KISHIMOTO T. & HONJO T.**  
*Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines.*  
Immunol Lett 1987. 15: 249-53.
126. **NICOLA N.A.**  
*Granulocyte colony-stimulating factor and differentiation-induction in myeloid leukemic cells.*  
Int J Cell Cloning 1987. 5: 1-15.
127. **BIFFL W.L., MOORE E.E., MOORE F.A. & BARNETT C.C., JR.**  
*Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor.*  
J Trauma 1996. 40: 575-8; discussion 578-9.
128. **FEY G.H., HATTORI M., NORTHEMANN W., ABRAHAM L.J., BAUMANN M., BRACIAK T.A., FLETCHER R.G., GAULDIE J., LEE F. & REYMOND M.F.**  
*Regulation of rat liver acute phase genes by interleukin-6 and production of hepatocyte stimulating factors by rat hepatoma cells.*  
Ann N Y Acad Sci 1989. 557: 317-29; discussion 329-31.
129. **FISCHER D.C., SIEBERTZ B., VAN DE LEUR E., SCHIWY-BOCHAT K.H., GRAEVE L., HEINRICH P.C. & HAUBECK H.D.**  
*Induction of alpha1-antitrypsin synthesis in human articular chondrocytes by interleukin-6-type cytokines: evidence for a local acute-phase response in the joint.*  
Arthritis Rheum 1999. 42: 1936-45.
130. **TILG H., TREHU E., ATKINS M.B., DINARELLO C.A. & MIER J.W.**  
*Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55.*  
Blood 1994. 83: 113-8.
131. **POIRAUDEAU S., BERENBAUM F. & CORVOL M.**  
*[Cartilage degradation and articular inflammation].*  
Rev Prat 1996. 46: 2180-5.
132. **DESGEORGES A., GABAY C., SILACCI P., NOVICK D., ROUX-LOMBARD P., GRAU G., DAYER J.M., VISCHER T. & GUERNE P.A.**  
*Concentrations and origins of soluble interleukin 6 receptor-alpha in serum and synovial fluid.*  
J Rheumatol 1997. 24: 1510-6.
133. **SHINMEI M., MASUDA K., KIKUCHI T., SHIMOMURA Y. & OKADA Y.**  
*Production of cytokines by chondrocytes and its role in proteoglycan degradation.*  
J Rheumatol Suppl 1991. 27: 89-91.

134. **LOTZ M. & GUERNE P.A.**  
*Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA).*  
J Biol Chem 1991. 266: 2017-20.
135. **SHINGU M., ISAYAMA T., YASUTAKE C., NAONO T., NOBUNAGA M., TOMARI K., HORIE K. & GOTO Y.**  
*Role of oxygen radicals and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation.*  
Inflammation 1994. 18: 613-23.
136. **DE HOOGE A.S., VAN DE LOO F.A., BENNINK M.B., ARNTZ O.J., DE HOOGE P. & VAN DEN BERG W.B.**  
*Male IL-6 gene knock out mice developed more advanced osteoarthritis upon aging.*  
Osteoarthritis Cartilage 2005. 13: 66-73.
137. **LEGENDRE F., DUDHIA J., PUJOL J.P. & BOGDANOWICZ P.**  
*JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression.*  
J Biol Chem 2003. 278: 2903-12.
138. **NIETFELD J.J., WILBRINK B., HELLE M., VAN ROY J.L., DEN OTTER W., SWAAK A.J. & HUBER-BRUNING O.**  
*Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage.*  
Arthritis Rheum 1990. 33: 1695-701.
139. **ROWAN A.D., KOSHY P.J., SHINGLETON W.D., DEGNAN B.A., HEATH J.K., VERNALLIS A.B., SPAULL J.R., LIFE P.F., HUDSON K. & CAWSTON T.E.**  
*Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown.*  
Arthritis Rheum 2001. 44: 1620-32.
140. **JIKKO A., WAKISAKA T., IWAMOTO M., HIRANUMA H., KATO Y., MAEDA T., FUJISHITA M. & FUCHIHATA H.**  
*Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures.*  
Cell Biol Int 1998. 22: 615-21.
141. **FLANNERY C.R., LITTLE C.B., HUGHES C.E., CURTIS C.L., CATERSON B. & JONES S.A.**  
*IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage.*  
Matrix Biol 2000. 19: 549-53.
142. **ISHIMI Y., MIYAURA C., JIN C.H., AKATSU T., ABE E., NAKAMURA Y., YAMAGUCHI A., YOSHIKI S., MATSUDA T., HIRANO T. & ET AL.**  
*IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.*  
J Immunol 1990. 145: 3297-303.
143. **KURIHARA N., BERTOLINI D., SUDA T., AKIYAMA Y. & ROODMAN G.D.**  
*IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release.*  
J Immunol 1990. 144: 4226-30.
144. **TAI H., MIYAURA C., PILBEAM C.C., TAMURA T., OHSUGI Y., KOISHIHARA Y., KUBODERA N., KAWAGUCHI H., RAISZ L.G. & SUDA T.**  
*Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation.*  
Endocrinology 1997. 138: 2372-9.
145. **PALMQVIST P., PERSSON E., CONAWAY H.H. & LERNER U.H.**  
*IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae.*  
J Immunol 2002. 169: 3353-62.
146. **ROMAS E., UDAGAWA N., ZHOU H., TAMURA T., SAITO M., TAGA T., HILTON D.J., SUDA T., NG K.W. & MARTIN T.J.**  
*The role of gp130-mediated signals in osteoclast development: regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures.*

- J Exp Med 1996. 183: 2581-91.
147. **FRANCHIMONT N., RYDZIEL S., DELANY A.M. & CANALIS E.**  
*Interleukin-6 and its soluble receptor cause a marked induction of collagenase 3 expression in rat osteoblast cultures.*  
J Biol Chem 1997. 272: 12144-50.
148. **DAMIENS C., FORTUN Y., CHARRIER C., HEYMANN D. & PADRINES M.**  
*Modulation by soluble factors of gelatinase activities released by osteoblastic cells.*  
Cytokine 2000. 12: 1727-31.
149. **FRANCHIMONT N., GANGJI V., DURANT D. & CANALIS E.**  
*Interleukin-6 with its soluble receptor enhances the expression of insulin-like growth factor-I in osteoblasts.*  
Endocrinology 1997. 138: 5248-55.
150. **TAGUCHI Y., YAMAMOTO M., YAMATE T., LIN S.C., MOCHARLA H., DETOGNI P., NAKAYAMA N., BOYCE B.F., ABE E. & MANOLAGAS S.C.**  
*Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage.*  
Proc Assoc Am Physicians 1998. 110: 559-74.
151. **YEH L.C., ZAVALA M.C. & LEE J.C.**  
*Osteogenic protein-1 and interleukin-6 with its soluble receptor synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation.*  
J Cell Physiol 2002. 190: 322-31.
152. **OKAMOTO H., YAMAMURA M., MORITA Y., HARADA S., MAKINO H. & OTA Z.**  
*The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis.*  
Arthritis Rheum 1997. 40: 1096-105.
153. **MANICOURT D.H., POILVACHE P., VAN EGEREN A., DEVOGELAER J.P., LENZ M.E. & THONAR E.J.**  
*Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis.*  
Arthritis Rheum 2000. 43: 281-8.
154. **LISIGNOLI G., PIACENTINI A., TONEGUZZI S., GRASSI F., COCCHINI B., FERRUZZI A., GUALTIERI G. & FACCHINI A.**  
*Osteoblasts and stromal cells isolated from femora in rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) patients express IL-11, leukaemia inhibitory factor and oncostatin M.*  
Clin Exp Immunol 2000. 119: 346-53.
155. **CAWSTON T.E., CURRY V.A., SUMMERS C.A., CLARK I.M., RILEY G.P., LIFE P.F., SPAULL J.R., GOLDRING M.B., KOSHY P.J., ROWAN A.D. & SHINGLETON W.D.**  
*The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint.*  
Arthritis Rheum 1998. 41: 1760-71.
156. **WEINHOLD B. & RUTHER U.**  
*Interleukin-6-dependent and -independent regulation of the human C-reactive protein gene.*  
Biochem J 1997. 327 ( Pt 2): 425-9.
157. **NEMOTO O., YAMADA H., MUKAIDA M. & SHIMMEI M.**  
*Stimulation of TIMP-1 production by oncostatin M in human articular cartilage.*  
Arthritis Rheum 1996. 39: 560-6.
158. **KOSHY P.J., LUNDY C.J., ROWAN A.D., PORTER S., EDWARDS D.R., HOGAN A., CLARK I.M. & CAWSTON T.E.**  
*The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.*  
Arthritis Rheum 2002. 46: 961-7.
159. **BELL M.C., CARROLL G.J., CHAPMAN H.M., MILLS J.N. & HUI W.**  
*Oncostatin M induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in vivo in goat joints.*

- Arthritis Rheum 1999. 42: 2543-51.
160. **HUI W., ROWAN A.D. & CAWSTON T.**  
*Insulin-like growth factor 1 blocks collagen release and down regulates matrix metalloproteinase-1, -3, -8, and -13 mRNA expression in bovine nasal cartilage stimulated with oncostatin M in combination with interleukin 1alpha.*  
Ann Rheum Dis 2001. 60: 254-61.
161. **MALAVAL L., LIU F., VERNALLIS A.B. & AUBIN J.E.**  
*GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors.*  
J Cell Physiol 2005.
162. **SHIH C. & YEN C.C.**  
*Effect of oncostatin-M on proliferation and activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells.*  
Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) 1999. 62: 710-6.
163. **JILKA R.L., WEINSTEIN R.S., BELLIDO T., PARFITT A.M. & MANOLAGAS S.C.**  
*Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines.*  
J Bone Miner Res 1998. 13: 793-802.
164. **JAY P.R., CENTRELLA M., LORENZO J., BRUCE A.G. & HOROWITZ M.C.**  
*Oncostatin-M: a new bone active cytokine that activates osteoblasts and inhibits bone resorption.*  
Endocrinology 1996. 137: 1151-8.
165. **VARGHESE S., YU K. & CANALIS E.**  
*Leukemia inhibitory factor and oncostatin M stimulate collagenase-3 expression in osteoblasts.*  
Am J Physiol 1999. 276: E465-71.
166. **LIN S.K., KOK S.H., YEH F.T., KUO M.Y., LIN C.C., WANG C.C., GOLDRING S.R. & HONG C.Y.**  
*MEK/ERK and signal transducer and activator of transcription signaling pathways modulate oncostatin M-stimulated CCL2 expression in human osteoblasts through a common transcription factor.*  
Arthritis Rheum 2004. 50: 785-93.
167. **HENROTIN Y., DEBY-DUPONT G., DEBY C., DE BRUYN M., LAMY M. & FRANCHIMONT P.**  
*Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes.*  
Br J Rheumatol 1993. 32: 562-7.
168. **HENROTIN Y., KURZ B. & AIGNER T.**  
*Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?*  
Osteoarthritis Cartilage 2005.
169. **HENROTIN Y., DEBY-DUPONT G., DEBY C., FRANCHIMONT P. & EMERIT I.**  
*Active oxygen species, articular inflammation and cartilage damage.*  
Exs 1992. 62: 308-22.
170. **FERMOR B., JEFFCOAT D., HENNERBICHLER A., PISETSKY D.S., WEINBERG J.B. & GUILAK F.**  
*The effects of cyclic mechanical strain and tumor necrosis factor alpha on the response of cells of the meniscus.*  
Osteoarthritis Cartilage 2004. 12: 956-62.
171. **TIKU M.L., GUPTA S. & DESHMUKH D.R.**  
*Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants.*  
Free Radic Res 1999. 30: 395-405.
172. **ROBERTS C.R., ROUGHLEY P.J. & MORT J.S.**  
*Degradation of human proteoglycan aggregate induced by hydrogen peroxide. Protein fragmentation, amino acid modification and hyaluronic acid cleavage.*  
Biochem J 1989. 259: 805-11.
173. **LI W.Q., QURESHI H.Y., LIACINI A., DEHNADE F. & ZAFARULLAH M.**  
*Transforming growth factor Beta1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species.*  
Free Radic Biol Med 2004. 37: 196-207.
174. **ZAKANY R., SZIJGYARTO Z., MATTA C., JUHASZ T., CSORTOS C., SZUCS K., CZIFRA G., BIRO T., MODIS L. & GERGELY P.**  
*Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways.*  
Exp Cell Res 2005. 305: 190-9.

175. **HENROTIN Y.E., BRUCKNER P. & PUJOL J.P.**  
*The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage.*  
Osteoarthritis Cartilage 2003. 11: 747-55.
176. **LO Y.Y., CONQUER J.A., GRINSTEIN S. & CRUZ T.F.**  
*Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species.*  
J Cell Biochem 1998. 69: 19-29.
177. **JACQUES C., SAUTET A., MOLDOVAN M., THOMAS B., HUMBERT L. & BERENBAUM F.**  
*Cyclooxygenase activity in chondrocytes from osteoarthritic and healthy cartilage.*  
Rev Rhum Engl Ed 1999. 66: 701-4.
178. **MASUKO-HONGO K., BERENBAUM F., HUMBERT L., SALVAT C., GOLDRING M.B. & THIRION S.**  
*Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways.*  
Arthritis Rheum 2004. 50: 2829-38.
179. **SAHAP ATIK O.**  
*Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis.*  
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1990. 39: 253-4.
180. **NARUMIYA S., SUGIMOTO Y. & USHIKUBI F.**  
*Prostanoid receptors: structures, properties, and functions.*  
Physiol Rev 1999. 79: 1193-226.
181. **FORMAN B.M., CHEN J. & EVANS R.M.**  
*The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators.*  
Ann N Y Acad Sci 1996. 804: 266-75.
182. **AOYAMA T., LIANG B., OKAMOTO T., MATSUSAKI T., NISHIJO K., ISHIBE T., YASURA K., NAGAYAMA S., NAKAYAMA T., NAKAMURA T. & TOGUCHIDA J.**  
*PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes.*  
J Bone Miner Res 2005. 20: 377-89.
183. **DI BATTISTA J.A., DORE S., MARTEL-PELLETIER J. & PELLETIER J.P.**  
*Prostaglandin E2 stimulates incorporation of proline into collagenase digestible proteins in human articular chondrocytes: identification of an effector autocrine loop involving insulin-like growth factor I.*  
Mol Cell Endocrinol 1996. 123: 27-35.
184. **HENROTIN Y.**  
*Approche expérimentale de la pathogénie et du traitement de l'arthrose.*  
Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur, 2003, Université de Liège, Faculté de Médecine.
185. **APPLEYARD R.C., GHOSH P. & SWAIN M.V.**  
*Biomechanical, histological and immunohistological studies of patellar cartilage in an ovine model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy.*  
Osteoarthritis Cartilage 1999. 7: 281-94.
186. **TCHETINA E.V., SQUIRES G. & POOLE A.R.**  
*Increased Type II Collagen Degradation and Very Early Focal Cartilage Degeneration Is Associated with Upregulation of Chondrocyte Differentiation Related Genes in Early Human Articular Cartilage Lesions.*  
J Rheumatol 2005. 32: 876-86.
187. **LORENZO P., BAYLISS M.T. & HEINEGARD D.**  
*Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis.*  
Matrix Biol 2004. 23: 381-91.
188. **KIRSCH T., SWOBODA B. & NAH H.**  
*Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage.*  
Osteoarthritis Cartilage 2000. 8: 294-302.
189. **HENROTIN Y. & REGINSTER J.Y.**  
*Anabolic events in osteoarthritis.*  
Osteoarthritis Cartilage 1999. 7: 310-2.
190. **WANG L., ALMQVIST K.F., VEYS E.M. & VERBRUGGEN G.**

- Control of extracellular matrix homeostasis of normal cartilage by a TGFbeta autocrine pathway. Validation of flow cytometry as a tool to study chondrocyte metabolism in vitro.*  
Osteoarthritis Cartilage 2002. 10: 188-98.
191. **HOMANDBERG G.A., WEN C. & HUI F.**  
*Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid.*  
Osteoarthritis Cartilage 1998. 6: 231-44.
192. **YASUDA T. & POOLE A.R.**  
*A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway.*  
Arthritis Rheum 2002. 46: 138-48.
193. **POOLE A.R., KOBAYASHI M., YASUDA T., LAVERTY S., MWALE F., KOJIMA T., SAKAI T., WAHL C., EL-MAADAWY S., WEBB G., TCHETINA E. & WU W.**  
*Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis.*  
Ann Rheum Dis 2002. 61 Suppl 2: ii78-81.
194. **HOMANDBERG G.A. & WEN C.**  
*Exposure of cartilage to a fibronectin fragment amplifies catabolic processes while also enhancing anabolic processes to limit damage.*  
J Orthop Res 1998. 16: 237-46.
195. **YASUDA T., POOLE A.R., SHIMIZU M., NAKAGAWA T., JULOVI S.M., TAMAMURA H., FUJII N. & NAKAMURA T.**  
*Involvement of CD44 in induction of matrix metalloproteinases by a COOH-terminal heparin-binding fragment of fibronectin in human articular cartilage in culture.*  
Arthritis Rheum 2003. 48: 1271-80.
196. **LUCIC D., MOLLENHAUER J., KILPATRICK K.E. & COLE A.A.**  
*N-telopeptide of type II collagen interacts with annexin V on human chondrocytes.*  
Connect Tissue Res 2003. 44: 225-39.
197. **MOLLENHAUER J., MOK M.T., KING K.B., GUPTA M., CHUBINSKAYA S., KOEPP H. & COLE A.A.**  
*Expression of anchorin CII (cartilage annexin V) in human young, normal adult, and osteoarthritic cartilage.*  
J Histochem Cytochem 1999. 47: 209-20.
198. **KUSUZAKI K., SUGIMOTO S., TAKESHITA H., MURATA H., HASHIGUCHI S., NOZAKI T., EMOTO K., ASHIHARA T. & HIRASAWA Y.**  
*DNA cytofluorometric analysis of chondrocytes in human articular cartilages under normal aging or arthritic conditions.*  
Osteoarthritis Cartilage 2001. 9: 664-70.
199. **PULLIG O., WESELOH G., RONNEBERGER D., KAKONEN S. & SWOBODA B.**  
*Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone.*  
Calcif Tissue Int 2000. 67: 230-40.
200. **GIRKONTAITE I., FRISCHHOLZ S., LAMMI P., WAGNER K., SWOBODA B., AIGNER T. & VON DER MARK K.**  
*Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies.*  
Matrix Biol 1996. 15: 231-8.
201. **REVELL P.A., PIRIE C., AMIR G., RASHAD S. & WALKER F.**  
*Metabolic activity in the calcified zone of cartilage: observations on tetracycline labelled articular cartilage in human osteoarthritic hips.*  
Rheumatol Int 1990. 10: 143-7.
202. **OETTMEIER R., ABENDROTH K. & OETTMEIER S.**  
*Analyses of the tidemark on human femoral heads. II. Tidemark changes in osteoarthrosis--a histological and histomorphometric study in non-decalcified preparations.*  
Acta Morphol Hung 1989. 37: 169-80.
203. **OKANO K., TSUKAZAKI T., OHTSURU A., OSAKI M., YONEKURA A., IWASAKI K. & YAMASHITA S.**  
*Expression of parathyroid hormone-related peptide in human osteoarthritis.*

- J Orthop Res 1997. 15: 175-80.
204. **PFANDER D., SWOBODA B. & KIRSCH T.**  
*Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes.*  
Am J Pathol 2001. 159: 1777-83.
205. **VALCOURT U., RONZIERE M.C., WINKLER P., ROSEN V., HERBAGE D. & MALLEIN-GERIN F.**  
*Different effects of bone morphogenetic proteins 2, 4, 12, and 13 on the expression of cartilage and bone markers in the MC615 chondrocyte cell line.*  
Exp Cell Res 1999. 251: 264-74.
206. **VALCOURT U., GOUTTENOIRE J., MOUSTAKAS A., HERBAGE D. & MALLEIN-GERIN F.**  
*Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes.*  
J Biol Chem 2002. 277: 33545-58.
207. **WU C.W., TCHETINA E.V., MWALE F., HASTY K., PIDOUX I., REINER A., CHEN J., VAN WART H.E. & POOLE A.R.**  
*Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization.*  
J Bone Miner Res 2002. 17: 639-51.
208. **JOHNSON K. & TERKELTAUB R.**  
*Upregulated ank expression in osteoarthritis can promote both chondrocyte MMP-13 expression and calcification via chondrocyte extracellular PPI excess.*  
Osteoarthritis Cartilage 2004. 12: 321-35.
209. **WHITE A.H., WATSON R.E., NEWMAN B., FREEMONT A.J. & WALLIS G.A.**  
*Annexin VIII is differentially expressed by chondrocytes in the mammalian growth plate during endochondral ossification and in osteoarthritic cartilage.*  
J Bone Miner Res 2002. 17: 1851-8.
210. **NAKAMURA H., YOSHINO S., KATO T., TSURUHA J. & NISHIOKA K.**  
*T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis.*  
Osteoarthritis Cartilage 1999. 7: 401-2.
211. **NALBANT S., MARTINEZ J.A., KITUMNUAYPONG T., CLAYBURNE G., SIECK M. & SCHUMACHER H.R., JR.**  
*Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies.*  
Osteoarthritis Cartilage 2003. 11: 50-4.
212. **OEHLER S., NEUREITER D., MEYER-SCHOLTEN C. & AIGNER T.**  
*Subtyping of osteoarthritic synoviopathy.*  
Clin Exp Rheumatol 2002. 20: 633-40.
213. **LAJEUNESSE D., HILAL G., PELLETIER J.P. & MARTEL-PELLETIER J.**  
*Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis.*  
Osteoarthritis Cartilage 1999. 7: 321-2.
214. **GRYNPAS M.D., ALPERT B., KATZ I., LIEBERMAN I. & PRITZKER K.P.**  
*Subchondral bone in osteoarthritis.*  
Calcif Tissue Int 1991. 49: 20-6.
215. **BAILEY A.J., MANSELL J.P., SIMS T.J. & BANSE X.**  
*Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis.*  
Biorheology 2004. 41: 349-58.
216. **REGINSTER J.Y., PELLETIER J.P., MARTEL-PELLETIER J. & HENROTIN Y.**  
*Pathophysiology of osteoarthritis.*  
*Dans "Osteoarthritis, clinical and experimental aspects", édité par Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. & Henrotin Y.*  
Springer 1999, Berlin, p. 101-227.
217. **MANSELL J.P., TARLTON J.F. & BAILEY A.J.**  
*Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip.*  
Br J Rheumatol 1997. 36: 16-9.
218. **LANG A., HORLER D. & BAICI A.**  
*The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis.*  
J Rheumatol 2000. 27: 1970-9.
219. **BAILEY A.J., SIMS T.J. & KNOTT L.**

- Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer.*  
Int J Biochem Cell Biol 2002. 34: 176-82.
220. **DIEPPE P., CUSHNAGHAN J., YOUNG P. & KIRWAN J.**  
*Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy.*  
Ann Rheum Dis 1993. 52: 557-63.
221. **BRUYERE O., COLLETTE J.H., ETHGEN O., ROVATI L.C., GIACOVELLI G., HENROTIN Y.E., SEIDEL L. & REGINSTER J.Y.**  
*Biochemical markers of bone and cartilage remodeling in prediction of longterm progression of knee osteoarthritis.*  
J Rheumatol 2003. 30: 1043-50.
222. **BRUYERE O., DARDENNE C., LEJEUNE E., ZEGELS B., PAHAUT A., RICHY F., SEIDEL L., ETHGEN O., HENROTIN Y. & REGINSTER J.Y.**  
*Subchondral tibial bone mineral density predicts future joint space narrowing at the medial femoro-tibial compartment in patients with knee osteoarthritis.*  
Bone 2003. 32: 541-5.
223. **CARLSON C.S., LOESER R.F., JAYO M.J., WEAVER D.S., ADAMS M.R. & JEROME C.P.**  
*Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease.*  
J Orthop Res 1994. 12: 331-9.
224. **BOYD S.K., MULLER R. & ZERNICKE R.F.**  
*Mechanical and architectural bone adaptation in early stage experimental osteoarthritis.*  
J Bone Miner Res 2002. 17: 687-94.
225. **REGINSTER J.Y. & HENROTIN Y.**  
*[Pharmacy clinics. How I treat...arthritis. First part: pathophysiologic recurrence and symptomatic treatment].*  
Rev Med Liege 2001. 56: 63-7.
226. **DINGLE J.T.**  
*Non-steroidal, anti-inflammatory drugs administration in the treatment of osteoarthritis.*  
Dans "Osteoarthritis, clinical and experimental aspects", édité par Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. & Henrotin Y. Springer 1999, Berlin, p. 370-387.
227. **REGINSTER J.Y., DEROISY R., ROVATI L.C., LEE R.L., LEJEUNE E., BRUYERE O., GIACOVELLI G., HENROTIN Y., DACRE J.E. & GOSSETT C.**  
*Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial.*  
Lancet 2001. 357: 251-6.
228. **PAVELKA K., GATTEROVA J., OLEJAROVA M., MACHACEK S., GIACOVELLI G. & ROVATI L.C.**  
*Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study.*  
Arch Intern Med 2002. 162: 2113-23.
229. **MAUVIEL A., DAIREAUX M., HARTMANN D.J., GALERA P., LOYAU G. & PUJOL J.P.**  
*[Effects of unsaponifiable extracts of avocado/soy beans (PIAS) on the production of collagen by cultures of synoviocytes, articular chondrocytes and skin fibroblasts].*  
Rev Rhum Mal Osteoartic 1989. 56: 207-11.
230. **MAUVIEL A., LOYAU G. & PUJOL J.P.**  
*[Effect of unsaponifiable extracts of avocado and soybean (Piascledine) on the collagenolytic action of cultures of human rheumatoid synoviocytes and rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1].*  
Rev Rhum Mal Osteoartic 1991. 58: 241-5.
231. **HENROTIN Y.E., LABASSE A.H., JASPAR J.M., DE GROOTE D.D., ZHENG S.X., GUILLOU G.B. & REGINSTER J.Y.**  
*Effects of three avocado/soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes.*  
Clin Rheumatol 1998. 17: 31-9.
232. **BOUMEDIENE K., FELISAZ N., BOGDANOWICZ P., GALERA P., GUILLOU G.B. & PUJOL J.P.**  
*Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes.*  
Arthritis Rheum 1999. 42: 148-56.

233. **CAKE M.A., READ R.A., GUILLOU B. & GHOSH P.**  
*Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU).*  
Osteoarthritis Cartilage 2000. 8: 404-11.
234. **BLOTMAN F., MAHEU E., WULWIK A., CASPARD H. & LOPEZ A.**  
*Efficacy and safety of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the knee and hip. A prospective, multicenter, three-month, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.*  
Rev Rhum Engl Ed 1997. 64: 825-34.
235. **MAHEU E., MAZIERES B., VALAT J.P., LOYAU G., LE LOET X., BOURGEOIS P., GROUIN J.M. & ROZENBERG S.**  
*Symptomatic efficacy of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis of the knee and hip: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial with a six-month treatment period and a two-month followup demonstrating a persistent effect.*  
Arthritis Rheum 1998. 41: 81-91.
236. **APPELBOOM T., SCHUERMANS J., VERBRUGGEN G., HENROTIN Y. & REGINSTER J.Y.**  
*Symptoms modifying effect of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) in knee osteoarthritis. A double blind, prospective, placebo-controlled study.*  
Scand J Rheumatol 2001. 30: 242-7.
237. **LEQUESNE M., MAHEU E., CADET C. & DREISER R.L.**  
*Structural effect of avocado/soybean unsaponifiables on joint space loss in osteoarthritis of the hip.*  
Arthritis Rheum 2002. 47: 50-8.
238. **HENROTIN Y. & REGINSTER J.Y.**  
*Experimental models of osteoarthritis: in vitro models for the study of cartilage damage and repair. Dans "Osteoarthritis, clinical and experimental aspects", édité par Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. & Henrotin Y.*  
Springer 1999, Berlin, p. 53-81.
239. **LEMARE F., STEIMBERG N., LE GRIEL C., DEMIGNOT S. & ADOLPHE M.**  
*Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta.*  
J Cell Physiol 1998. 176: 303-13.
240. **VON DER MARK K., GAUSS V., VON DER MARK H. & MULLER P.**  
*Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.*  
Nature 1977. 267: 531-2.
241. **ELIMA K. & VUORIO E.**  
*Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture.*  
FEBS Lett 1989. 258: 195-8.
242. **LEFEBVRE V., PEETERS-JORIS C. & VAES G.**  
*Production of collagens, collagenase and collagenase inhibitor during the dedifferentiation of articular chondrocytes by serial subcultures.*  
Biochim Biophys Acta 1990. 1051: 266-75.
243. **BASSLEER C., GYSEN P., FOIDART J.M., BASSLEER R. & FRANCHIMONT P.**  
*Human chondrocytes in tridimensional culture.*  
In Vitro Cell Dev Biol 1986. 22: 113-9.
244. **SITTINGER M., BUJIA J., MINUTH W.W., HAMMER C. & BURMESTER G.R.**  
*Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture.*  
Biomaterials 1994. 15: 451-6.
245. **FREED L.E., GRANDE D.A., LINGBIN Z., EMMANUAL J., MARQUIS J.C. & LANGER R.**  
*Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds.*  
J Biomed Mater Res 1994. 28: 891-9.
246. **BUJIA J., SITTINGER M., MINUTH W.W., HAMMER C., BURMESTER G. & KASTENBAUER E.**  
*Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture.*  
Acta Otolaryngol 1995. 115: 307-10.
247. **VAN SUSANTE J.L., BUMA P., VAN OSCH G.J., VERSLEYEN D., VAN DER KRAAN P.M., VAN DER BERG W.B. & HOMMINGA G.N.**

- Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels.*  
Acta Orthop Scand 1995. 66: 549-56.
248. FUJISATO T., SAJIKI T., LIU Q. & IKADA Y.  
*Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold.*  
Biomaterials 1996. 17: 155-62.
249. FORTIER L.A., NIXON A.J., MOHAMMED H.O. & LUST G.  
*Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1.*  
Am J Vet Res 1997. 58: 66-70.
250. SMIDSRØD O. & SKJAK-BRÆK G.  
*Alginate as immobilization matrix for cells.*  
Trends Biotechnol 1990. 8: 71-8.
251. TANAKA H., MATSUMURA M. & VELIKY I.A.  
*Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads.*  
Biotechnol Bioeng 1984. XXVI: 53-58.
252. HAUSELMANN H.J., AYDELOTTE M.B., SCHUMACHER B.L., KUETTNER K.E., GITELIS S.H. & THONAR E.J.  
*Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads.*  
Matrix 1992. 12: 116-29.
253. HAUSELMANN H.J., FERNANDES R.J., MOK S.S., SCHMID T.M., BLOCK J.A., AYDELOTTE M.B., KUETTNER K.E. & THONAR E.J.  
*Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads.*  
J Cell Sci 1994. 107 ( Pt 1): 17-27.
254. HAUSELMANN H.J., MASUDA K., HUNZIKER E.B., NEIDHART M., MOK S.S., MICHEL B.A. & THONAR E.J.  
*Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage.*  
Am J Physiol 1996. 271: C742-52.
255. BINETTE F., MCQUAID D.P., HAUDENSCHILD D.R., YAEGER P.C., MCPHERSON J.M. & TUBO R.  
*Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro.*  
J Orthop Res 1998. 16: 207-16.
256. CHUBINSKAYA S., HUCH K., SCHULZE M., OTTEN L., AYDELOTTE M.B. & COLE A.A.  
*Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads.*  
J Histochem Cytochem 2001. 49: 1211-20.
257. SANCHEZ C., MATEUS M.M., DEFRESNE M.P., CRIELAARD J.M., REGINSTER J.Y. & HENROTIN Y.E.  
*Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Longterm effects of interleukin 1beta and nonsteroidal antiinflammatory drugs.*  
J Rheumatol 2002. 29: 772-82.
258. GUO J.F., JOURDIAN G.W. & MACCALLUM D.K.  
*Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads.*  
Connect Tissue Res 1989. 19: 277-97.
259. VAN OSCH G.J., VAN DEN BERG W.B., HUNZIKER E.B. & HAUSELMANN H.J.  
*Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes.*  
Osteoarthritis Cartilage 1998. 6: 187-95.
260. MOK S.S., MASUDA K., HAUSELMANN H.J., AYDELOTTE M.B. & THONAR E.J.  
*Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools.*  
J Biol Chem 1994. 269: 33021-7.
261. CAMPBELL M.A., HANDLEY C.J., HASCALL V.C., CAMPBELL R.A. & LOWTHER D.A.  
*Turnover of proteoglycans in cultures of bovine articular cartilage.*  
Arch Biochem Biophys 1984. 234: 275-89.

262. **AYDELOTTE M.B., GREENHILL R.R. & KUETTNER K.E.**  
*Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism.*  
Connect Tissue Res 1988. 18: 223-34.
263. **BARONE L.M., OWEN T.A., TASSINARI M.S., BORTELL R., STEIN G.S. & LIAN J.B.**  
*Developmental expression and hormonal regulation of the rat matrix Gla protein (MGP) gene in chondrogenesis and osteogenesis.*  
J Cell Biochem 1991. 46: 351-65.
264. **HENROTIN Y.**  
*Production de protéines matricielles, de cytokines et de formes activées de l'oxygène par les chondrocytes articulaires humains in vitro.*  
Thèse de doctorat en Kinésithérapie, 1994, Université de Liège, Faculté de médecine.
265. **LABARCA C. & PAIGEN K.**  
*A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure.*  
Anal Biochem 1980. 102: 344-52.
266. **BASSLEER C., GYSEN P., BASSLEER R. & FRANCHIMONT P.**  
*Proteoglycans synthesized by human chondrocytes cultivated in clusters.*  
Am J Med 1987. 83: 25-8.
267. **PATTI A.M., GABRIELE A., VULCANO A., RAMIERI M.T. & DELLA ROCCA C.**  
*Effect of hyaluronic acid on human chondrocyte cell lines from articular cartilage.*  
Tissue Cell 2001. 33: 294-300.
268. **KNUDSON W. & LOESER R.F.**  
*CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis.*  
Cell Mol Life Sci 2002. 59: 36-44.
269. **EHLERS E.M., BEHRENS P., WUNSCH L., KUHNEL W. & RUSSLIES M.**  
*Effects of hyaluronic acid on the morphology and proliferation of human chondrocytes in primary cell culture.*  
Ann Anat 2001. 183: 13-7.
270. **KIKUCHI T., YAMADA H. & FUJIKAWA K.**  
*Effects of high molecular weight hyaluronan on the distribution and movement of proteoglycan around chondrocytes cultured in alginate beads.*  
Osteoarthritis Cartilage 2001. 9: 351-6.
271. **HUI W., CAWSTON T. & ROWAN A.D.**  
*Transforming growth factor beta 1 and insulin-like growth factor 1 block collagen degradation induced by oncostatin M in combination with tumour necrosis factor alpha from bovine cartilage.*  
Ann Rheum Dis 2003. 62: 172-4.
272. **FAWTHROP F.W., FRAZER A., RUSSELL R.G. & BUNNING R.A.**  
*Effects of transforming growth factor beta on the production of prostaglandin E and caseinase activity of unstimulated and interleukin 1-stimulated human articular chondrocytes in culture.*  
Br J Rheumatol 1997. 36: 729-34.
273. **PRONOST S., SEGOND N., MACRO M., REDINI F., PENFORNIS H., JULLIENNE A., MOUKHTAR M.S. & PUJOL J.P.**  
*Modulation of interleukin-1 receptor expression by transforming growth factor-beta in cultured rabbit articular chondrocytes: analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction.*  
Osteoarthritis Cartilage 1995. 3: 147-55.
274. **REDINI F., MAUVIEL A., PRONOST S., LOYAU G. & PUJOL J.P.**  
*Transforming growth factor beta exerts opposite effects from interleukin-1 beta on cultured rabbit articular chondrocytes through reduction of interleukin-1 receptor expression.*  
Arthritis Rheum 1993. 36: 44-50.
275. **CHANDRASEKHAR S. & HARVEY A.K.**  
*Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of IL-1 induced protease activity and cartilage proteoglycan degradation.*  
Biochem Biophys Res Commun 1988. 157: 1352-9.
276. **LEE G.M., TIORAN M.E., JANSEN M., GRAFF R.D., KELLEY S.S. & LIN P.**  
*Development of selective tolerance to interleukin-1beta by human chondrocytes in vitro.*  
J Cell Physiol 2002. 192: 113-24.

277. SASAKI K., HATTORI T., FUJISAWA T., TAKAHASHI K., INOUE H. & TAKIGAWA M.  
*Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes.*  
J Biochem (Tokyo) 1998. 123: 431-9.
278. PELLETIER J.P., LASCAU-COMAN V., JOVANOVIC D., FERNANDES J.C., MANNING P., CONNOR J.R., CURRIE M.G. & MARTEL-PELLETIER J.  
*Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors.*  
J Rheumatol 1999. 26: 2002-14.
279. SANCHEZ C.  
*Etude du métabolisme des chondrocytes articulaires humains cultivés en bille d'alginate.*  
Mémoire de DEA en Sciences Biomédicales, 2001, Université de Liège, Faculté de médecine.
280. TETLOW L.C., ADLAM D.J. & WOOLLEY D.E.  
*Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes.*  
Arthritis Rheum 2001. 44: 585-94.
281. MILNER J.M., ELLIOTT S.F. & CAWSTON T.E.  
*Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen degradation: interaction of serine and metalloproteinase pathways.*  
Arthritis Rheum 2001. 44: 2084-96.
282. SANCHEZ C., DEBERG M.A., BURTON S., DEVEL P., REGINSTER J.Y. & HENROTIN Y.  
*Differential regulation of chondrocyte metabolism by oncostatin M and interleukin-6.*  
Osteoarthritis Cartilage 2004. 12: 801-10.
283. LARK M.W., SAPHOS C.A., WALAKOVITS L.A. & MOORE V.L.  
*In vivo activity of human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). Activity against human stromelysin in vitro and in the rat pleural cavity.*  
Biochem Pharmacol 1990. 39: 2041-9.
284. WALTER H., KAWASHIMA A., NEBELUNG W., NEUMANN W. & ROESSNER A.  
*Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation.*  
Pathol Res Pract 1998. 194: 73-81.
285. HENROTIN Y.E., SANCHEZ C., DEBERG M.A., PICCARDI N., GUILLOU G.B., MSIKA P. & REGINSTER J.Y.  
*Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes.*  
J Rheumatol 2003. 30: 1825-34.
286. MANSELL J.P. & BAILEY A.J.  
*Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis.*  
J Clin Invest 1998. 101: 1596-603.
287. TAICHMAN R.S. & HAUSCHKA P.V.  
*Effects of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha on osteoblastic expression of osteocalcin and mineralized extracellular matrix in vitro.*  
Inflammation 1992. 16: 587-601.
288. EVANS A.M., NATION R.L., SANSOM L.N., BOCHNER F. & SOMOGYI A.A.  
*The relationship between the pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers and the dose of racemic ibuprofen in humans.*  
Biopharm Drug Dispos 1990. 11: 507-18.
289. USON J., Balsa A., PASCUAL-SALCEDO D., CABEZAS J.A., GONZALEZ-TARRIO J.M., MARTIN-MOLA E. & FONTAN G.  
*Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies.*  
J Rheumatol 1997. 24: 2069-75.
290. SAXNE T., DI GIOVINE F.S., HEINEGARD D., DUFF G.W. & WOLLHEIM F.A.  
*Synovial fluid concentrations of interleukin-1 beta and proteoglycans are inversely related.*  
J Autoimmun 1988. 1: 373-80.
291. LISIGNOLI G., TONEGUZZI S., POZZI C., PIACENTINI A., RICCIO M., FERRUZZI A., GUALTIERI G. & FACCHINI A.

- Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.*  
J Rheumatol 1999. 26: 791-9.
292. WESTACOTT C.I., WEBB G.R. & ELSON C.J.  
*Cells from osteoarthritic bone produce enzymes which degrade cartilage.*  
Trans Orthop Res Soc 1998. 23: 919.
293. KUDO Y., IWASHITA M., IGUCHI T. & TAKEDA Y.  
*The regulation of type-I collagen synthesis by insulin-like growth factor-I in human osteoblast-like SaOS-2 cells.*  
Pflugers Arch 1996. 433: 123-8.
294. NODA M. & CAMILLIERE J.J.  
*In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta.*  
Endocrinology 1989. 124: 2991-4.
295. ZAMBONIN G., CAMERINO C., GRECO G., PATELLA V., MORETTI B. & GRANO M.  
*Hydroxyapatite coated with heaptocyte growth factor (HGF) stimulates human osteoblasts in vitro.*  
J Bone Joint Surg Br 2000. 82: 457-60.
296. MARTIN T.J., ALLAN E.H. & FUKUMOTO S.  
*The plasminogen activator and inhibitor system in bone remodelling.*  
Growth Regul 1993. 3: 209-14.
297. MOALLI M.R., CALDWELL N.J., PATIL P.V. & GOLDSTEIN S.A.  
*An in vivo model for investigations of mechanical signal transduction in trabecular bone.*  
J Bone Miner Res 2000. 15: 1346-53.
298. LEAN J.M., JAGGER C.J., CHAMBERS T.J. & CHOW J.W.  
*Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation.*  
Am J Physiol 1995. 268: E318-27.
299. MORINOBU M., ISHIJIMA M., RITTLING S.R., TSUJI K., YAMAMOTO H., NIFUJI A., DENHARDT D.T. & NODA M.  
*Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo.*  
J Bone Miner Res 2003. 18: 1706-15.
300. KASPAR D., SEIDL W., NEIDLINGER-WILKE C. & CLAES L.  
*In vitro effects of dynamic strain on the proliferative and metabolic activity of human osteoblasts.*  
J Musculoskelet Neuronal Interact 2000. 1: 161-4.
301. HUNTER D.J., HART D., SNIEDER H., BETTICA P., SWAMINATHAN R. & SPECTOR T.D.  
*Evidence of altered bone turnover, vitamin D and calcium regulation with knee osteoarthritis in female twins.*  
Rheumatology (Oxford) 2003. 42: 1311-6.
302. SCHOUTEN J.S., VAN DEN OUWELAND F.A., VALKENBURG H.A. & LAMBERTS S.W.  
*Insulin-like growth factor-1: a prognostic factor of knee osteoarthritis.*  
Br J Rheumatol 1993. 32: 274-80.
303. TAVERA C., ABRIBAT T., REBOUL P., DORE S., BRAZEAU P., PELLETIER J.P. & MARTEL-PELLETIER J.  
*IGF and IGF-binding protein system in the synovial fluid of osteoarthritic and rheumatoid arthritic patients.*  
Osteoarthritis Cartilage 1996. 4: 263-74.
304. DENKO C.W., BOJA B. & MOSKOWITZ R.W.  
*Growth promoting peptides in osteoarthritis: insulin, insulin-like growth factor-1, growth hormone.*  
J Rheumatol 1990. 17: 1217-21.
305. FRAENKEL L., ZHANG Y., TRIPPEL S.B., MCALINDON T.E., LAVALLEY M.P., ASSIF A., ADAMS K.E., EVANS S.R. & FELSON D.T.  
*Longitudinal analysis of the relationship between serum insulin-like growth factor-I and radiographic knee osteoarthritis.*  
Osteoarthritis Cartilage 1998. 6: 362-7.
306. HOCHBERG M.C., LETHBRIDGE-CEJKU M., SCOTT W.W., JR., REICHLER R., PLATO C.C. & TOBIN J.D.

- Serum levels of insulin-like growth factor in subjects with osteoarthritis of the knee. Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging.*  
Arthritis Rheum 1994. 37: 1177-80.
307. **JORDAN K.M., SYDDALL H., DENNISON E.M., COOPER C. & ARDEN N.K.**  
*Birthweight, vitamin D receptor gene polymorphism, and risk of lumbar spine osteoarthritis.*  
J Rheumatol 2005. 32: 678-83.
308. **OHTERA K., ISHII S. & MATSUYAMA T.**  
*Influence of the vitamin D receptor alleles on human osteoblast-like cells.*  
J Bone Joint Surg Br 2001. 83: 134-8.
309. **NAVES M., ALVAREZ-HERNANDEZ D., FERNANDEZ-MARTIN J.L., PAZ-JIMENEZ J., GARCIA-PRADO P., FERNANDEZ-COTO T., SANTAMARIA I. & CANNATA-ANDIA J.**  
*Effect of VDR gene polymorphisms on osteocalcin secretion in calcitriol-stimulated human osteoblasts.*  
Kidney Int Suppl 2003: S23-7.
310. **CHENU C., PFEILSCHIFTER J., MUNDY G.R. & ROODMAN G.D.**  
*Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 1988. 85: 5683-7.
311. **CARBONE L.D., NEVITT M.C., WILDY K., BARROW K.D., HARRIS F., FELSON D., PETERFY C., VISSER M., HARRIS T.B., WANG B.W. & KRITCHEVSKY S.B.**  
*The relationship of antiresorptive drug use to structural findings and symptoms of knee osteoarthritis.*  
Arthritis Rheum 2004. 50: 3516-25.
312. **BURR D.B.**  
*The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis.*  
J Rheumatol Suppl 2004. 70: 77-80.
313. **YAMANISHI Y., BOYLE D.L., CLARK M., MAKI R.A., TORTORELLA M.D., ARNER E.C. & FIRESTEIN G.S.**  
*Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta.*  
J Immunol 2002. 168: 1405-12.
314. **VAN BEUNINGEN H.M., VAN DER KRAAN P.M., ARNTZ O.J. & VAN DEN BERG W.B.**  
*Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint.*  
Lab Invest 1994. 71: 279-90.
315. **TARDIF G., REBOUL P., DUPUIS M., GENG C., DUVAL N., PELLETIER J.P. & MARTEL-PELLETIER J.**  
*Transforming growth factor-beta induced collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes is triggered by Smad proteins: cooperation between activator protein-1 and PEA-3 binding sites.*  
J Rheumatol 2001. 28: 1631-9.
316. **LITTLE C.B., FLANNERY C.R., HUGHES C.E., MORT J.S., ROUGHLEY P.J., DENT C. & CATERSON B.**  
*Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro.*  
Biochem J 1999. 344 Pt 1: 61-8.
317. **BILLINGHURST R.C., DAHLBERG L., IONESCU M., REINER A., BOURNE R., RORABECK C., MITCHELL P., HAMBOR J., DIEKMANN O., TSCHESCHE H., CHEN J., VAN WART H. & POOLE A.R.**  
*Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.*  
J Clin Invest 1997. 99: 1534-45.
318. **REBOUL P., PELLETIER J.P., TARDIF G., BENDERDOUR M., RANGER P., BOTTARO D.P. & MARTEL-PELLETIER J.**  
*Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade.*  
Arthritis Rheum 2001. 44: 73-84.
319. **GEBHARD P.M., GEHRSTZ A., BAU B., SODER S., EGER W. & AIGNER T.**

- Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes.*  
J Orthop Res 2003. 21: 96-101.
320. **AIGNER T., GLUCKERT K. & VON DER MARK K.**  
*Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions.*  
Osteoarthritis Cartilage 1997. 5: 183-9.
321. **NISHIDA Y., SHINOMURA T., IWATA H., MIURA T. & KIMATA K.**  
*Abnormal occurrence of a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican in osteoarthritic cartilage.*  
Osteoarthritis Cartilage 1994. 2: 43-9.
322. **AIGNER T., ZHU Y., CHANSKY H.H., MATSEN F.A., 3RD, MALONEY W.J. & SANDELL L.J.**  
*Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage.*  
Arthritis Rheum 1999. 42: 1443-50.
323. **WALKER G.D., FISCHER M., GANNON J., THOMPSON R.C., JR. & OEGEMA T.R., JR.**  
*Expression of type-X collagen in osteoarthritis.*  
J Orthop Res 1995. 13: 4-12.
324. **VON DER MARK K., FRISCHHOLZ S., AIGNER T., BEIER F., BELKE J., ERDMANN S. & BURKHARDT H.**  
*Upregulation of type X collagen expression in osteoarthritic cartilage.*  
Acta Orthop Scand Suppl 1995. 266: 125-9.
325. **PUFE T., BARTSCHER M., PETERSEN W., TILLMANN B. & MENTLEIN R.**  
*Pleiotrophin, an embryonic differentiation and growth factor, is expressed in osteoarthritis.*  
Osteoarthritis Cartilage 2003. 11: 260-4.
326. **TARE R.S., OREFFO R.O., CLARKE N.M. & ROACH H.I.**  
*Pleiotrophin/Osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation.*  
J Bone Miner Res 2002. 17: 2009-20.
327. **IMAI S., KAKSONEN M., RAULO E., KINNUNEN T., FAGES C., MENG X., LAKSO M. & RAUVALA H.**  
*Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM).*  
J Cell Biol 1998. 143: 1113-28.
328. **LEFEBVRE V., BEHRINGER R.R. & DE CROMBRUGGHE B.**  
*L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway.*  
Osteoarthritis Cartilage 2001. 9 Suppl A: S69-75.
329. **AIGNER T., GEBHARD P.M., SCHMID E., BAU B., HARLEY V. & POSCHL E.**  
*SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes.*  
Matrix Biol 2003. 22: 363-72.
330. **SUDA N., SHIBATA S., YAMAZAKI K., KURODA T., SENIOR P.V., BECK F. & HAMMOND V.E.**  
*Parathyroid hormone-related protein regulates proliferation of condylar hypertrophic chondrocytes.*  
J Bone Miner Res 1999. 14: 1838-47.
331. **ZHENG Q., ZHOU G., MORELLO R., CHEN Y., GARCIA-ROJAS X. & LEE B.**  
*Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo.*  
J Cell Biol 2003. 162: 833-42.
332. **YANG I.H., KIM S.H., KIM Y.H., SUN H.J., KIM S.J. & LEE J.W.**  
*Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells.*  
Yonsei Med J 2004. 45: 891-900.
333. **STEINERT A., WEBER M., DIMMLER A., JULIUS C., SCHUTZE N., NOTH U., CRAMER H., EULERT J., ZIMMERMANN U. & HENDRICH C.**  
*Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate.*  
J Orthop Res 2003. 21: 1090-7.
334. **KASSEM M., KVEIBORG M. & ERIKSEN E.F.**

- Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol.*  
Eur J Clin Invest 2000. 30: 429-37.
335. **REGINSTER J.Y., SARLET N., LEJEUNE E. & LEONORI L.**  
*Strontium ranelate: a new treatment for postmenopausal osteoporosis with a dual mode of action.*  
Curr Osteoporos Rep 2005. 3: 30-4.
336. **HENROTIN Y., LABASSE A., ZHENG S.X., GALAIS P., TSOUDEROS Y., CRIELAARD J.M. & REGINSTER J.Y.**  
*Strontium ranelate increases cartilage matrix formation.*  
J Bone Miner Res 2001. 16: 299-308.
337. **CANALIS E., HOTT M., DELOFFRE P., TSOUDEROS Y. & MARIE P.J.**  
*The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro.*  
Bone 1996. 18: 517-23.